

MAREK SELWET

Katedra Mikrobiologii Rolnej
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego,
Wołyńska 35, 60-637 Poznań
e-mail: miksel70@jay.au.poznan.pl

ROLA I WŁAŚCIWOŚCI BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ W PROCESIE KONSERWACJI MATERIAŁU ROŚLINNEGO

WSTĘP

Już w starożytnej Babilonii Sumero-Akkadowie znali sposoby biologicznego konserwowania niektórych roślin; starożytni Egipcjanie, Grecy, Rzymianie oraz północni Słowianie i narody Azji znali kiszonki i sporządzali na nie specjalne zbiorniki. Konserwowanie znane jest więc od zamierzchłych czasów, ale opracowanie racjonalnych metod tego zabiegu stało się możliwe dopiero w wyniku rozwoju mikrobiologii, biochemii oraz fizjologii i żywienia zwierząt gospodarskich (SMYK 1959).

Pozostawiając niejadalne roztwory zawierające w swoim składzie cukry, dodatkowe złożone źródła węgla oraz czynniki wzrostowe w warunkach beztlenowych lub naczyniach pozbawionych dostępu tlenu, szybko przerosną one bakteriami mlekowymi. Termin „bakterie mlekowe” przypisano niektórym bakteriom, które posiadają umiejętność wytwarzania kwasu mlekowego. Dokładne pochodzenie nazwy tej grupy bakterii nie jest znane, ale w 1884 r. Hueppe zastosował nazwę „Milchsauerbacillus” dla opisanego bakterii odpowiedzialnych za zakwaszenie mleka i innych produktów spożywczych (MCDONALD 1991).

Pierwsze próby klasyfikowania tych bakterii były podejmowane przez Orla-Jensena (cyt. za MCDONALD 1991), który definiuje je jako mikroaerofile, gramdodatnie, nieprzetrwalnikujące, przeważnie nieruchliwe pałeczki, które fermentują cukry głównie do kwasu mlekowego. Pod-

stawą podziału tych bakterii jest rodzaj przeprowadzanej fermentacji (homofermentacja lub heterofermentacja). Dalsza klasyfikacja tych grup oparta jest na morfologii komórki (pałeczki, ziarniaki) i ich metabolizmie (DELLAGLIO 1985a). SCHLEIFER (1987) podzielił paciorkowce na trzy grupy: (i) streptokoki — *sensu stricto*, w skład których wchodzi głównie paciorkowce, (ii) enterokoki — tworzone głównie przez typowe enterokoki, np. *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, oraz (iii) laktokoki — obejmujące wszystkie paciorkowce mlekowe, np. *Streptococcus lactis*.

Pozostałe bakterie kwasu mlekowego są przydzielone do rodzajów: *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* (SNEATH i współaut. 1986). Niektóre ważniejsze gatunki tych bakterii przedstawia Tabela 1 (MCDONALD 1991).

Bakterie fermentacji mlekowej obniżają pH środowiska przyczyniając się tym samym do zahamowania wzrostu innych mikroorganizmów beztlenowych, które gorzej znoszą warunki kwasowe. O tym jakie bakterie mlekowe będą dominować w konserwowanym materiale będą decydowały warunki środowiska ich rozwoju. Kwas mlekowy wytworzony przez bakterie fermentacji mlekowej wykazuje właściwości sterylizujące i konserwujące, dlatego ta cecha pozwoliła na szerokie wykorzystanie tych bakterii w rolnictwie, mleczarstwie i gospodarstwie domowym (SCHLEGEL 1996).

ŹRÓDŁA WĘGLOWODANÓW DOSTĘPNYCH DLA BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ I ICH PRZEMIANY W PROCESIE ZAKISZANIA

Wielocukry są polimerami monosacharydów połączonych wiązaniami glikozydowymi

(DUFFUS i DUFFUS 1984). W głównej mierze kwas mlekowy jest produkowany przez bakterie fer-

Tabela 1. Bakterie kwasu mlekowego biorące udział w procesie zakiszania

Rodzaj	Typ fermentacji	Morfologia	Mleczan	Gatunek
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentacja	Pałeczka	DL L(+) D(L) DL DL L(+)	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. coryneformis</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Lactobacillus</i>	Heterofermantacja	Pałeczka	DL DL DL DL	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. varidescens</i>
<i>Pediococcus</i>	Homofermentacja	Ziarniak	DL DL DL	<i>P. acidilactici</i> <i>P. damnosus</i> (<i>cerevisiae</i>) <i>P. pentosaceus</i>
<i>Enterococcus</i>	Homofermentacja	Ziarniak	L(+) L(+)	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Lactococcus</i>	Homofermentacja	Ziarniak	L(+)	<i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	Homofermentacja	Ziarniak	L(+)	<i>S. bovis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Homofermentacja	Ziarniak	D(-)	<i>L. mesenteroides</i>

Około 15 do 20% kwasu mlekowego występuje w formie L(+)

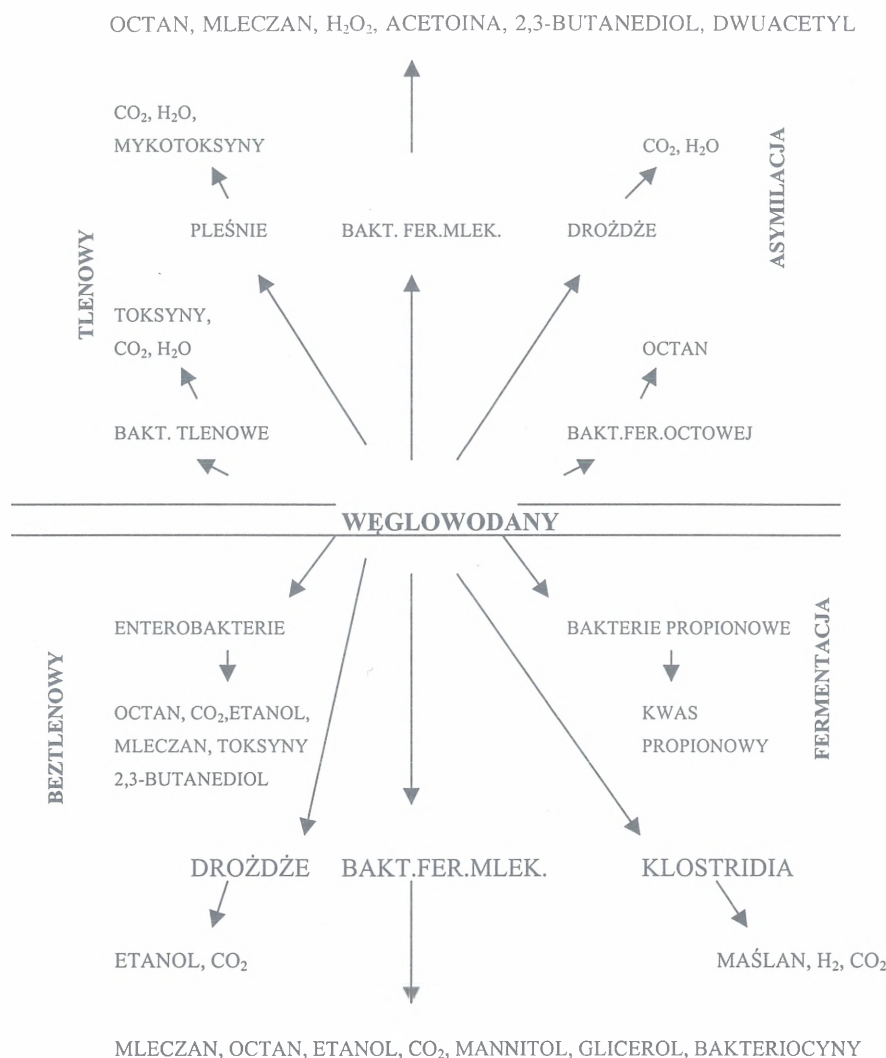
mentacji mlekowej z cukrów rozpuszczalnych w wodzie, znajdujących się w soku komórkowym zakiszanych roślin. W składzie ściany komórkowej roślin spotykamy ogromne ilości celulozy, hemicelulozy, ligniny i pektyn, które następnie trafiają do zakiszanej przyzmy. W dalszym etapie w wyniku złożonych procesów biochemicznych i mikrobiologicznych celuloza i hemiceluloza mogą być hydrolizowane do cukrów rozpuszczalnych w wodzie, które są następnie fermentowane przez bakterie kwasu mlekowego do mleczanu, z jednoczesnym obniżeniem pH kiszonki (MUCK 1993). O stopniu rozkładu ścian komórkowych roślin decyduje w dużej mierze gatunek rośliny, jej faza rozwojowa oraz koncentracja suchej masy i termin zbioru (VAN VUUREN i współaut. 1989, SPOELESTRA i współaut. 1990, MUCK 1993) (Ryc. 1). Stopień rozkładu hemicelulozy i związane z tym straty nie są jednakowe i także są zależne od powyższych czynników (MORISON 1979). Niektórzy autorzy twierdzą, że straty hemicelulozy mogą dochodzić nawet do 40% (GONZALEZ-YANEZ 1990).

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na szybkość rozkładu celulozy jest stopień wysycenia ligniną ścian komórkowych roślin. Lignina, tworząc kompleks z hemicelulozą utrudnia enzymatyczny i mikrobiologiczny rozkład celulozy (HATFIELD 1993).

Na temat roli pektyn w procesie zakiszania zdania są podzielone. Pojawiają się stwierdzenia, że pektyny np. zawarte w lucernie nie są

metabolizowane podczas procesu zakiszania (CAMPBELL i współaut. 1990).

Ilość wydzielającego się CO₂ w procesie zakiszania jest uwarunkowana zawartością suchej masy w surowcu. Poziom CO₂ i kwasów organicznych powstających w czasie zakiszania zielonek jest wskaźnikiem zawartości cukrów i skrobi w kiszonkach. Im więcej kiszonka zawiera cukrów, tym więcej powstaje w niej kwasów organicznych. Należy zaznaczyć, że relacje te mogą ulegać zmianie przy zastosowaniu preparatów chemicznych. Ilość wytworzonego kwasu mlekowego zależy od szczepu bakterii. Bakterie homofermentujące tworzą z cukrów oprócz kwasu mlekowego jedynie ślady produktów ubocznych. Metabolizm glukozy odbywa się tu w szlaku fruktozobisfosforanowym, gdyż bakterie te mają wszystkie potrzebne enzymy, łącznie z aldolazą i wykorzystują wodór z odwodorowania gliceraldehydo-3-fosforanu w redukcji pirogronianu do mleczanu. Stereoswoistość dehydrogenazy mleczanowej i obecność lub brak racemazy mleczanowej decyduje o powstaniu D(-), L(+) lub DL-mleczanu. Jedynie niewielka część pirogronianu ulega dekarboksylacji z wytworzeniem dwutlenku węgla i czasem acetoiny. Ilość produktów ubocznych zależy od dostępności tlenu (SCHLEGEL 1996). Bakterie heterofermentujące oprócz kwasu mlekowego wytwarzają znaczne ilości gazów i innych produktów, gdyż nie mają ważnych enzymów szlaku fruktozobisfosforanowego, tj. aldolazy i izomerazy



Ryc. 1. Tlenowy i beztlenowy metabolizm węglowodanów prowadzony przez mikroorganizmy w kiszonkach (PAHLOW 1991)

triozofosforanowej. W czasie kiszenia rozwijają się głównie bakterie heterofermentujące, dlatego potrzebna ilość cukrów na wyprodukowanie odpowiedniej ilości kwasu mlekowego jest znacznie większa, niż to wynika z równania (PODKÓWKA 1974):



MIKROFLORA EPIFITYCZNA

Bakterie wprowadzane są do silosów wraz z roślinami. O obecności bakterii na powierzchni nadziemnych części roślin wiadomo jest od dawna. Przeprowadzone badania nad epifityczną mikroflorą na sorgo, kukurydzy i lucernie przez MISKOVICA i RASOVICA (1972) pokazują, że ogólna liczebność mikroorganizmów była wyższa na powierzchni liści niż na łodygach we wszystkich fazach rozwojowych roślin. MOON i HENK (1980) obserwując pod mikroskopem skaningowym preparaty wykonane z liści stwierdzili, że bakterie są rozlokowane w pierwszym rzędzie

na zewnętrznej stronie blaszki liściowej i to w większych ilościach niż po stronie wewnętrznej.

Większość bakterii epifitycznych to bezwzględne tlenowce, które w niewielkim stopniu lub wcale nie przyczyniają się do konserwowania kiszonki (DICINSON i współaut. 1975). Ponadto, rozwój tych mikroorganizmów w silosie jest bardzo szybko zahamowany (WHITTENBURY 1968). Na powierzchni roślin znajdują się duże ilości bakterii zdolnych do wzrostu w warunkach beztlenowych i to głównie bakterie z grupy coli (Enterobacteriaceae) (GIBSON i współ-

aut. 1958). Należy zauważyć, że na świeżym materiale roślinnym znajdują się także w niewielkich ilościach gatunki z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* (NILSSON i NILSSON 1959).

Bakterie kwasu mlekowego, które są bardzo ważnymi mikroorganizmami biorącymi udział w procesie zakiszania, występują np. na powierzchni traw w ilościach 1000 razy większych niż ich konkurenci — grzyby i enterobakterie (DELLAGLIO 1985b).

W czasie zakiszania mikroorganizmy zdolne do wzrostu w warunkach beztlenowych (bakterie kwasu mlekowego, enterobakterie, klostridia i niektóre gatunki z rodzaju *Bacillus* oraz drożdże) biorą aktywny udział w procesach biochemicznych. Tym samym przyczyniają się one do udostępniania niektórych składników po-

karmowych dla innych drobnoustrojów. W pierwszych kilku dniach zmiany zachodzące w zakiszanej masie nie są korzystne dla przeprowadzenia prawidłowej fermentacji. W momencie gdy bakterie fermentacji mlekowej znajdują się w warunkach sprzyjających dla ich rozwoju zaczynają w bardzo szybkim tempie zakwaszać środowisko, co w rezultacie spowoduje zahamowanie rozwoju pozostałych grup mikroorganizmów.

Z drugiej strony, jeśli pH nie będzie bardzo szybko obniżone inne grupy drobnoustrojów, a głównie klostridia i enterobakterie oraz drożdże, przeprowadzą szereg nieprawidłowych procesów fermentacyjnych, które pogorszą jakość zakiszanej masy i nie pozwolą na uzyskanie dobrej kiszonki (MCDONALD 1991).

BAKTERIE KWASU MLEKOWEGO

Pomimo, że bakterie fermentacji mlekowej występują na powierzchni roślin, ich rola nadal nie jest poznana. Istnieją sugestie, że mogą one chronić roślinę przed patogenami produkując pewne substancje o działaniu antagonistycznym takie jak np. kwasy, bakteriocyny, substancje przeciwgrzybiczne (VISSER i współaut. 1986). Bardzo dobrze natomiast znany jest fakt produkowania przez tę grupę bakterii bakteriocyn (SNEATH i współaut. 1986, AXELSSON i współaut. 1989). Szczepy posiadające takie zdolności mogą być wykorzystywane jako inokulanty wspomagające proces zakiszania, powodując pewne zmiany w populacji flory bakteryjnej, grzybowej rozwijającej się w silosowanym materiale (MCDONALD 1991).

Bakteriocyny są jednymi z ciekawszych metabolitów komórkowych o silnej aktywności antybakteryjnej. Bakteriocyny mają zróżnicowane masy, bo nawet do kilkudziesięciu tysięcy daltonów (MOLL i współaut. 1999). Większość bakteriocyn posiada wąskie spektrum aktywności i działa jedynie na bakterie blisko spokrewnione z wytwarzającymi je organizmami; jednak niektóre bakteriocyny są zdolne do oddziaływania na bakterie nie spokrewnione ze szczepami producentów tych substancji. Przykładowo, zdolność do produkcji bakteriocyn posiada 63% szczepów *Lactobacillus acidophilus* (SIP 1999).

Przyjrzymy się bakteriom fermentacji mlekowej biorącym udział w zakiszaniu świeżego materiału roślinnego. Kiszenie jest metodą konserwacji za pomocą kwasu mlekowego powstałego z cukrów w procesie fermentacji przy udziale bakterii fermentacji mlekowej (NOWAK 1998). Działanie konserwujące kwasu mleko-

wego, należy tłumaczyć zmianami białka, zachodzącymi w komórkach bakteryjnych i roślinnych pod wpływem tego kwasu. Jony wodorowe (H^+) kwasu mlekowego koaguluja białka plazmy komórek i białkowej części enzymów, przyczyniając się tym samym do zahamowania procesów życiowych komórek roślinnych i bakteryjnych (PODKÓWKA 1974). Jak już wspomniano jony wodorowe wywierają działanie toksyczne na wiele gatunków bakterii i drożdży, hamując ich rozwój. Oto niektóre graniczne wartości pH, poniżej których nie stwierdzono już rozwoju określonych grup drobnoustrojów (PIJANOWSKI 1969):

bakterie gnilne — wrażliwe na kwasy	pH≤6,5
bakterie gnilne — mniej wrażliwe na kwasy	pH≤5,9
paciorkowce hemolityczne	pH≤5,7
bakterie tlenowe — przetrwalnikujące	pH≤5,5
niektóre bakterie z rodziny Enterobacteriaceae — wrażliwe na kwasy	pH≤5,0
niektóre bakterie z rodziny Enterobacteriaceae — mniej wrażliwe na kwasy	pH≤4,5
bakterie kwasu masłowego — beztlenowe przetrwalnikujące	pH≤4,2
<i>Salmonella</i> — pałeczki durowe lub rzekomodurowe	pH≤4,0
bakterie kwasu mlekowego	pH≤3,5
drożdże	pH≤2,5
pleśnie	pH≤1,0

Biorąc pod uwagę konserwujące działanie kwasu mlekowego należy stworzyć w masie roślinnej (poddawanej fermentacji) jak najlepsze warunki dla rozwoju bakterii mlekowych. Na przebieg początkowej fazy fermentacji wpływa poziom cukrów w zielonce, który powinien wynosić 2,5–3% (KUJAWA 1994).

W obrębie populacji bakterii homofermentacji i heterofermentacji mlekowej często obserwuje się zmiany. Beck (cyt. za McDONALD 1991) uważa, że w dobrze przyrządzonej przyźmie zakwaszenie środowiska inicjują bakterie homofermentujące, takie jak *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus curvatus*, ale już po 4 dniach 85% szczepów to szczepy heterofermentujące, takie jak *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus brevis*. Szczepy te są dominującymi już do końca dojrzewania konserwowanej masy roślinnej. Ewentualna dominacja szczepów heterofermentatywnych wynika z ich wyższej tolerancji na kwas octowy. Z podobnymi spostrzeżeniami spotykamy się u RAURAMAA i współaut. (1987).

Bardzo ważną rolę w procesie zakiszania odgrywa *Lactobacillus plantarum* (FENTON 1987), który jako jedyny wśród bakterii mlekowych jest zdolny do szybkiego i skutecznego zasiedlenia świeżej zakiszanej masy, gdzie przeprowadza fermentację z szybkim wytworzeniem kwasu mlekowego (DELLAGLIO 1985).

Od niedawna, dużo uwagi poświęca się heterofermentującej bakterii *Lactobacillus graminis*, która występuje w dużym stopniu w kiszonych sporządzonych z traw (BECK i współaut. 1989).

Cechą wyróżniającą bakterie mlekowe jest ich tolerancja na wysokie zakwaszenie środowiska. Zakres pH dla dobrego wzrostu tych bakterii wynosi od 4,0 do 6,8, pomimo to niektóre gatunki takie jak *Pediococcus damnosus* (*cerevisiae*) mogą się rozwijać przy pH 3,5 (SNEATH i współaut. 1986). Streptokoki tolerują zakwaszenie środowiska w granicach pH 4,5–5,0, a minimalne pH jest zróżnicowane prawdopodobnie z powodu zróżnicowania składu enzymów w komórkach tych bakterii (KASHKET 1987).

Zakres temperatury w jakim mogą się rozwijać bakterie fermentacji mlekowej jest bardzo szeroki. Wzrost tych bakterii możemy obserwować już przy temperaturze 5°C, a także przy 50°C. Należy zaznaczyć, że optymalna temperatura dla wzrostu bakterii mlekowych wynosi od 25°C do 45°C (SNEATH i współaut. 1986).

Większość gatunków w obrębie *Lactobacillus* rośnie w temperaturze 15°C, przy czym nie obserwuje się ich rozwoju, gdy temperatura wynosi 45°C. Wyjątek stanowi *Lactobacillus fermentum*, który doskonale rozwija się w wy-

ższych temperaturach (45°C), a temperatura w granicach 15°C hamuje jego rozwój.

Pozostałe gatunki bakterii mlekowych powszechnie występujące w kiszonych np. *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* doskonale rozwijają się w temperaturze 10–45°C. *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus* i *Pediococcus acidilactici* rozwijają się w temperaturze 25–45°C (McDONALD 1991).

Inną dodatkową cechą charakteryzującą bakterie mlekowe jest ich stosunek do czynników wzrostowych. Żadna bakteria z tej grupy nie rośnie w podłożu mineralnym zawierającym sole amonowe będące dla nich jedynym źródłem azotu (SCHLEGEL 1996).

Większość gatunków tych bakterii wymaga obecności w podłożu witamin (laktoflawiny, tiaminy, kwasu pantotenowego, nikotynowego foliowego, biotyny), aminokwasów, puryn i pirymidyn (WILSON i MILES 1975, SNEATH i współaut. 1986).

Bakterie fermentacji mlekowej opisywane są jako fakultatywne beztlenowce (BROCK 1974), mikroaerofile (WILSON i MILES 1975) lub tolerancyjne w stosunku do tlenu (GILL i współaut. 1986).

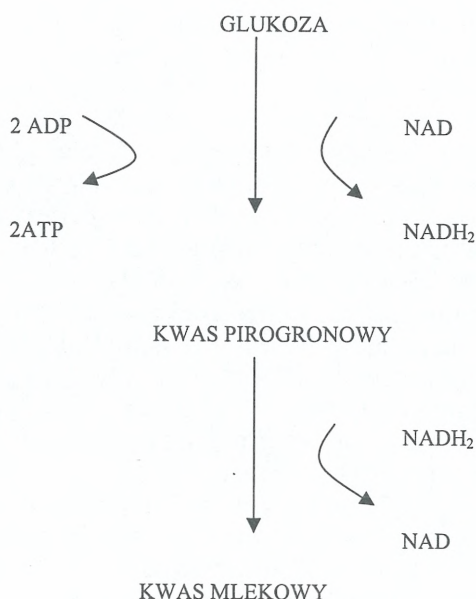
Lactobacteriaceae, a szczególnie paciorkowce, mimo że nie zawierają hemin (katalaza, cytochromy), rosną w obecności powietrza lub tlenu. Odkryto jednak niedawno, że niektóre bakterie mlekowe wytwarzają cytochromy i mogą być zdolne do fosforylacji w łańcuchu oddychowym np. *Enterococcus faecalis* i *Lactobacillus lactis* (BRAYAN-JONES 1969, SCHLEGEL 1996).

Należy zwrócić też uwagę na różne formy kwasu mlekowego produkowanego przez tą grupę bakterii. Wiadomym jest powszechnie, że większość roślin i zwierząt produkuje wyłącznie L(+) kwas mlekowy. Gatunki bakterii mlekowych są zdolne do wytwarzania także D(-), L(+) lub mieszaniny obu (DL) (SNEATH i współaut. 1986).

Bakterie mlekowe mają zdolność do fermentacji heksoz (fruktoza, glukoza) i to głównie na drodze homofermentacji. Jedynym produktem w tej fermentacji jest kwas mlekowy (KUNICKI-GOLDFINGER 1994) (Ryc. 2).

Bakterie te mogą fermentować heksozy na drodze heterofermentacji, a produktami końcowymi tych przemian są, poza mleczanem, octan i alkohol etylowy. Są zdolne do rozkładu pentoz, pochodzących ze świeżo skoszonych roślin lub tworzonych w wyniku działania hemicelulazy (MORRISON 1979).

Niektóre bakterie mlekowe (homo- i heterofermentujące) potrafią fermentować kwasy organiczne z wytworzeniem mleczanu i octanu jako głównych produktów końcowych (McDO-



Ryc. 2. Homofermentacja mlekowa (KUNUCKI-GOLDFINGER 1994).

NALD 1991). Kwasy te są reprezentowane w roślinach głównie przez kwas cytrynowy i jabłkowy, które są szybko metabolizowane w procesie zakiszania (LESSARD 1966). Produktami

końcowymi tej fermentacji mogą być octan, etanol, 2-3-butanodiol, mrówczan, mleczan, acetoina (MCDONALD 1991).

THE ROLE AND PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA IN PLANT CROPS PRESERVATION

Summary

Fresh forage crops such as maize, grasses, legumes, wheat and lucerne can be preserved by ensiling. Ensiling is a forage preservation method based on a spontaneous acid fermentation under anaerobic conditions. The lactic acid bacteria (LAB) ferment the water-soluble carbohydrates (WSC) in the crop to lactic acid, and to a lesser extent to acetic acid. Due to the production of these acids the pH of the ensiled material decreases and microorganisms responsible for spoilage are inhibited. The silage microflora play a key role in successful outcome of the conservation process. Lactic acid bacteria belong to the epiphytic microflora of

plant material. Often the population of LAB increases substantially between harvesting and ensiling. Lactic acid bacteria that are regularly associated with silage are members of the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Eri-terococcus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. Crop characteristics like sugar content, dry matter content, and sugar composition, combined with lactic acid bacterial properties such as acid and osmotolerance, and substrate utilization will decisively influence the competitiveness of the lactic acid bacterial flora during silage fermentation.

LITERATURA

- AXELSSON L., CUNG T. C., DOBROGOSZ W. J., LINDGREN S., 1989. *Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content*. Microb. Ecol. Health Disease, 2, 131-136.
- BECK R., WEISS N., WINTER J., 1989. *Taxonomy of Lactobacillus sp.* Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 93-94.
- BRAYAN-JONES D. G., WHITTENBURY R., 1969. *Hematin-dependent oxidative phosphorylation in Streptococcus faecalis*. J. Gen. Microbiol., 58, 247-260.
- BROCK T., 1974. *Biology of Microorganisms*. Wyd 2, Prentice-Hall, London.
- CAMPBELL C., TAYLOR K., MATSOUKA S., MARSHALL S., BUCHANAN-SMITH J. G., 1990. *Inoculants and enzymes as additives for lucern silage with measurements of changes in structural carbohydrates and pectin during the ensiling period*. Proceedings of the Ninth Silage Conference, Newcastle upon Tyne, 14-15.
- DELLAGLIO F., 1985a. *Evolution of microflora during the conservation of forage in microsilos*. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 3, 91-104.
- DELLAGLIO F., 1985b. *Evolution of microflora during the conservation of forage in microsilos*. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 3, 273-282.
- DICINSON C. H., AUSTIN B., GOODLELLOW M., 1975. *Journal of Applied Bacteriology*, 24, 60-70.
- DUFFUS C. M., DUFFUS J. H., 1984. *Carbohydrate Metabolism in Plant*, Longman, London.
- FENTON M. P., 1987. *Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn*. J. Appl. Nutr. 62, 181-188.
- GIBSON T., STIRLING A. C., KEDDIE R. M., ROSENBERGER R. F., 1958. *The role Lactobacillus plantarum in silage process*. J. Gen. Microbiol. 19, 112-129.
- GILL M., SIDDONS R. C., BEEVER D. E., 1986. *Microbial populations, fermentation and aerobic stability of corn silage*. Br. J. Nutr. 55, 399-407.
- GONZALEZ-YANEZ M., 1990. *Polysaccharide degrading enzymes as additives for silage*. Praca magisterska, University of Edinburgh.
- HATFIELD R. D., 1993. *Cell wall polysaccharide interactions and degradability*. [W:] *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. H. G. JUNG, D. R. BUXTON, R. D. HATFIELD

- J. RALPH, (red.). Am. Soc. Agroon., Crop Sci. Soc. Am; Soil Sci. Soc. Am., Medison, WI, 285.
- KASHKET E. R., 1987. *Structure, function and evolution of bacterial enzymes*. FEMS Microbiol. Rev. 46, 233-244.
- KUJAWA A., 1994. Wpływ wybranych dodatków kiszonkarskich na skład chemiczny, strawność i spożycie suchej masy kiszzonek z mieszanek trawiasto-motylikowatych z dużym udziałem koniczyń. Akademia Rolnicza w Poznaniu. Praca doktorska.
- KUNICKI-GOLDFINGER W., 1994. *Życie bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- LESSARD J. R., 1966. *Maize silage: incidence of LAB during conservation*. Praca doktorska, University of Edinburgh.
- MCDONALD P., HENDERSON A. R., HERON S. J. E., 1991. *The biochemistry of silage*. Wyd. 2. Chalcombe Publications, UK.
- MISKOVIC K., RASOVIC B., 1972. *Epiphytic microflora on alfalfa and sorgo*. Savremena poljoprivreda, 20, 45-54.
- MOLL G. N., 1999. *Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. 76, 185.
- MOON N. J., HENK W. G., 1980. *Characterization of the flora of lactic acid bacteria in ensiled plant material*. Appl. Environ. Microbiol., 40, 1122-1129.
- MORRISON J. M., 1979. *Changes in the cell-wall components of laboratory silages and the effect of various additives on these changes*. J. Agricult. Sci., Cambridge, 93, 581-586.
- MUCK R., E., 1993. *The role of silage additives in making high quality silage*. Proc. Natl. Silage Prod. Conf., Syracuse, NY. NRAES-67. Northeast Reg. Agric. Ext. Serv., Ithaca, NY.
- NILSSON G., NILSSON P. E., 1959. *Lactic acid fermentation in silage*. Archiv für Microbiologie, 24, 412-422.
- NOWAK A., 1998. *Mikrobiologia*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie.
- PHALOW G., 1991. *Role of microflora in forage conservation*. Proceedings of a Conference on Forage Conservation Towards 2000, Braunschweig, 26.
- PIJANOWSKI E., 1969. *Ogólna technologia żywności*. WNT, Warszawa.
- PODKÓWKA W., 1974. *Nowoczesne metody kiszenia pasz*. PWRiL, Warszawa.
- RAURAMAA A., SETÄLÄ J., MOISIO T., SIVELÄ S., HEIKKILÄ T., LAMPILA M., 1987. *Additives in forage conservation*. J. Agric. Sci., Finland, 59, 371-377.
- SCHLEGEL H., 1996. *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa.
- SCHLEIFER K. H., 1987. *Menagment of silage effluent. Evolution of microflora during the conservation of forage in microsilos*. FEMS Microbiol. Rev., 46, 201-203.
- SIP A., 1999. *Produkcja bakteriocyn przez bakterie mlekowe*. Biotechnologia 2, 145-166.
- SMYK B., 1959. *Zarys Mikrobiologii Zootechnicznej*. PWN, Łódź-Kraków.
- SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E., HOLT J. G., 1986. *Bergeys Mannual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimor, tom 2.
- SPOELESTRA S. F., STEG A., BEUVINK J. M. W., 1990. *Application of cell wall degrading enzymes to grass silage*. [W:] *Agricultural Biotechnology in Focus in the Netherlands*. J. J. Dekkers, H. C. VAN DER PLAS, D. H. VUIJK, (red.). Pudoc, Wageningen, The Netherlands 165.
- VAN VUUREN A. M., BERGSMAN K., FROL-KRAMER F., J. A. C VAN BEERS, 1989. *Effects of addition of cell wall degradation enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of grass silage*. Grass Forage Sci. 44, 223.
- VISSER R., HOLZAPFEL W. H., BEZUIDENHOUT J. J., KOTZE J. M., 1986. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 552-555.
- WHITTENBURY R., 1968. *Process Biochemistry*, 3, 27-31.
- WILSON G. S., MILES A., 1975. *Topley and Wilsons Principles of Bacteriology Virology and Immunology*, Edward Arnold, London.