

Utjecaj koncentracije inokulanta na promjene sadržaja kiselina i mikrobiološku kvalitetu silaže lucerne tijekom aeracije

Vertuš, Vida

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:124597>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Utjecaj koncentracije inokulanta na promjene
sadržaja kiselina i mikrobiološku kvalitetu silaže
lucerne tijekom aeracije**

DIPLOMSKI RAD

Vida Vertuš

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

**Utjecaj koncentracije inokulanta na promjene
sadržaja kiselina i mikrobiološku kvalitetu silaže
lucerne tijekom aeracije**

DIPLOMSKI RAD

Vida Vertuš

Mentor:

Doc. dr. sc. Marija Duvnjak

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Vida Vertuš**, JMBAG 0178118017, rođen/a 27.05.1999. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj koncentracije inokulanta na promjene sadržaja kiselina i mikrobiološku kvalitetu silaže lucerne tijekom aeracije

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Vida Vertuš**, JMBAG 0178118017, naslova

**UTJECAJ KONCENTRACIJE INOKULANTA NA PROMJENE SADRŽAJA
KISELINA I MIKROBIOLOŠKU KVALITETU SILAŽE LUCERNE TIJEKOM
AERACIJE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

1. doc.dr.sc. Marija Duvnjak, mentor _____
2. izv.prof.dr.sc. Kristina Kljak, član _____
3. prof.dr.sc. Mirna Mrkonjić Fuka, član _____

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mariji Duvnjak na pruženoj prilici, strpljenju, vremenu, potpori, stručnim kao i životnim savjetima te na ukazanom povjerenju.

Zahvaljujem se svim zaposlenicama laboratorija Zavoda za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, koje su mi pomogle u provođenju svih kemijskih analiza potrebnih za ovaj rad.

Također, zahvaljujem se i voljenoj osobi koja je uvijek tu za mene te kolegama na podršci bez kojih studiranje u Zagrebu ne bi prošlo tako brzo i uspješno.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji koja me uvijek podržava i „daje vjetar u leđa“.

Na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek tu uz mene, bez obzira radilo se o teškim ili sretnim trenucima.

Ništa od dosadašnjih postignuća ne bih mogla postići bez vas. Hvala vam svima od srca.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteze i cilj istraživanja.....	2
2. Razrada literature	3
2.1. Siliranje	3
2.1.1. Aerobna faza	4
2.1.2. Faza fermentacije	5
2.1.2.1. Produkti fermentacije – kiseline i alkoholi.....	5
2.1.3. Stabilna faza	6
2.1.4. Faza izuzimanja.....	6
2.2. Aerobna stabilnost silaža i mikroorganizmi aerobnog kvarenja silaža	7
2.3. Inokulanti u silaži lucerne	8
3. Materijali i metode	10
3.1. Priprema silaže	10
3.2. Aerobna stabilnost silaža.....	12
3.3. Kemijske analize silaža	13
3.4. Mikrobiološka analiza silaža	16
3.5. Statistička obrada podataka	17
4. Rezultati i rasprava.....	18
4.1. Utjecaj dodatka inokulanta i vremena aeracije te njihove interakcije na promjene šećera, kiseline i alkohola te mikrobiološku kvalitetu silaža tijekom sedmodnevne aeracije	21
4.2. Promjene sadržaja šećera tijekom aeracije.....	22
4.3. Promjene sadržaja mliječne kiseline tijekom aeracije.....	24
4.4. Promjene sadržaja octene kiseline tijekom aeracije	27
4.5. Promjene sadržaja propionske kiseline tijekom aeracije.....	29
4.6. Promjene sadržaja izomaslačne i maslačne kiseline tijekom aeracije.....	31
4.7. Promjene sadržaja metanola tijekom aeracije	33
4.8. Promjene sadržaja etanola tijekom aeracije	34
4.9. Promjene sadržaja propanola tijekom aeracije	35
4.10. Promjene parametara mikrobiološke kvalitete silaža tijekom aeracije	36
5. Zaključak	39
6. Literatura	40
7. Životopis.....	44

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Vide Vertuš**, naslova

Utjecaj koncentracije inokulanta na promjene sadržaja kiselina i mikrobiološku kvalitetu silaže lucerne tijekom aeracije

Prilikom izuzimanja silaža i aeracije, dolazi do aktivnosti aerobnih mikroorganizama i kvarenja silaže, što se očitava razgradnjom mliječne kiseline i hranjivih tvari te povećanjem temperature silaža. Cilj rada bio je istražiti mikrobiološke karakteristike te promjene sadržaja mliječne kiseline i HMK u silaži lucerne siliranoj bez i s tri različite koncentracije inokulanta bakterija mliječne kiseline (BMK) tijekom sedmodnevne aeracije silaže. Silaža lucerne silirana je s tri koncentracije inokulanta koji je kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih BMK (T2: standardna, T3: 1,5x standardne i T4: 2x standardne) te kontrola bez dodatka BMK (T1) u vakuum vrećicama (SmartVac, Status d.o.o.) u peteroplikatu. Nakon 124. dana siliranja, silaže su aerirane tokom 7 dana. Promjena temperature u silažama mjerena je svakih 15 min tijekom cijelog razdoblja aeracije, dok su silaže uzorkovane 0., 3. i 7. dan i analizirane na broj BMK, kvasaca, plijesni i spora bakterija maslačne kiseline (BAB) te sadržaje fermentacijskih parametara. U cijelom periodu aeracije sve testirane silaže ostale su aerobno stabilne. Međutim, T1 i T4 na kraju aeracije imale su 3x veće vrijednosti mliječne kiseline nego T2 i T3 ukazujući na neočekivanu izrazitu homofermentativnu aktivnost u T4. Primjena inokulanta na silaže imala je pozitivan utjecaj na sadržaj octene kiseline na kraju aeracije u usporedbi s kontrolom (38 – 47 g/kg ST u T2 – T4 vs. 30 g/kg ST u T1) i sadržaj propionske kiseline (0,83 – 3,32 g/kg ST u T2 – T4 vs. 0,76 g/kg ST u T1). Najveći sadržaj maslačne kiseline na kraju aeracije bio je u T3 u kojem je bio i najveći broj BAB. Primjena inokulanta imala je pozitivan utjecaj na broj BMK na kraju aeracije (oko 1,16x više BMK u T2 – T4), dok su kvasci i plijesni bili ispod prosjeka u svim testiranim silažama (kvasci < 3,1 log₁₀ CFU/g, plijesni < 4,1 log₁₀ CFU/g). Rezultati istraživanja pokazuju kako je inokulant poželjno koristiti u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača jer ta koncentracija omogućava optimalnu aktivnost homofermentativnih i heterofermentativnih BMK te proizvodnju silaže s optimalnim sadržajem mliječne kiseline i HMK za aerobnu stabilnost.

Ključne riječi: aerobna stabilnost, silaža lucerne, koncentracija inokulanta BMK, fermentacijski parametri, broj mikroorganizama

Summary

Of the master's thesis – student **Vida Vertuš**, entitled

THE EFFECT OF DIFFERENT INOCULANT CONCENTRATION APPLICATION ON CHANGES IN ACID CONTENT AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF ALFALFA SILAGE DURING AERATION

During silage sampling and aeration, the activity of aerobic microorganisms leads to silage deterioration which is indicated by the degradation of lactic acid, nutrient loss and an increase in silage temperature. This study aimed to investigate microbiological characteristics as well as changes of content in lactic acid and VFA in alfalfa silage ensiled without and with three different concentrations of lactic acid bacteria (LAB) inoculant during a seven-day silage aeration. Alfalfa silage was ensiled with three combined concentrations of homofermentative and heterofermentative LAB inoculant (T2: standard, T3: 1.5x standard and T4: 2x standard) and control without LAB inoculant (T1) in vacuum bags (SmartVac, Status d.o.o.). All of the treatments were sampled in five repetitions. After 124 days of ensiling, the silages were subjected to aeration for 7 days. The change in silage temperatures were measured every 15 minutes during the whole aeration period and were sampled 0th, 3rd and 7th day to determine the number of LAB, yeasts, moulds, and spores of butyric acid (BAB), as well as fermentation parameters. During the entire period of aeration, all the tested silages remained aerobically stable. However, T1 and T4 had 3x higher lactic acid values when compared to T2 and T3, thus showing an unexpectedly pronounced homofermentative activity in T4. Inoculant application had a positive influence on acetic acid content at the end of aeration when compared to the control group (38 – 47 g/kg DM in T2 – T4 vs. 30 g/kg DM in T1) and propionic acid (0.83 – 3.32 g/kg DM in T2 – T4 vs. 0.76 g/kg DM in T1). The highest butyric content was in T3, which also had the highest number of BAB. Inoculant application showed a positive effect on LAB numbers at the end of aeration (about 1.16x more LAB in T2 – T4) while yeasts and moulds were below average in all tested silages (yeasts < 3.1 log₁₀ CFU/g, moulds < 4.1 log₁₀ CFU/g). The results show when using an inoculant, it is preferred to use the concentration recommended by the producer, because that concentration enables the optimal activity of homofermentative and heterofermentative LAB and the production of silage with an optimal content of lactic acid and VFA for aerobic stability.

Keywords: aerobic stability, alfalfa silage, LAB inoculant concentration, fermentation parameters, number of microorganisms

1. Uvod

Silaža lucerne najvažnije je proteinsko voluminozno krmivo u hranidbi preživača kada je svježa paša oskudna. Ova mahunarka ima jednu od najvećih hranjivih vrijednosti (6,33 MJ/kg ST prije pupanja; DLG 2018.), te se osim u obliku silaže, može skladištiti kao sijeno ili sjenaža (Leto 2015.). Proizvodnja silaža važna je zbog mogućnosti korištenja tako konzervirane zelene mase tijekom cijele godine. (Kung Jr 2010a.). Prilikom siliranja dolazi do konzerviranja hranjivih tvari iz biljaka u anaerobnim uvjetima aktivacijom bakterija mliječne kiseline (BMK). U anaerobnim uvjetima, BMK fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate do organskih kiselina, u najvećem dijelu do mliječne kiseline i hlapljivih masnih kiselina (HMK), čime dolazi do pada pH vrijednosti i konzerviranja hranjivih tvari iz biljke (McDonald i sur. 1991.). U usporedbi s travama, lucerna ima veću koncentraciju sirovih proteina (SP) i minerala kao i veći puforni kapacitet, ali niži sadržaj vodotopljivih šećera (<1,5 %; Coblenz i Muck 2012.) čime je kategorizirana u biljke koje je otežano silirati. Puforni kapacitet je prirodna sposobnost neke biljne mase da se odupre promjeni pH (McDonald i sur. 1991.). Zbog visokog pufernog kapaciteta lucerne, za siliranje ove biljke potrebna je proizvodnja veće količine mliječne kiseline kako bi pH pao (McDonald i sur. 1991.). Kako bi se brzo postigao pad pH i konzerviranje silažne mase, u novije vrijeme koriste se različiti dodaci ili aditivi.

Danas, u proizvodnji silaže lucerne, najčešće se kao aditivi koriste inokulanti BMK zbog brojnih prednosti kao što su: lagano korištenje, prirodno podrijetlo te sigurnost za okoliš (McDonald i sur. 1991.). Inokulanti potiču sintezu mliječne kiseline i HMK koji usmjeravaju fermentaciju i utječu na kvalitetu silaže (Muck i sur. 2018.). Da bi proizveli silažu visoke kvalitete, prilikom siliranja, važno je osigurati optimalne uvjete za aktivnost BMK koji podrazumijevaju: brzo uklanjanje zraka, brzu proizvodnju mliječne kiseline s rezultatom brzog snižavanja pH te očuvanje anaerobnih uvjeta tijekom cijelog perioda siliranja. Anaerobni uvjeti prestaju kod izuzimanja i korištenja silaža u hranidbi životinja, kada dolazi do otvaranja i aeriranja silaže (Kung 2010a.).

Otvaranjem i izuzimanjem silaža dolazi do ulaska zraka u silažu i kvarenja silirane mase zbog aktivacije nepoželjnih, aerobnih mikroorganizama (Ranjit i Kung 2000.). Aerobna stabilnost definira se kao period aeracije silaže u kojem temperatura silaže nije porasla za više od 2 °C (Kung i Ranjit 2001.) ili 3 °C (DLG 2018.) od temperature okoliša. Ovo svojstvo silaža vrlo je bitan parametar kvalitete silaža jer ukazuje na sposobnost opiranja prema aktivnosti aerobnih mikroorganizama i razgradnji hranjivih tvari silaže kod aeriranja (Ivetić 2017.). U prisustvu zraka dolazi do kvarenja silaže jer važni fermentacijski produkti kao što je primjerice mliječna kiselina, postaju substrati za nepoželjne mikroorganizme kao što su kvasci (Wilkinson i Davies 2013.). U aeriranim silažama dolazi do rasta temperature kao posljedica mikrobiološke oksidacije hranjivih tvari (Wilkinson i Davies 2013.). Ukoliko je aktivnost aerobnih mikroorganizama značajna, ona može uzrokovati veći gubitak suhe tvari te posljedično smanjiti hranjivost silaža (McDonald i sur. 1991.).

1.1. Hipoteze i cilj istraživanja

Aerobna stabilnost jedan je od najvažnijih parametara kvalitete silaže jer ukazuje na sposobnost očuvanja hranjivih tvari silaže tijekom izuzimanja. Aerobna degradacija ovisi o aktivnosti aerobnih mikroorganizama na koje djeluju količine kiseline u silaži (mliječna kiselina i HMK). Proizvodnja kiseline najvažniji je pojedinačan faktor za dobivanje aerobno stabilne silaže, ali ta proizvodnja uvelike varira te ovisi i o korištenim inokulantima u postupku siliranja. Sukladno tome, formirane su sljedeće hipoteze i cilj istraživanja:

- Dodatak inokulanta prilikom spremanja silaže lucerne povećati će aerobnu stabilnost silaža
- Veća koncentracija inokulanta dati će aerobno stabilniju silažu
- Pad sadržaja mliječne kiseline i HMK tijekom aeracije bit će intenzivniji u silaži bez dodatka inokulanta
- Tijekom aeracije u silažama s dodatkom inokulanta biti će manji broj aerobnih mikroorganizama, kvasaca i plijesni, u odnosu na silažu bez dodatka inokulanta

Cilj rada je ispitati mikrobiološke karakteristike (broj BMK, kvasaca i plijesni, spora bakterija maslačne kiseline (BAB)) te promjene sadržaja mliječne kiseline, HMK, šećera i alkohola u silaži lucerne siliranoj bez i s tri različite koncentracije inokulanta (standardna, 1,5x standardne ili standardna uvećana za 50 %, 2x standardne ili standardna uvećana za 100 %) tijekom sedmodnevne aeracije silaže.

2. Razrada literature

Lucerna (*Medicago sativa*) jedna je od najcjenjenijih krmnih kultura u hranidbi preživača, prvenstveno u hranidbi visokomliječnih krava u laktaciji. Ova biljka pripada porodici leguminoza (*Fabacea*) te tijekom vegetacije prosječno ostvaruje tri do pet otkosa (Leto 2012.). U biološkim karakteristikama nadmašuje ostale vrste mahunarki u hranidbi preživača te se zbog toga često naziva i „kraljica mahunarka“ (Ivetić 2017.). Izvanredna hranjivost lucerne očituje se u visokom sadržaju proteina i boljem aminokiselinskom sastavu od žitarica, čemu doprinosi sadržaj aminokiselina lizina i triptofana koje su deficitarne u kukuruзу. Upravo zbog većeg sadržaja lizina (tri puta više od kukuruza) i triptofana (osam puta više od kukuruza), krmne smjese kukuruza idealno se nadopunjuju s lucernom (Ivetić 2017.). Osim toga, lucerna sadrži visoki udio kalcija i karotena (Leto 2012.). Iako lucerna predstavlja izvrsnu voluminoznu hranu kao zelena paša, prilikom siliranja mora se provesti niz postupaka kako bi se kvaliteta zelene mase očuvala. Jedan od većih problema pri siliranju lucerne je visoki puferni kapacitet biljke, odnosno sposobnost biljke da se odupre promjeni pH (McDonald i sur. 1991.).

2.1. Siliranje

Siliranje je način konzerviranja biljne mase s visokim udjelom vlage uz pomoć BMK pri anaerobnim uvjetima. U ovom procesu BMK fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate (glukoza, fruktoza, saharoza i neke pentoze) do organskih kiselina, u najvećem dijelu do mliječne kiseline (McDonald i sur. 1991.). Sintezom organskih kiselina, primarno mliječne i u manjoj količini HMK, dolazi do zakiseljavanja zelene mase, pada pH i konzerviranja. Naime, u kiselim uvjetima dolazi do inhibicije rasta nepoželjnih mikroorganizama i konzerviranja zelene mase za kasniju uporabu (McDonald i sur. 1991., Weinberg i Muck 1996., Weinberg i Ashbell 2003., Duvnjak 2016.).

Tijekom pripreme silaža, a u cilju sprječavanja rasta nepoželjnih mikroorganizama, izrazito je bitno brzo uklanjanje zraka nakon punjenja i zatvaranja silosa (Borreani i sur. 2018.). Prije punjenja u silose (silo-tornjevi, trench silosi, vodoravni silosi) zelenu masu potrebno je samljeti ili sasjeckati (Ivetić 2017.). Silos se nakon punjenja treba što prije zatvoriti kako bi se postigli anaerobni uvjeti (najkasnije unutar 12 – 24 sata). Ukoliko se silos ne zatvori neposredno nakon punjenja, nastavlja se respiracija biljne mase i njezino zagrijavanje čime se povećavaju gubici hranjivih tvari i površinsko kvarenje biljnog materijala (McDonald i sur. 1991.).

Kod pripreme silaže lucerne, preporučeni udio suhe tvari biljke iznosi oko 350 g/kg, što omogućuje dobro zbijanje u silosu i veći stupanj fermentacije. Siliranje pri višem udjelu vlage dovodi do produžene fermentacije, a zbog toga i do pretjerane razgradnje proteina i gubitka energije (Ivetić 2017.). Ukoliko je udio vlage previsok, dolazi do fermentacije klostridija koje proizvode veće količine maslačne kiseline i amonijskog dušika. S druge strane, siliranje pri preniskom sadržaju vlage biljke može prouzročiti aerobno nestabilnu silažu s većim količinama plijesni, kvasaca i bakterija roda *Bacillus* spp. zbog smanjenog udjela organskih kiselina koje

inhibiraju njihov rast (Kung i sur. 2018.). Intenzitet fermentacije ovisi o svojstvima biljnog materijala kao što je sadržaj suhe tvari, puferni kapacitet, sadržaj vodotopljivih šećera (Vranić 2012.). Sadržaj vodotopljivih šećera ukazuje na količinu supstrata prisutnog u zelenoj masi koji je na dispoziciji BMK za proizvodnju kiselina u silaži. Biljke većeg pufernog kapaciteta kao što je lucerna, iziskuju veću proizvodnju kiseline kako bi se snizila pH vrijednost u silaži u odnosu na biljke nižeg pufernog kapaciteta (McDonald i sur. 1991.).

Ukoliko u silaži nisu osigurani optimalni uvjeti, dolazi do aktivnosti kvasaca, plijesni, aerobnih bakterija i ostalih nepoželjnih mikroorganizama čime dolazi do velikih gubitaka hranjivih tvari silaže (Kung Jr i sur. 2003.). Međutim, brzom uspostavom anaerobnih uvjeta brzo kreće aktivna faza ili faza fermentacije u kojoj dolazi do proizvodnje kiselina i pada pH te konzerviranja zelene mase i inhibicije nepoželjnih mikroorganizama. Siliranje se može podijeliti u četiri osnovne faze (McDonald i sur. 1991.):

1. Aerobna faza
2. Faza fermentacije ili aktivna faza
3. Stabilna faza
4. Faza izuzimanja silaže



Slika 2.1. Shematski prikaz faza u procesu pripreme silaža (korištene kratice: bakterije mliječne kiseline (BMK), mikroorganizmi (MO), mliječna kiselina (MK), hlapljive masne kiseline (HMK))

2.1.1. Aerobna faza

Aerobna faza je prva faza u procesu pripreme silaža. Ova faza nastupa neposredno nakon punjenja i zatvaranja silosa. U ovoj fazi kisik je još uvijek prisutan u zelenoj masi što omogućava aktivnost aerobnih i fakultativno anaerobnih mikroorganizama kao što su kvasci, plijesni i enterobakterije (McDonald i sur. 1991.). Ako je aktivnost ovih nepoželjnih mikroorganizama i enzima biljke preduga, dolazi do neželjene razgradnje hranjivih tvari i oslobađanja vode i ugljikovog dioksida te posljedično do dizanja temperature u silosu i zagrijavanja silaže (Kung i sur. 2018.). Važno je naglasiti, ukoliko je temperatura u silosu ≥ 50 °C dolazi do pojave Maillardovih reakcija koje utječu na probavljivost proteina (Muck i sur. 2003.). Zbog toga, prilikom sabijanja zelene mase treba obratiti pažnju na to da je kisik

maksimalno istisnut kako bi sam proces aktivne faze siliranja ili fermentacije mogao što prije započeti. Ukoliko je sabijanje zelene mase bilo adekvatno provedeno, aerobne bakterije troše kisik do najviše 6 sati nakon zatvaranja silaža. Nakon toga započinje fermentacija koja podrazumijeva postizanje anaerobnih uvjeta (McDonald i sur. 1991., Leto 2015., Galić 2020.).

2.1.2. Faza fermentacije

Faza fermentacije ili aktivna faza siliranja započinje nakon uspostave anaerobnih uvjeta u zelenoj masi te traje do otprilike 3 tjedna ili čak 2 – 3 mjeseca od zatvaranja silaža. Vremensko trajanje ove faze definirano je brzinom sinteze mliječne kiseline i uspostavom kiselih uvjeta (McDonald i sur. 1991.). Tip i kvaliteta fermentacije ovisi o mikroorganizmima koji dominiraju fermentacijom te karakteristikama zelene mase kao što su količina vlage, količina ugljikohidrata topljivih u vodi i puferni kapacitet (Kung i sur. 2018.). Najvažniji mikroorganizmi u ovoj fazi, ali i u cijelom procesu siliranja su BMK. Ove bakterije koriste lako dostupne topljive ugljikohidrate s naglaskom na glukozu, fruktozi i saharozu te oligosahidima kako bi proizvele mliječnu kiselinu i time snizile pH (McDonald i sur. 1991.). Osim mliječne, BMK mogu proizvesti i HMK – octenu i propionsku kiselinu te etanol što ovisi o tipu BMK i tipu fermentacije (McDonald i sur. 1991., Muck i sur. 2018.). Neke BMK mogu proizvesti i izomaslačnu kiselinu u malim količinama (Suzzi i sur. 1990.).

Uspostavljeni nizak pH i kiseli uvjeti inhibiraju aktivnost nepoželjnih mikroorganizama kao što su klostridije te u konačnici omogućuju dobivanje stabilne silaže (McDonalds i sur. 1991.). S druge strane, ukoliko pH vrijednost dovoljno brzo ne padne i ne postignu se kiseli uvjeti ($\text{pH} > 5$) mikroorganizmi kao što su klostridije, pa čak enterobakterije i kvasci mogu preživjeti. Njihovo prisustvo u silažama je nepoželjno obzirom da su oni u kompeticiji s BMK za hranjivim supstratom. Oni smanjuju mogućnost proizvodnje stabilne silaže te također smanjuju nutritivnu vrijednost silaže uslijed nekontrolirane mikrobiološke aktivnosti i potrošnje hranjivih tvari (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). Međutim, kada BMK proizvedu dovoljnu količinu mliječne kiseline i uspostave se kiseli uvjeti, može započeti treća faza siliranja, stabilna faza.

2.1.2.1. Produkti fermentacije – kiseline i alkoholi

Glavna kiselina u dobro siliranoj zelenoj masi trebala bi biti mliječna kiselina (20 – 40 g/kg ST u silaži lucerne sadržaja ST 450 – 550 g/kg; Kung i sur. 2018.). Sintaza ove kiseline najvažnija je za stvaranje kiselih uvjeta, pad pH i konzerviranje (McDonald i sur. 1991.). Nizak pH osigurava nepovoljne uvjete za klostridije i enterobakterije te se time postiže veće očuvanje ST i veća nutritivna vrijednost silaže (Kung Jr 2010a.).

Druga kiselina po važnosti u silažama je octena kiselina te se sadržaj ove kiseline u silažama kreće od 10 do 30 g/kg ST, a u silaži lucerne 5 – 20 g/kg ST (Kung i sur. 2018.). Ova kiselina ima snažno antifungalno djelovanje, ona inhibira rast kvasaca, pa samim time utječe i na aerobnu stabilnost prilikom otvaranja silaža i ulaska zraka (Wilkinson i Davies 2013.). Visoki

sadržaj octene kiseline ($> 40 - 60$ g/kg ST) može se naći u izrazito vlažnim silažama (ST < 300 g/kg) kojima dominira aktivnost enterobakterija, klostridija i heterofermentativnih BMK (Kung i sur. 2018.).

Propionska kiselina u silažama uglavnom je u minimalnim količinama (do 1 g/kg ST u silaži lucerne ST 450 – 550 g/kg), ali je često i ispod praga detekcije u suhim silažama (Kung i sur. 2018.). Ukoliko se koriste kemijski dodaci s propionskom kiselinom ili inokulanti koji sintetiziraju propionsku kiselinu, ona može, kao i octena kiselina, pozitivno utjecati na aerobnu stabilnost (Wilkinson i Davies 2013.). Maslačna kiselina ne bi smjela biti prisutna u dobro siliranoj silaži lucerne, ali se tolerira sadržaj do 1 – 2 g/kg ST u vlažnijim silažama. Visoki sadržaj maslačne kiseline u silažama (> 2 g/kg ST) ukazuje na aktivnost klostridija (McDonald i sur. 1991.).

Etanol je najčešći alkohol kojeg pronalazimo u silažama s obzirom da ga veliki broj mikroorganizama može proizvesti; heterofermentativne BMK, enterobakterije i kvasci (Kung i sur. 2018.). Ukoliko je silaža lucerne kvalitetna, njegov sadržaj je od 5 – 15 g/kg ST. Konzumirani etanol iz silaža u buragu fermentira do octene kiseline gdje služi kao izvor energije preživačima (Kung i sur. 2018.). Visoke vrijednosti etanola ($> 30 - 40$ g/kg ST) upućuju da je došlo do umnažanja velikog broja kvasaca i takve silaže podložne su brzom aerobnom kvarenju nakon otvaranja silaže (Wilkinson i Davies 2013.). Dodatno, visoke koncentracije etanola mogu za rezultat imati neobičan okus mlijeka životinja hranjenih s takvom silažom, ali i izrazito rijetko dovesti do intoksikacije životinja (Kung i sur. 2018.).

Osim etanola, alkoholi koji se u silažama mogu pronaći u malim količinama su metanol, propan-1,2-diol i propanol. Metanol ima sposobnost pretvorbe u metan u buragu te služi kao izvor energije za mikroorganizme, dok se propan-1,2-diol konvertira u glukozu u jetri te služi kao izvor energije za kravu, a propanol smanjuje postotak mliječne masti i mliječne kiseline, ali ne i ukupnu proizvodnju mlijeka kod krava (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.).

2.1.3. Stabilna faza

Stabilna faza započinje nakon uspostave kiselih uvjeta u silaži (pH $< 4,5$). Ova faza može dugo trajati, a u praksi najčešće traje do izuzimanja (aeracije) silaža (Leto 2015.). U stabilnoj fazi ukoliko su zadovoljeni anaerobni uvjeti i nizak pH, pretpostavljaju se minimalne promjene u sadržaju i kvaliteti silaža (Weinberg i Muck 1996.) iako noviji radovi pokazuju da mikrobiološka aktivnost nikada ne staje već se usporava (Kung i sur. 2018.).

2.1.4. Faza izuzimanja

Faza izuzimanja je završna faza koja započinje nakon otvaranja silosa. Otvaranjem zrak, a samim time i kisik, prodire u silažu do dubine oko 1 metar te time potiče rast i umnažanje nepoželjnih mikroorganizama kao što su kvasci i plijesni (Leto 2015.). Mikrobiološka aktivnost aerobnih mikroorganizama povisuje temperaturu silaže i dovodi do gubitaka ST. Kvasci su prvi

mikroorganizmi koji započinju kvarenje silaže jer metaboliziraju mliječnu kiselinu čime dolazi do porasta pH vrijednosti. Ovime nastaju pogodni uvjeti za rast drugih nepoželjnih mikroorganizama – plijesni (Wilkinson i Davies 2013.). Kontrola aktivnosti kvasaca tijekom faze izuzimanja jedan je od najvažnijih parametara kvalitete silaža. Produkti fermentacije BMK, octena i propionska kiselina, inhibiraju aktivnost kvasaca čime daju aerobno stabilnu silažu (Wilkinson i Davies 2013.).

2.2. Aerobna stabilnost silaža i mikroorganizmi kvarenja silaža

Prilikom otvaranja silosa i izlaganja kisiku, aerobni mikroorganizmi (bakterije, plijesni i kvasci) u silaži počinju rasti. Kvasci su prvi mikroorganizmi koji će potaknuti kvarenje silaže (Ranjit i Kung 2000.). Prema McDonald i sur. (1991.), stabilna silaža je ona u kojoj je broj kvasaca do $12 \log_{10}$ CFU/g tri dana nakon otvaranja silaže i kontakta s kisikom. Aktivnošću kvasaca i porastom pH stvaraju se optimalni uvjeti za rast drugih nepoželjnih aerobnih mikroorganizama, primarno plijesni. Aerobni mikroorganizmi razgrađuju hranjive tvari silirane mase te uzrokuju porast temperature i kvarenje silaže (McDonald i sur. 1991.). Povećanje temperature pod utjecajem je mikrobiološke oksidacije kiselina i vodotopljivih ugljikohidrata u ugljikov dioksid i vodu (Ranjit i Kung 2000.). Ovisno o tipu silaže proces kvarenja može početi već nekoliko sati nakon otvaranja, dok u drugim silažama aerobna stabilnost može trajati tjednima (McDonald i sur. 1991.). Kvarenje silaže može uzrokovati gubitak ST i do 30 % (Dawson i sur. 1998.).

Aerobna stabilnost je termin koji se definira kao vremenski period nakon otvaranja silaža u kojem temperatura u silažnoj masi nije viša od 2 °C (Kung i Ranjit 2001., Kung Jr 2010b.) odnosno 3 °C (DLG 2018.) u odnosu na okolišnu temperaturu. Porast temperature u silažama rezultat je aktivnosti štetnih aerobnih mikroorganizama i razgradnje hranjivih tvari (Wilkinson i Davies 2013.). Ona je pod utjecajem različitih faktora, a neki od najvažnijih su: postotak suhe tvari, sabijenost silaže, prisutnost kisika, korištenje inokulanata, kvaliteta fermentacije i drugo. Porast temperature veći je u krmivima s višim udjelom ST, budući da je potrebno više topline za povećanje temperature krmiva s većim udjelom vlage od krmiva s manjim udjelom vlage ali su istovremeno voluminoze s većom ST manje podložne kvarenju jer aktivnost mikroorganizama ovisi o aktivitetu vode koji je veći u vlažnijim silažama (McDonald i sur. 1991.). Veća sabijenost zelene mase smanjuje mogućnost prodiranja kisika u silažu te povećava aerobnu stabilnost (Borreani i sur. 2018.). Isto tako, danas se koriste različiti inokulanti koji povećavaju aerobnu stabilnost kroz inhibiciju rasta nepoželjnih mikroorganizama. Takvi inokulanti proizvode kiseline koje inhibiraju aktivnost kvasaca – prvih mikroorganizama aerobnog kvarenja silaža (Wilkinson i Davies 2013.). Nakon kvasaca, nepoželjni mikroorganizmi koji se mogu javiti u nestabilnim silažama su plijesni. Prisutnost plijesni uzrokuje veliki gubitak suhe tvari kao i smanjenu palatabilnost kod životinja (McDonald i sur. 1991., Weinberg i Muck 1996., Wilkinson i Davies 2013.). Neke plijesni imaju sposobnost proizvodnje sekundarnih metabolita, mikotoksina, koji imaju vrlo negativan utjecaj na organizam i zdravlje životinje (Ogunade i sur. 2018.). Zbog navedenog, vrlo je važno da silaža bude što duže aerobno stabilna te se danas najčešće koriste aditivi koji to pospješuju.

Octena kiselina najvažnija je kiselina kada se govori o aerobnoj stabilnosti zbog snažnog antifungalnog djelovanja (Wilkinson i Davies 2013.). Primjerice, povećanje sadržaja octene kiseline u silaži kukuruza za 20 g/kg ST povećava aerobnu stabilnost silaže za 9 sati, a povećanje za 40 g/kg ST za čak 56 sati (Danner i sur. 2003.). Propionska i maslačna kiselina također pozitivno djeluju na aerobnu stabilnost, no važno je naglasiti kako povećani sadržaj maslačne kiseline upućuje na negativnu aktivnost klostridija u silažama (McDonald i sur. 1991.). Klostridije su anaerobne bakterije koje dovode do velikih gubitaka ST, lošije nutritivne vrijednosti i upitne zdravstvene vrijednosti silaža uslijed proizvodnje biogenih amina (McDonald i sur. 1991.).

2.3. Inokulanti u silaži lucerne

Dodaci ili aditivi u silaži koriste se kako bi osigurali dominaciju BMK tijekom fermentacije. Dominacijom BMK se osigurava optimalno konzerviranje zelene mase kao i poboljšana kvaliteta silaže (Vranić 2012.). Da bi koristili aditiv u proizvodnji silaža, on mora imati određene karakteristike: sigurnost i lagana uporaba, pozitivan efekt na konzerviranje, nutritivnu vrijednost i aerobnu stabilnost silaže te ne smije biti štetan za životinju i njen metabolizam (McDonald i sur. 1991, Duvnjak 2016.). U proizvodnji silaža moguće je koristiti kemijske i biološke aditive ukoliko su uvjeti pri siliranju suboptimalni. Biološki aditivi podrazumijevaju bakterijske inokulante koji su najčešći aditivi (Muck i sur. 2018.) te enzime (Weinberg i Muck 1996.). Razlozi tolike rasprostranjenosti bakterijskih inokulanata su: njihova sigurnost za okoliš, jednostavna aplikacija, nekorozivno djelovanje na strojeve te prirodno podrijetlo. Inokulanti koji se najčešće koriste u proizvodnji silaža su određeni sojevi BMK (Filya i sur. 2007.).

S obzirom na tip fermentacije i sintezu proizvoda, BMK se dijele u dvije kategorije: homofermentativne BMK i heterofermentativne BMK uz dodatne sub-podjele na fakultativno heterofermentativne i obligatorno heterofermentativne BMK – ovisno o supstratima za fermentaciju (McDonald i sur. 1991.). Dodatak inokulanata baziranih na BMK omogućuje brzu fermentaciju vodotopljivih šećera pri čemu se proizvodi primarno mliječna kiselina ukoliko se radi o homofermentativnim ili fakultativno heterofermentativnim sojevima BMK. Homofermentativne (fakultativno heterofermentativne) BMK kao što je *Lactiplantibacillus plantarum* fermentiraju heksoze i pentoze do mliječne kiseline. Neke od karakteristika silaža tretiranih s homofermentativnim BMK su: niža pH vrijednost, niži sadržaj octene, propionske i maslačne kiseline, ali viši sadržaj mliječne kiseline i manji gubitak ST u usporedbi s netretiranim silažama (Muck i sur. 2018.). S druge strane, heterofermentativne (obligatorno heterofermentativne) BMK, npr. *Lentilactobacillus buchneri*, fermentiraju heksoze i pentoze te proizvode mliječnu kiselinu u manjoj količini jer proizvode dodatno octenu i propionsku kiselinu, etanol i ugljikov dioksid (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018., Muck i sur. 2018.). Proizvodnja HMK vrlo je važna kako bi se postigla što duža aerobna stabilnost nakon otvaranja silaže (Wilkinson i Davies 2013.). Tako je danas, uz poznavanje karakteristika homofermentativnih kao i heterofermentativnih BMK, važna njihova kombinacija kako bi se postigli što idealniji uvjeti u siliranoj masi (Kung Jr 2010a.). Osim tipa sojeva BMK koji se

koriste za siliranje, koncentracija inokulanta također je važna. Novija velika meta analiza upotrebe inokulanata navodi pozitivan utjecaj povećanja koncentracije inokulanta na kvalitetu silaža, no ona ne uzima u obzir uvećanje koncentracije istog inokulanta (Irawan i sur. 2021.).

Homofermentativne BMK često se kombiniraju s heterofermentativnim BMK radi postizanja brzog pada pH kao i duže aerobne stabilnosti. Tako se uz kombinaciju homofermentativne *Pediococcus pentosaceus* mogu koristiti heterofermentativne BMK, *Lentilactobacillus bucheri* i *Lentilactobacillus hilgardii* (Drouin i sur. 2022.). *Lentilactobacillus bucheri* spada u skupinu obligatornih heterofermentativnih BMK te se koristi za postizanje veće aerobne stabilnosti silaža (Kung i Rajnit 2001.). Ova bakterija ima mogućnost proizvodnje propan-1,2-diola koji nastaje prilikom konverzije mliječne kiseline u octenu kiselinu (Kung i Ranjit 2001., Kung i sur. 2018., Selwet 2020.). *Lentilactobacillus hilgardii* isto se ubraja u skupinu obligatornih heterofermentativnih BMK te ju najčešće primjenjujemo kao inokulant zajedno s *Lentilactobacillus buchneri* (Drouin i sur. 2022.). Istraživanja pokazuju kako upotreba inokulanta koji je kombinacija *Lentilactobacillus buchneri* i *Lentilactobacillus hilgardii* ima pozitivan utjecaj na proizvodnju antifungalnih spojeva te aerobnu stabilnost silaža (Kung i sur. 2018., Muck i sur. 2018.).

3. Materijali i metode

3.1. Priprema silaže

Zelena masa lucerne korištena za pripremu silaža uzgojena je u proljeće 2022. godine u blizini izlaza Rugvica, autoput Zagreb-Lipik. Lucerna je bila pokošena i sasjeckana na kombajn sjeckalici u fazi ranog pupanja (drugi porast; ST zelene mase oko 470 g/kg) te je bila odvojena u četiri dijela na koja su bila aplicirana četiri različita tretmana (slika 3.1.).

- Tretman 1: kontrola na koju nije apliciran inokulant već je bila aplicirana destilirana voda u istoj količini koja je bila korištena za pripremu inokulanta BMK (aplikacija 10 mL radne otopine po kg zelene mase).
- Tretman 2: standardna koncentracija inokulanta, odnosno koncentracija preporučena od strane proizvođača (2 g/t svježe mase)
- Tretman 3: koncentracija inokulanta uvećana za 50 % od standardne, odnosno inokulant u 1,5x većoj koncentraciji od preporučene od strane proizvođača (3 g/t svježe mase)
- Tretman 4: koncentracija inokulanta uvećana za 100 % od standardne, odnosno inokulant u 2x većoj koncentraciji od preporučene od strane proizvođača (4 g/t svježe mase)

Upotrijebljeni inokulant je kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih BMK: *Pediococcus pentosaceus* (homofermentativni soj; $\geq 5,00 \times 10^{10}$ CFU/g) te *Lentilactobacillus buchneri* i *Lentilactobacillus hilgardii* (heterofermentativni sojevi; $\geq 7,5 \times 10^{10}$ CFU/g). Specifikacije korištenog inokulanta (ime i proizvođač) dio su industrijske tajne proizvođača budući da je upotrijebljeni inokulant dio razvojnog istraživanja. Radne otopine za aplikaciju bile su pripremljene prema uputama proizvođača, ali uz korekciju odvaga inokulanta ovisno o pojedinoj koncentraciji (preporučena, 1,5x veća od preporučene i 2x veća od preporučene).



Slika 3.1. Priprema lucerne za siliranje

Tako pripremljena zelena masa lucerne bila je silirana u vakuum vrećicama (280x360mm, SmartVac, Status do.o.o) na uređaju za vakumiranje i varenje (SmartVac, Status d.o.o.), za svaki tretman u peteroplikatu. Vakumiranje vrećica provodi se s ciljem uklanjanja kisika te inhibicije prve aerobne faze siliranja, kako bi što prije započela aktivna faza siliranja – faza fermentacije (McDonald i sur. 1991.). Tijekom siliranja, silaže su skladištene na sobnoj temperaturi od 20 °C do 25 °C. Nakon 4 mjeseca (124. dan) stajanja silaže su otvorene te je svaki uzorak silaže pripremljen za određivanje aerobne stabilnosti. Čuvanje silaže te provođenje kemijskih analiza odrađeno je u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet dok su mikrobiološke analize odrađene u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane za životinje, Hrvatski veterinarski institut Zagreb.



Slika 3.2. Siliranje u vakuum vrećicama

3.2. Aerobna stabilnost silaža

Nakon stajanja 124 dana i otvaranja, oko 500 g svake silaže bilo je izvagano u staklene posude u kojima se odredila aerobna stabilnost. Svaki tretman bio je aeriran u peteroplikatu, osim jedne repeticije u tretmanu 2 jer nije bilo dovoljno uzorka. Za određivanje aerobne stabilnosti, u svakoj posudi sa silažama postavljena je temperaturna sonda. Ukupno je bilo 19 posuda s 19 sondi; 5 za tretman 1, 4 za tretman 2, 5 za tretman 3 i 5 za tretman 4 te jedna sonda koja je bilježila sobnu temperaturu. Sonde su davale očitavanje svakih 15 minuta putem mobilne aplikacije Fleettracer (Telematrix d.o.o. Zagreb, Hrvatska). Temperatura je očitavana tokom 7 dana jer je to prosjek za aerobnu stabilnost silaža (Wilkinson i Davies 2013.). Za vrijeme određivanja aerobne stabilnosti, sve su silaže bile pokriveno medicinskom gazom kako bi uzorci bili izloženi zraku. Kako su mase uzorka za mjerenje aerobnu stabilnost bile niske (oko 500 g), svi uzorci silaža tijekom aeracije držani su zajedno u istoj kutiji od stiropora kako bi smanjili utjecaj vanjske temperature na silaže.

Za određivanje promjena sadržaja šećera, kiselina, alkohola i mikrobioloških parametara 0., 3. i 7. dana aeracije uzeto je 30 g uzorka aerirane silaže u duplikatu. Prvi duplikat svakog uzorka bio je zamrznut na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do kemijskih analiza sadržaja šećera (glukoza, fruktoza), kiselina (mliječna, octena, propionska, izomaslačna i maslačna kiselina) te alkohola (etanol, metanol i propanol) dok je drugi poslan na Hrvatski veterinarski institut u temperiranim kutijama radi mikrobioloških analiza. Ukupno je uzorkovano 114 uzoraka silaže lucerne. Odnosno, u periodu od 7 dana kontrolirane aeracije 0., 3. i 7. dan uzorkovano je 19 uzoraka svake silaže u duplikatu

(5x2 za tretman 1, 4x2 za tretman 2, 5x2 za tretman 3 i 5x2 za tretman 4). Nakon svakog uzorkovanja, preostala silaža lucerne ostavljena je na daljnjoj aeraciji u staklenim posudama s medicinskom gazom.



Slika 3.2.1. Uzorci u staklenim posudama s temperaturnim sondama prekriveni medicinskom gazom

3.3. Kemijske analize silaža

Uzorci aeriranih silaža lucerne prije analiza temperirani su na 4 °C. Svaki uzorak silaže bio je podijeljen na dva dijela te je jedan dio korišten za pripremu vodenog ekstrakta za određivanje sadržaja šećera, kiselina i alkohola dok je drugi služio za određivanje ST. Određivanje suhe tvari je provedeno jer su sve vrijednosti analita izražene na ST. Suha tvar je bila određena sušenjem uzoraka u sušioniku UFE 400 (Mettler, Njemačka) na 103 °C tijekom 24 sata prema normi HRN ISO 6496:2001 DZNM 2001.). Udio vlage u uzorku izračunat je iz odnosa mase uzoraka prije i poslije sušenja.



Slika 3.3.1. Određivanje suhe tvari

Za pripremu vodenog ekstrakta korištena je modifikacija metode iz Nishino i Uchida (1999.). Ukratko, 20 g svježeg uzorka zelene mase homogenizirano je u 200 mL destilirane vode. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su u hladnjaku na +4 °C/24 sata. Kako bi odvojili interferirajuće tvari koje bi mogle smetati detekciji (primarno proteine), uzorci su nakon 24 sata profiltrirani preko naboranog filter papra te je svaki filtrat dodatno profiltriran preko injekcijskog filtera (Chromafil Xtra RC-45/25; Macherey-Nagel, Švicarska). Filtrat profiltriran kroz injekcijski filter pohranjen je u Eppendorf epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka) i stavljen u zamrzivač na -20 °C do analize šećera, mliječne kiseline i HMK te alkohola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (*engl.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC).



Slika 3.3.2. Priprema vodenog ekstrakta uzorka

Modifikacijom metode za određivanje fermentacijskih produkata u silažama na HPLC-u (Canale i sur. 1984.), određeni su jednostavni šećeri (glukoza, fruktoza i saharoza), mliječna kiselina, HMK (octena, propionska, izomaslačna i maslačna kiselina) i alkoholi (metanol, etanol i propanol). Sustav za separaciju bio je sastavljen od Aminex HPX-87H kolone te su šećeri (glukoza, fruktoza) i alkoholi (metanol, etanol, propanol) kvantificirani samo na RI detektoru dok su kiseline (mliječna, octena, propionska, izomaslačna i maslačna) kvantificirane na UV-VIS (210 nm) i na RI detektoru. Svi analizirani analiti separirani su izokratnim eluiranjem na radnoj temperaturi 41 °C pri čemu je mobilna faza bila razrijeđena sulfatna kiselina (0,0025 M). Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 10 µL. U uzorcima nije detektirana saharoza kao ni alkohol propan-1,2-diol. U svrhu identifikacije i kvantitativnog određivanja ostalih analita (mliječne, octene, propionske, izomaslačne i maslačne kiseline; šećera glukoze i fruktoze; alkohola metanola, etanola i propanola) korištene su ishodne otopine točno pripremljenih koncentracija svakog standarda (Merck, Njemačka) koje su razrijeđene u definiranim omjerima. Na temelju vrijednosti očitavanja standarda, za svaki analit kreiran je baždarni pravac u 7 točaka. HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD) sastojao se od: kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) i RI detektora (RI-150). Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD).



Slika 3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

3.4. Mikrobiološka analiza silaža

Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu rađena je po metodama ISO 21527-2:2008 i ISO 21527-1:2008 za kvasce i plijesni, dok je za određivanje broja bakterija mliječne kiseline korištena ISO 15214:1998 metoda. Broj prisutnih spora maslačne kiseline (BAB) određen je metodom prema Nizozemskom standardu (NEN-ISO-6877, 1994). Za pripremu uzoraka, za određivanje broja BMK, kvasaca, plijesni i BAB, u 20 g sasjeckane silaže lucerne dodano je 180 mL puferirane peptonske vode (*engl.* *Buffered Peptone Water*) (Merck, Njemačka) i homogenizirano u plastičnoj vrećici (*engl.* *Stomacher bag*) (Bag Mixer, Interscience, Francuska) 3 minute. Tako pripremljena otopina uzorka razrijeđena je u 10 razrjeđenja, do 1:10. Svako razrjeđenje rađeno je u duplikatu, gdje je 0,1 mL alikvota štapićem ravnomjerno nanoseno na hranjivu podlogu. Za određivanje broja BMK, kvasca i plijesni, upotrijebljene su komercijalne MRS te DG18 i DRBC podloge. Inokulirane podloge DG18 i DRBC inkubirane su na 25 °C (± 1 °C) u aerobnim uvjetima tijekom 5 dana, dok su MRS podloge inkubirane na 37 °C (± 1 °C) 72 sata u semianaerobnim uvjetima. Nakon inkubacije, izbrojene su kolonije bakterija, kvasaca i plijesni te je utvrđen njihov broj u gramu uzorka (CFU/g) i preračunat na \log_{10} CFU/g. Za određivanje BAB-a, alikvot razrjeđenja (0,1 mL) dodan je epruvetama koje su sadržavale 10 mL steriliziranog mlijeka (uključujući 0,5 % glukoze i 0,18 % mliječne kiseline). Nakon toga, epruvete su zagrijane na 80 °C 5 minuta radi inaktivacije vegetativnih stanica i za poticanje germinacije spora. Epruvete su zatim zatvorene pomoću parafina i inkubirane na 37

°C 4 dana. Indikator germinacije spora u pojedinim epruветama bila je pojava plina nakon inkubacije.



Slika 3.4.1. Određivanje spora bakterija maslačne kiseline (BAB)

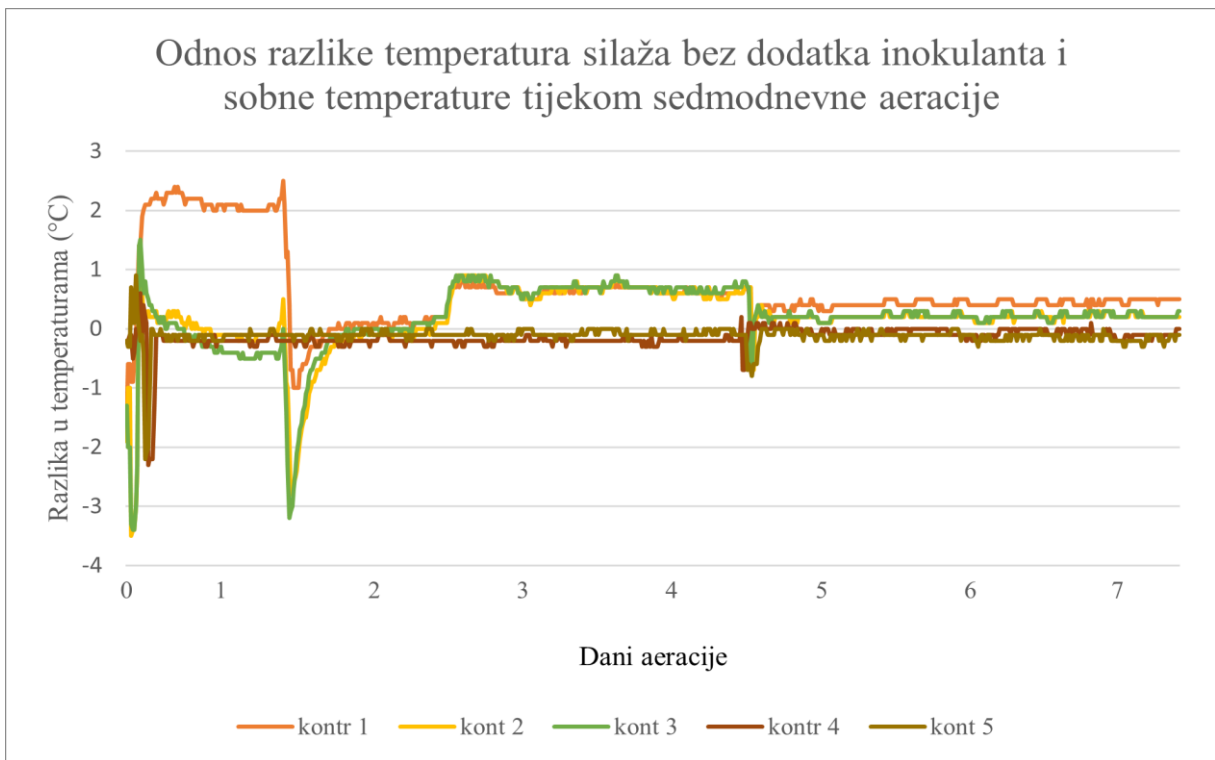
3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je statističkim paketom SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015). Razlika u sadržaju šećera (glukoza, fruktoza), kiselina (mliječna, maslačna, octena, propionska, izomaslačna i maslačna kiselina), alkohola (metanol, etanol, propanol) te u mikrobiološkoj kvaliteti (broj BMK, kvasaca, plijesni i BAB) silaža ispitana je PROC MIXED procedurom pri čemu su glavni utjecaji bili tretman i vrijeme aeracije silaža te njihova interakcija. Srednje vrijednosti bile su uspoređene i grupirane pomoću PROC PLM (Saxton, 1998.). Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$. U usporedbi temperatura očitanih s temperaturnih sonde u silažama (temperature u tretmanima 1, 2, 3 i 4) i sobne sonde (okolišna temperatura) korišten je excel (*engl.* Microsoft Office Excel).

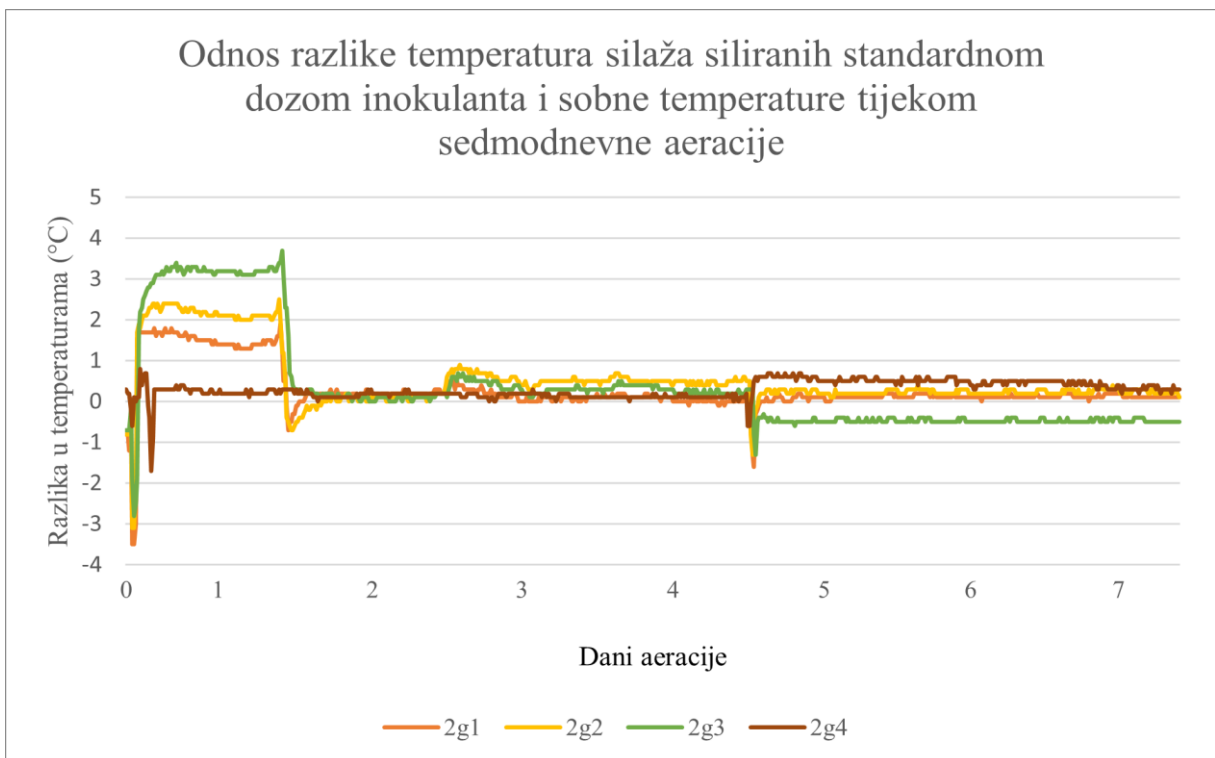
4. Rezultati i rasprava

Aerobna stabilnost varira između različitih tipova silaža, tako u nekim silažama ona može trajati samo nekoliko sati, dok kod drugih traje danima ili čak tjednima (McDonald i sur. 1991.). Silaže lucerne koje imaju nisku ST i nisku koncentraciju vodotopljivih šećera, općenito se pri izlaganju zraku i aeraciji slabije kvare od primjerice silaža žitarica, gdje dolazi do bržeg razvoja kvasaca i plijesni (Weinberg i sur. 1993.). Aerobna stabilnost silaža definira se kao vremenski period (sati ili dani) u kojem temperatura u siliranoj masi nije porasla za više od 2 °C (Kung i Ranjit 2001.) ili 3 °C (DLG 2018.) od sobne temperature.

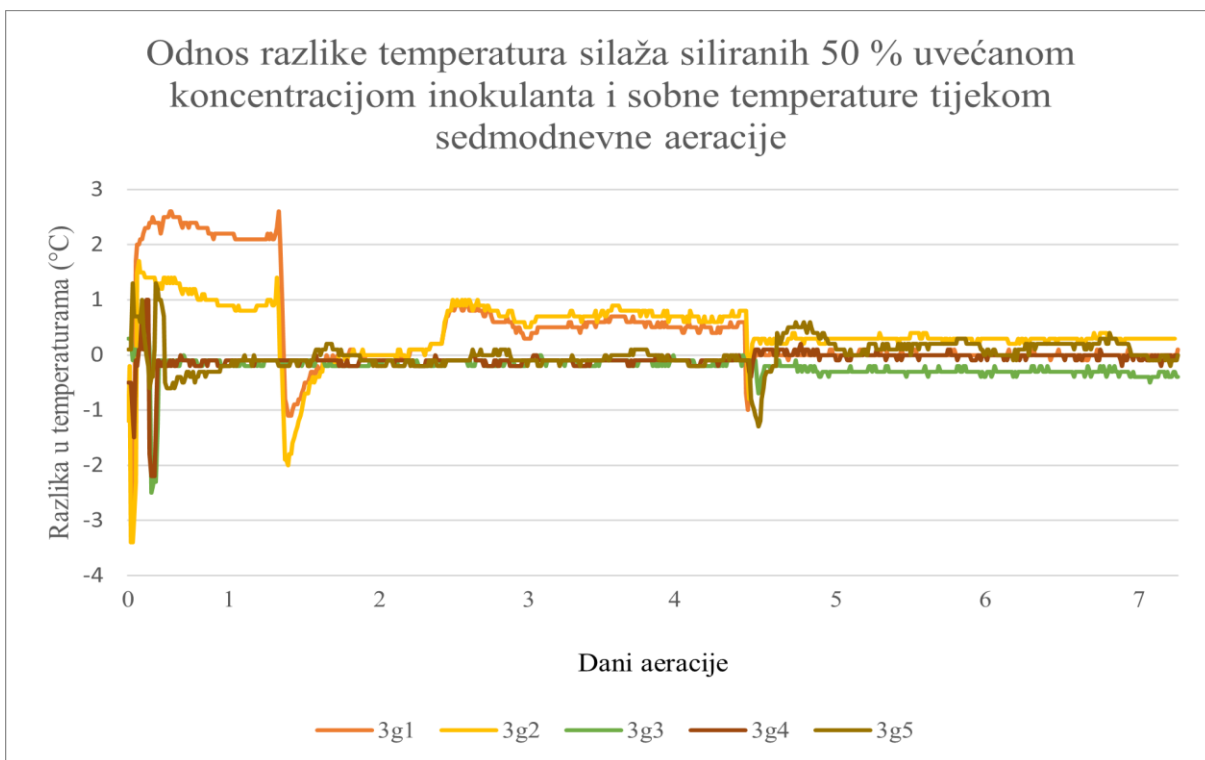
U ovom istraživanju, aerobna stabilnost bila je postignuta cijeli period aeracije s iznimkom jednog odstupanja tijekom prva dva dana aeracije (tretman 2 repeticija 3; slika 4.2.). Naime, silaže u cijelom periodu ispitivanja nisu imale rast temperature iznad 3 °C u svim tretmanima bez obzira jesu li silirane bez inokulanta (slika 4.1.) ili s inokulantom (slika 4.2., slika 4.3., slika 4.4.). U prvom danu aeracije, razlika u temperaturi kontrole iznosila je od -3 do 2,4 °C, dok je maksimalna razlika temperature postignuta u tretmanu 2 (2,4 °C). U tretmanu 4, razlika temperatura bila je najniža i to 2 °C. Najviša razlika temperature bila je kod tretmana 2 (repeticija broj 3) gdje je razlika sobne temperature i te silaže bila 3,7 °C. Nakon prva dva dana, razlike između sobne temperature i temperature kod svih testiranih silaža bile su minimalne. Odnosno, niti u jednoj silaži nije došlo do porasta temperature većeg od 3 °C, kao granice kojom se definira aerobna stabilnost prema DLG (2018.), u odnosu na sobnu temperaturu; sve silaže su ostale aerobno stabilne tijekom preostalih 5 dana (slike 4.1. – 4.4.). Istraživanje Liu i sur. (2017.) pokazuje kako je najniža aerobna stabilnost kod silaža tretiranih s homofermentativnim inokulantom (*Lactiplantibacillus plantarum*), gdje silaža postaje nestabilna u manje od 134 sati. Slično navedenom, Pahlow i sur. (2001.) su ispitivali aerobnu stabilnost 264 silaža lucerne te su utvrdili kako su sve silaže lucerne stabilne prilikom aeracije minimalno 96 sati (4 dana) te kako je 89 % silaža stabilno još narednih 3 dana odnosno 168 sati (7 dana) nakon aeracije. Ovo istraživanje pokazalo je slične rezultate gdje su sve silaže lucerne bile stabilne 7 dana (slike 4.1.– 4.4.). Muck i Kung (1997.) navode kako korištenje inokulanta u proizvodnji silaža ne povećava aerobnu stabilnost u manje od 30 % slučajeva te kako postoje slučajevi gdje BMK smanjuju aerobnu stabilnost. U silažama siliranim s homofermentativnim BMK gdje je smanjena sinteza antifungalnih kiselina, octene i propionske kiseline, česta je niža aerobna stabilnost (Wilkinson i Davies 2013.).



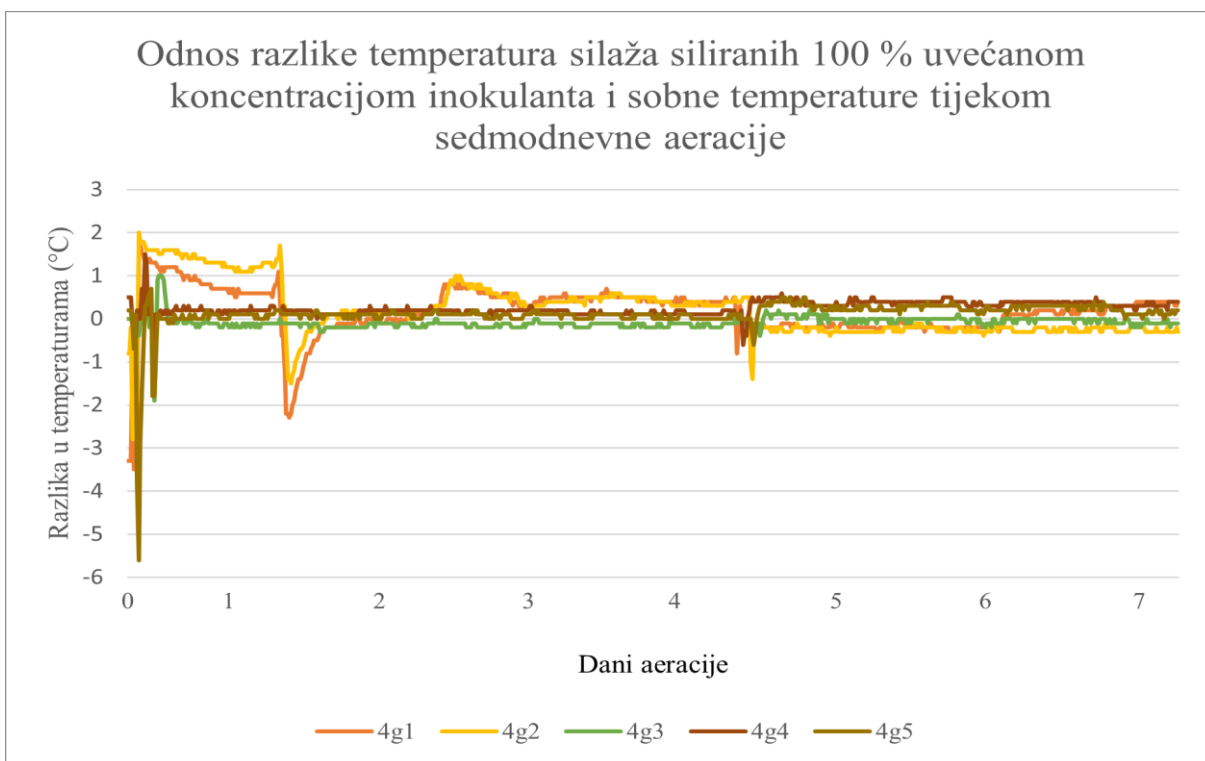
Slika 4.1. Grafikon razlike između temperatura uzoraka bez dodatka inokulanta i sobne temperature tijekom 7-dnevnog razdoblja aeracije



Slika 4.2. Grafikon razlike između temperatura uzoraka tretmana 2 (standardna koncentracija inokulanta preporučena od strane proizvođača (2 g/t svježe mase)) i sobne temperature



Slika 4.3. Grafikon razlike između temperatura uzoraka tretmana 3 (standardna koncentracija inokulanta uvećana za 50 % (3 g/t svježe mase)) i sobne temperature



Slika 4.4. Grafikon razlike između temperatura uzoraka tretmana 4 (standardna koncentracija inokulanta uvećana za 100 % (4 g/t svježe mase)) i sobne temperature

4.1. Utjecaj dodatka inokulanta i vremena aeracije te njihove interakcije na promjene šećera, kiselina i alkohola te mikrobiološku kvalitetu silaža tijekom sedmodnevne aeracije

Osim promjene temperature koja predstavlja glavni parametar u procjeni aerobne stabilnosti silaže, u ovom istraživanju praćen je i utjecaj različitih koncentracija inokulanta na mikrobiološke karakteristike silaže (broj BMK, kvasaca, plijesni i BAB) te na promjene sadržaja šećera (fruktoza, glukoza), kiselina (mliječna, octena, propionska, izomaslačna i maslačna) te alkohola (metanol, etanol, propanol) tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne. Osim navedenog, ispitana je i interakcija različitih koncentracija inokulanta i vremena aeracije na promjene sadržaja navedenih šećera, kiselina i alkohola te na mikrobiološku kvalitetu silaža. Statistička značajnost utvrđena je ukoliko je $P \leq 0,05$.

Inokulanti se u proizvodnji silaža koriste kako bi usmjerili fermentaciju, ovisno radi li se o homofermentativnim BMK ili heterofermentativnim BMK. Ukoliko se radi o homofermentativnim BMK, primarni produkt fermentacije biti će mliječna kiselina dok su produkti heterofermentativne fermentacije mliječna i octena kiselina te etanol i CO₂ (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018., Muck i sur. 2018.). Octena i propionska kiselina imaju važan utjecaj na aerobnu stabilnost silaža jer inhibiraju kvasce, prve mikroorganizme aerobnog kvarenja silaža (Wilkinson i Davies 2013.). Rezultati utjecaja dodatka različitih koncentracija inokulanta pri siliranju i vremena aeracije te njihovih interakcija na promjene fermentacijskih parametara prikazani su u tablici 4.1.1. dok su promjene mikrobioloških parametara prikazane u tablici 4.1.2. Iz tablice 4.1.1. vidljivo je kako je tretman (dodatak različitih koncentracija inokulanta) imao statistički značajan utjecaj na sve supstrate kao i na fermentacijske parametre s iznimkom propanola ($P = 0,085$), dok je vrijeme aeracije imalo statistički značajan utjecaj na sve alkohole ($P < 0,001$; metanol, etanol, propanol) i octenu kiselinu ($P = 0,003$) te fruktozu ($P < 0,001$). Interakcija tretmana i vremena imala je statistički značajan utjecaj na sadržaj fruktoze ($P < 0,001$), propionske kiseline ($P = 0,032$), etanola ($P < 0,001$) i propanola ($P = 0,014$).

Iz tablice 4.1.2. vidljivo je kako je tretman imao statistički značajan utjecaj na sve parametre mikrobiološke kvalitete ($P < 0,001$ broj BMK i plijesni; $P = 0,009$ broj BAB) s iznimkom ukupnog broja kvasaca ($P = 0,311$). Vrijeme aeracije imalo je statistički značajan utjecaj samo na ukupan broj BAB ($P = 0,003$) dok interakcija tretmana i vremena aeracije nije imala statistički značajan utjecaj niti na jedan parametar mikrobiološke kvalitete.

Tablica 4.1.1. Utjecaj dodatka inokulanta (trt) i vremena aeracije (v) te njihovih interakcija (trt^xv) na promjene sadržaja glukoze, fruktoze, mliječne kiseline, octene kiseline, propionske kiseline, maslačne kiseline, izomaslačne kiseline, metanola, etanola i propanola u silažama lucerne

P	GLC	FRU	LA	AA	PA	IBA	BA	MtOH	EtOH	PrOH
Tretman (trt)	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	0,030	<0,001	0,006	0,001	0,085
Vrijeme (v)	0,260	<0,001	0,569	0,003	0,217	0,173	0,609	<0,001	<0,001	<0,001
trt ^x v	0,619	<0,001	0,561	0,312	0,032	0,196	0,062	0,335	<0,001	0,014

(GLC – glukoza; FRU – fruktoza; LA – mliječna kiselina; AA – octena kiselina; PA – propionska kiselina; IBA, – izomaslačna kiselina; BA – maslačna kiselina; MtOH – metanol; EtOH – etanol; PrOH – propanol)

Tablica 4.1.2. Utjecaj dodatka inokulanta (trt) i vremena aeracije (v) te njihovih interakcija (trt^xv) na promjene broja bakterija mliječne kiseline, kvasaca, plijesni i spora maslačne kiseline

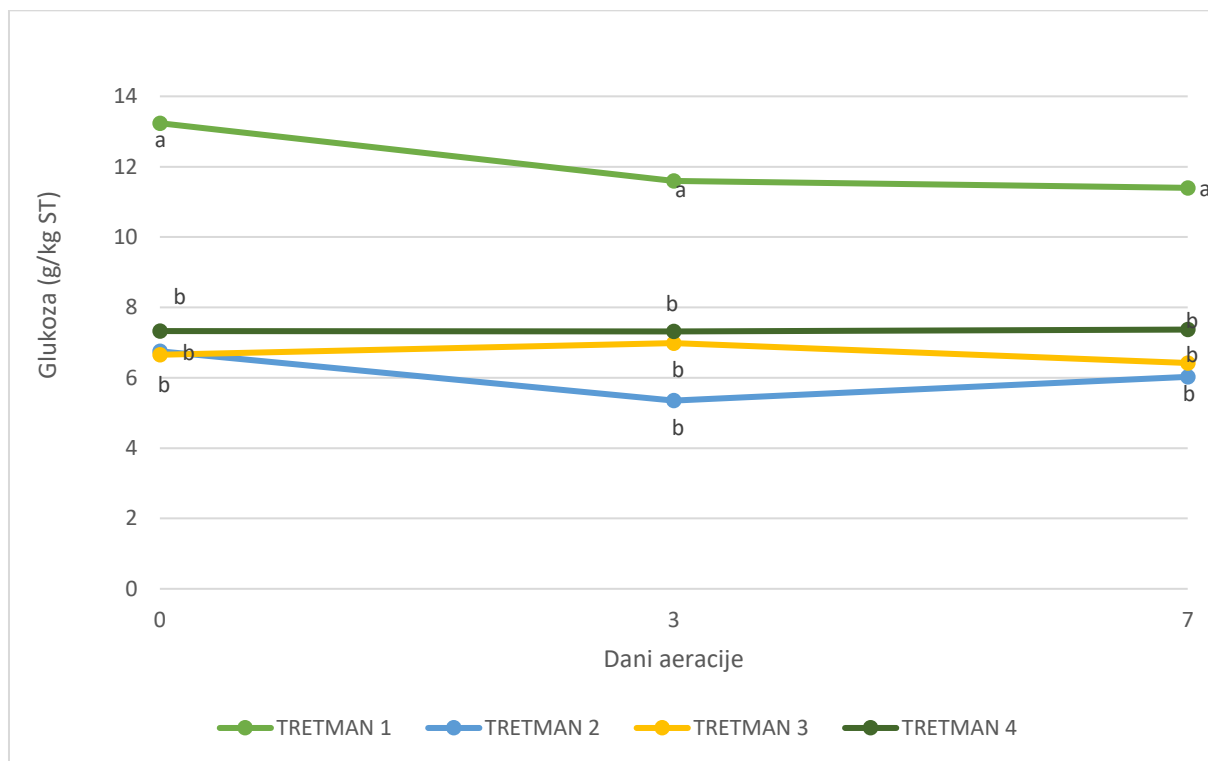
P	BMK	UBK	UBP	BAB
Tretman (trt)	<0,001	0,311	<0,001	0,009
Vrijeme (v)	0,605	0,378	0,166	0,003
trt ^x v	0,619	0,103	0,878	0,135

(BMK – ukupan broj bakterija mliječne kiseline; UBK – ukupan broj kvasaca; UBP – ukupan broj plijesni; BAB – ukupan broj spora bakterija maslačne kiseline)

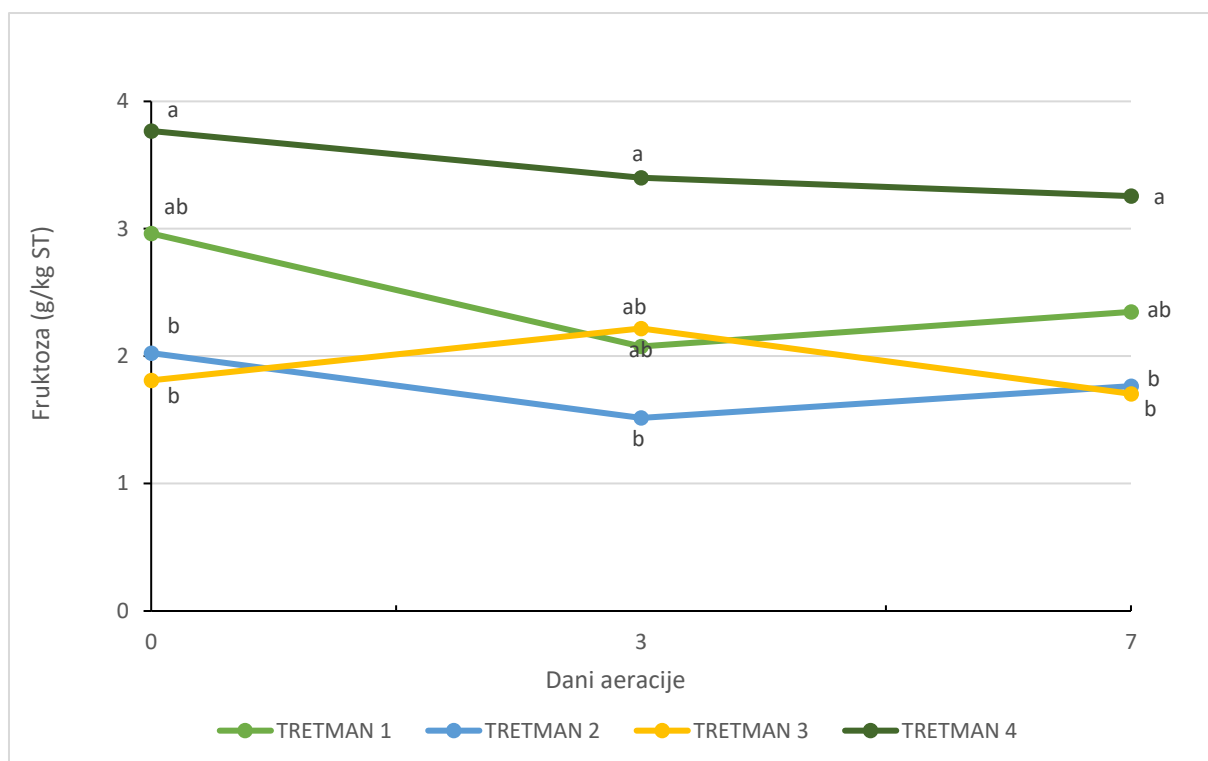
4.2. Promjene sadržaja šećera tijekom aeracije

Mikroorganizmi, primarno BMK, fermentiraju lako dostupne vodotopljive ugljikohidrate, od kojih su najvažnije frakcije heksoze – glukoza i fruktoza, te proizvode mliječnu kiselinu i HMK čime dolazi do pada pH i konzerviranja zelene mase (McDonald i sur. 1991.). Prilikom otvaranja silaža, silaže se aeriraju čime se otvara put za aktivnost nepoželjnih aerobnih mikroorganizama koji koriste kao supstrat i zaostale šećere koje nisu iskoristile BMK tijekom fermentacije (Wilkinson i Davies 2013.). Iako nije utvrđen značajan utjecaj vremena aeracije na promjene sadržaja glukoze i fruktoze vidljivo je kako su sadržaji glukoze i fruktoze bili brojčano najveći 0. dan aeracije u svim tretmanima te da je njihov sadržaj blago padao do 7 dana aeracije (slika 4.2.1.; slika 4.2.2.). Kung Jr i sur. (2003a.) navode kako su kod silaža koje su tretirane s *Lentilactobacillus buchneri* manji sadržaji vodotopljivih ugljikohidrata nego kod kontrole ili silaža tretiranih s homofermentativnim BMK. Tako Schmidt i sur. (2009.) pokazuju u silaži tretiranoj s *Lentilactobacillus buchneri* niži sadržaj vodotopljivih ugljikohidrata od kontrolne skupine 124. dan siliranja (5 g/kg ST vs. 7 g/kg ST). Nadalje, Filya (2003.) koji u silažama siliranim s *Lentilactobacillus buchneri* ima 87 % niže vodotopljive ugljikohidrate u odnosu na kontrolnu silažu (47 g/kg ST vs. 6 g/kg ST), dok je u silaži siliranoj s *Lactiplantibacillus plantarum* ta razlika zanemariva (47 g/kg ST u kontrolnoj vs. 42 g/kg ST u silaži s *L. plantarum*). U silažama u kojima je sporija proizvodnja mliječne kiseline te je sporiji pad pH dolazi do veće potrošnje supstrata jer nizak pH inhibira aktivnost mikroorganizama i

tako osigurava veću količinu ostatnog supstrata (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018., Muck i sur. 2018.). Kao što je vidljivo, u ovom istraživanju sadržaj glukoze (slika 4.2.1.) bio je najviši u kontroli. Blagi pad sadržaja šećera (slika 4.2.1.; slika 4.2.2.) tijekom aeracije u skladu je s aerobno stabilnim silažama (slika 4.1. – slika 4.4.) i s utvrđenim blagim, statistički nesignifikantnim (tablica 4.1.2.), porastom aerobnih mikroorganizama u silažama tijekom aeracije (tablica 4.10.1.).



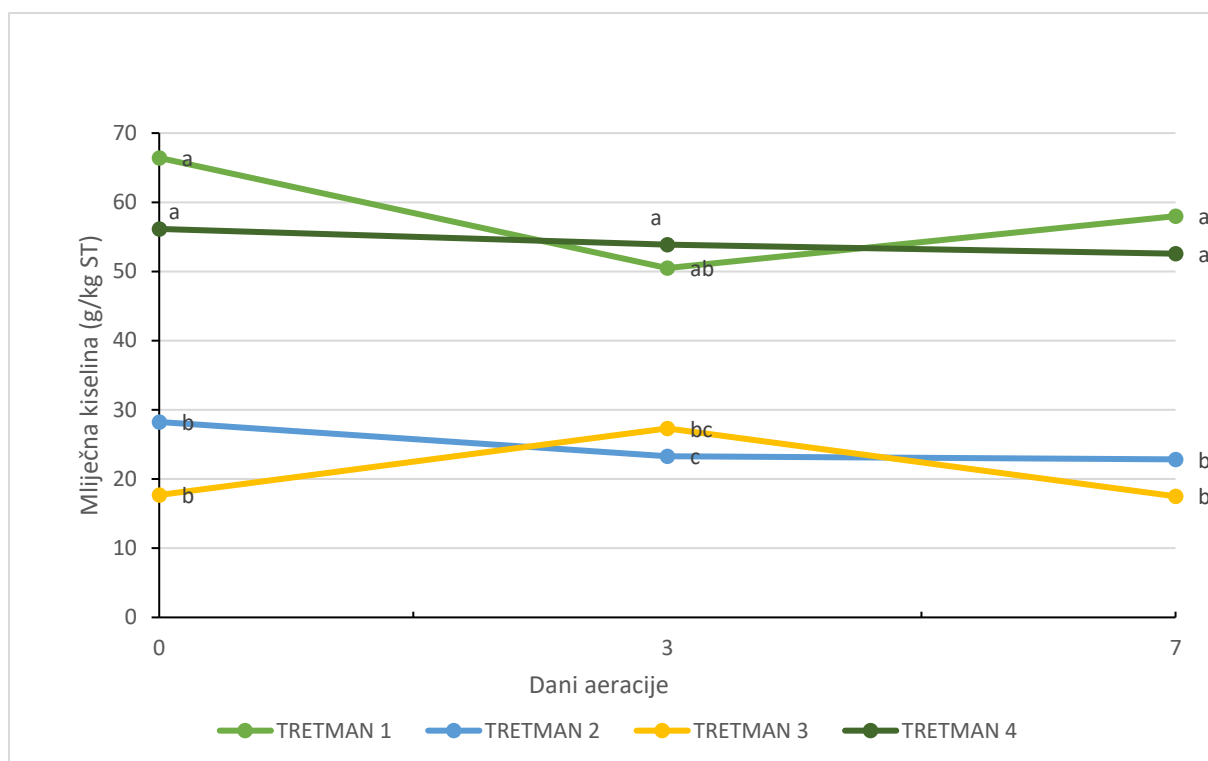
Slika 4.2.1. Promjene sadržaja glukoze s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.



Slika 4.2.2. Promjene sadržaja fruktoze s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

4.3. Promjene sadržaja mliječne kiseline tijekom aeracije

Glavni zadatak mliječne kiseline u proizvodnji silaža je pad pH i posljedično konzerviranje zelene mase (McDonald i sur. 1991.). Ukoliko tijekom aeracije silaže dođe do pada sadržaja mliječne kiseline, može se pretpostaviti kako je došlo do aktivnosti kvasaca jer kvasci metaboliziraju mliječnu kiselinu i zato se smatraju prvim mikroorganizmima aerobnog kvarenja silaže (Wilkinson i Davies 2013.). Kako navode McDonald i sur. (1991.), mliječna kiselina i vodotopljivi ugljikohidrati glavni su izvor energije za kvasce prilikom aeracije silaže. Promjene sadržaja mliječne kiseline izravno su povezane s aerobnim kvarenjem, jer pad sadržaja ove kiseline rezultira s povećanjem pH i aktivnošću ostalih nepoželjnih mikroorganizama, plijesni i enterobakterija (Wilkinson i Davies 2013., Muck i sur. 2018.). Slika 4.3.1. prikazuje promjene sadržaja mliječne kiseline u kontroli (tretman 1) te inokuliranim silažama (tretman 2, tretman 3 i tretman 4) tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne.



Slika 4.3.1. Promjene sadržaja mliječne kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

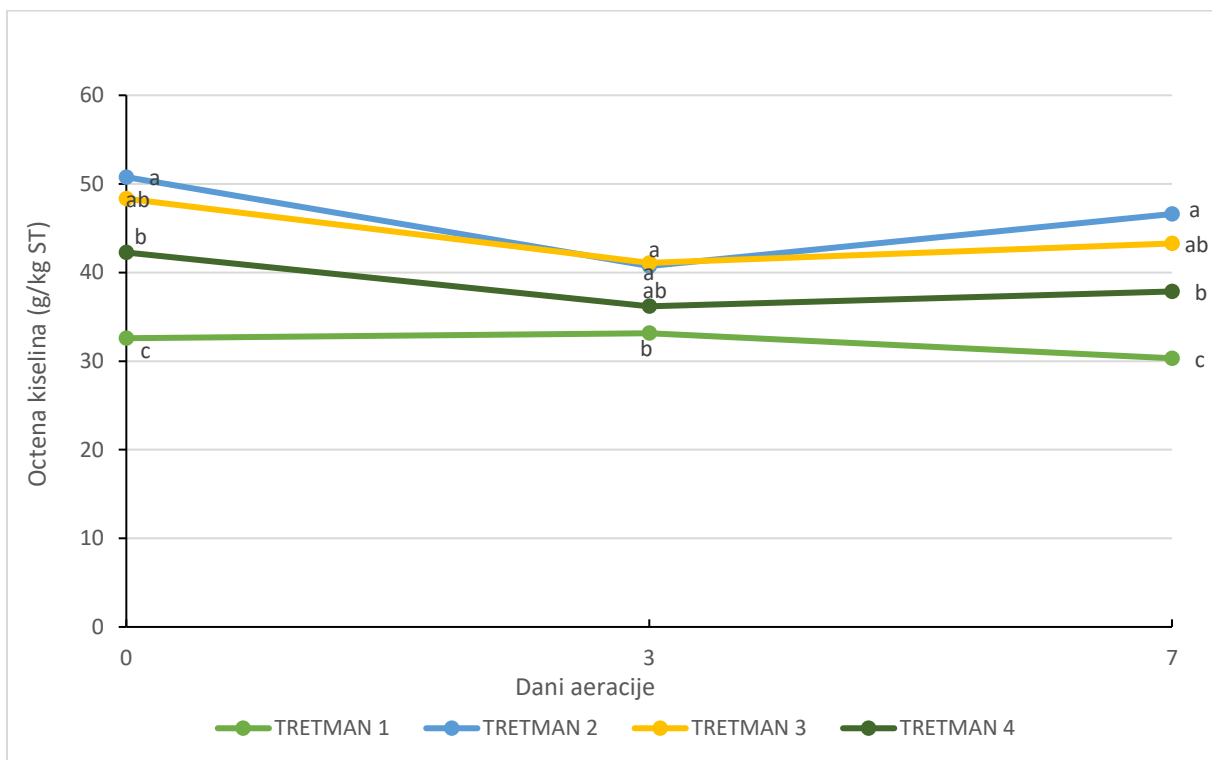
Iz slike 4.3.1. vidljivo je kako je tretman 1 (kontrola), 0. dan aeracije imao brojčano najveći sadržaj mliječne kiseline (66 g/kg ST), signifikantno u odnosu na tretman 2 i tretman 3, dok u odnosu na tretman 4 nije utvrđena statistički značajna razlika. Prema Kung i sur. (2018.), optimalne vrijednosti mliječne kiseline iznose 20 – 40 g/kg ST za silažu lucerne, a silaže u ovom istraživanju imale su vrijednosti ≥ 20 g/kg ST u tretmanima 2 i 3 te > 50 g/kg ST (nešto više od gornje granice) u tretmanima 1 i 4. Druga brojčano najveća vrijednost mliječne kiseline zabilježena je u tretmanu 4 (2x preporučene koncentracije inokulanta). Iz navedenog, može se zaključiti kako je u kontroli prevladala spontana aktivnost homofermentativnih BMK gdje je primarni produkt te fermentacije mliječna kiselina (McDonald i sur. 1991, Kung i sur. 2018, Muck i sur. 2018.). Slično kao i kod kontrole, u tretmanu 4 homofermentativna fermentacija bila je potpomognuta korištenjem inokulanta (kombinacija homofermentativne i heterofermentativnih BMK), gdje je *Pediococcus pentosaceus* (homofermentativna BMK) bila dominantna bakterija u fermentaciji. Suprotno tome, tretmani 2 i 3 imali su 3x niže vrijednosti mliječne kiseline naspram tretmana 1 i 4 u 0. danu aeracije (28 g/kg ST i 18 g/kg ST vs. 66 g/kg ST i 56 g/kg ST), što ukazuje na dominaciju heterofermentativnih BMK, *Lentilactobacillus buchneri* i *Lentilactobacillus hilgardii*. Prijašnja istraživanja pokazala su kako je sadržaj mliječne kiseline u kontroli 39 g/kg ST (Blajman i sur. 2020.) te 49 g/kg ST (Ke i sur. 2015.), što su niže vrijednosti nego one dobivene u ovom istraživanju. U istraživanju Blajman i sur. (2020.) silaže lucerne inokulirane s BMK imale su 46,5 g/kg ST mliječne kiseline. Driehuis i

sur. (2001.) navode kako u usporedbi s kontrolom, silaže koje su silirane s homofermentativnim inokulantima *Pediococcus pentosaceus* i *Lactiplantibacillus plantarum* sadrže više mliječne kiseline, dok silaže silirane s heterofermentativnim inokulantima kao što je *Lentilactobacillus bucheri* i *Lentilactobacillus hilgardii*, imaju niže sadržaje mliječne kiseline.

Pad sadržaja mliječne kiseline očekivan je obzirom na uspostavu aerobnih uvjeta i aktivacije aerobnih mikroorganizama koji metaboliziraju mliječnu kiselinu (McDonald i sur. 1991.). Iako je u ovom istraživanju vidljiv blagi pad sadržaja mliječne kiseline (slika 4.3.1.), on nije bio signifikantan (tablica 4.1.1.) što je u skladu i s promjenom temperature silaža, jer su sve silaže ostale stabilne u cijelom periodu aeracije (slike 4.1. – 4.4.). S druge strane, iz tablice 4.1.1. vidljivo je kako je dodatak inokulanta (tretman) imao statistički značajan utjecaj na promjene sadržaja mliječne kiseline tijekom aeracije ($P = 0,004$). U istraživanju Liu i sur. (2018.) ispitan je utjecaj dodatka različitih inokulanta (*Lentilactobacillus bucheri*, *Lactiplantibacillus plantarum* te propionska kiselina) na promjene mliječne kiseline tijekom 6 dana aeracije silaže lucerne. Slično ovom istraživanju, u istraživanju Liu i sur. (2018.), vidljiv je pad sadržaja mliječne kiseline tijekom aeracije, međutim, u navedenom istraživanju kontrola je 6. dan aeracije imala najmanju količinu mliječne kiseline u odnosu na silaže s inokulantima (0,26 g/kg ST kontrola, 3,5 g/kg ST silaža s *Lentilactobacillus bucheri*, 13,45 g/kg ST silaža s *Lactiplantibacillus plantarum* i 12,19 g/kg ST silaža s propionskom kiselinom; $P = 0,05$) što je u suprotnosti s ovim istraživanjem. U ovom istraživanju, sadržaj mliječne kiseline u 7. danu aeracije bio je najviši u kontroli, signifikantno u odnosu na ostala tri tretmana (slika 4.3.1.). Dodatno, sadržaji mliječne kiseline u ovom istraživanju bili su veći od sadržaja prikazanih u Liu i sur. (2018.). Valja napomenuti kako se u navedenom istraživanju siliranje provodilo 2 mjeseca dok su u ovom istraživanju silaže otvarane nakon 4 mjeseca, što je moguće utjecalo i na veće sadržaje mliječne kiseline u ovom istraživanju. Silaže lucerne često imaju aktivnu fazu fermentacije dulju i od pretpostavljena 2 mjeseca, jer se zelena masa lucerne opire promjeni pH zbog visokog pufernog kapaciteta (McDonald i sur. 1991.).

4.4. Promjene sadržaja octene kiseline tijekom aeracije

Octena kiselina jedna je od najvažnijih kiselina za aerobnu stabilnost jer inhibira aktivnost kvasaca (McDonald i sur. 1991., Wilkinson i Davies 2013., Kung i sur. 2018.). Promjene sadržaja octene kiseline tijekom sedmodnevne aeracije prikazane su na slici 4.4.1. Octena kiselina na početku aeracije, 0. dan, bila je brojčano najveća u tretmanu 2 (51 g/kg ST); signifikantno u odnosu na tretman 1 i 4 (33 g/kg ST i 42 g/kg ST), dok u odnosu na tretman 3 nije utvrđena signifikantna razlika (48 g/kg ST). Visoki sadržaji octene kiseline (slika 4.4.1.) u tretmanima 2 i 3 upućuju na dominantnost heterofermentativnih BMK tijekom siliranja. Homofermentativne BMK sintetiziraju većinom mliječnu kiselinu dok heterofermentativne uz mliječnu sintetiziraju i octenu, etanol i CO₂ (McDonald i sur. 1991.). Slika 4.4.1. prikazuje blagi pad sadržaja octene kiseline u svim tretmanima u 3. danu aeracije s iznimkom kontrole (tretman 1), gdje je ona blago rasla (s 33 g/kg ST na 34 g/kg ST). Pri kraju aeracije (7. dan), kontrola je imala signifikantno najnižu vrijednost (30 g/kg ST) u odnosu na ostala tri tretmana s inokulantom. Kod silaža s dodanim inokulantom na kraju aeracije, tretman 2 ponovo je imao brojčano najviši sadržaj octene kiseline (46 g/kg ST), signifikantno u odnosu na tretman 4 (38 g/kg ST, $P < 0,05$).



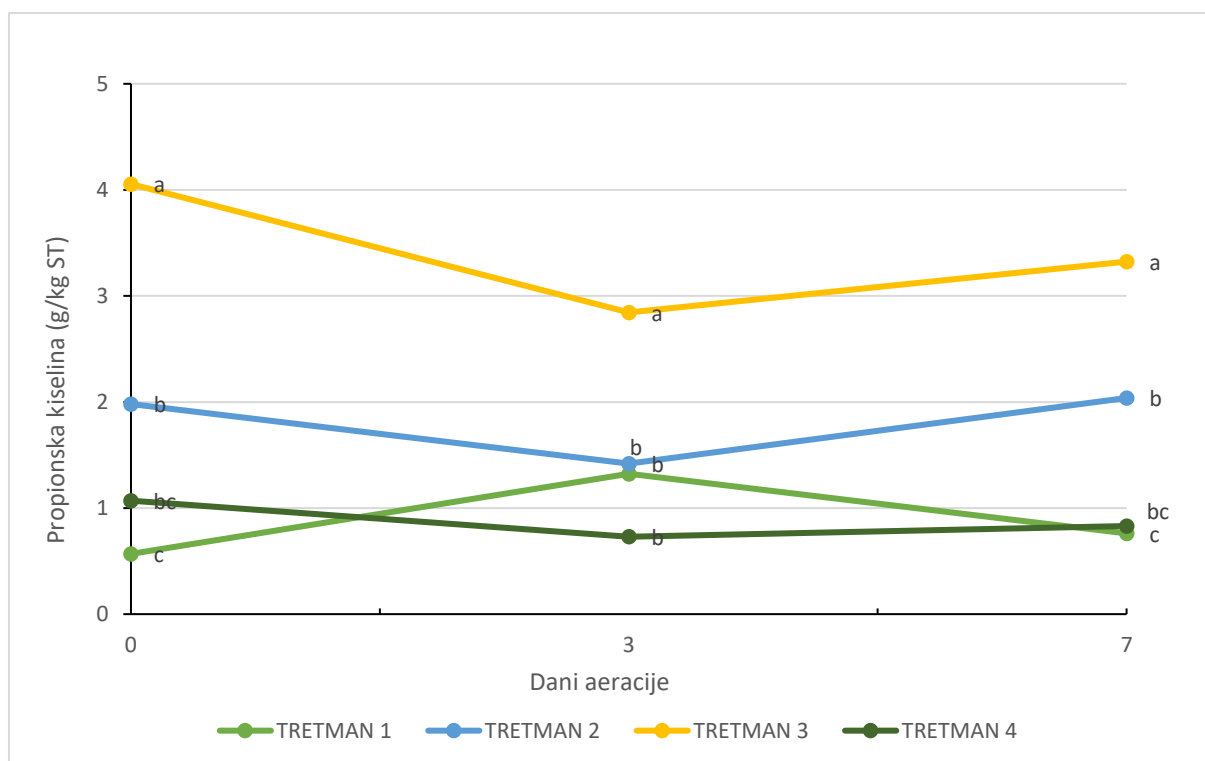
Slika 4.4.1. Promjene sadržaja octene kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

Octena kiselina, nakon mliječne kiseline, druga je najvažnija organska kiselina u silažama te njezin sadržaj izrazito utječe na aerobnu stabilnost silaža (McDonald i sur. 1991., Wilkinson i Davies 2012.). Prema Kung i sur. (2018.), optimalni sadržaj octene kiseline u silaži lucerne je 10 – 30 g/kg ST. U ovom istraživanju na početku aeracije sve silaže imale su više vrijednosti od navedenog raspona, jedino je kontrolna silaža bila blizu gornje granice (33 g/kg ST; slika 4.4.1.). Više vrijednosti octene kiseline (30 – 50 g/kg ST) česte su u silažama koje su inokulirane s *Lentilactobacillus bucheri* (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). Navedeno je u skladu s rezultatima u ovom istraživanju gdje su vrijednosti octene kiseline nešto više u silažama s inokulantom (slika 4.4.1.). Inokulant upotrijebljen u ovom istraživanju sadržavao je heterofermentativnu BMK *Lentilactobacillus bucheri*. Rezultati istraživanja Zhang i sur. (2009.) na silaži lucerne inokuliranoj s kombinacijom *Lentilactobacillus bucheri* i *Lactiplantibacillus plantarum* pokazuju veći sadržaj octene kiseline u 90. danu siliranja u navedenim silažama u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P < 0,05$, kontrola = 24,23 g/kg, LB + LP = 27,90 g/kg). Slično, u istraživanju Kung Jr i sur. (2003b.), silaža inokulirana s *Lentilactobacillus bucheri* imala je signifikantno viši sadržaj octene kiseline u odnosu na kontrolnu silažu (64 g/kg ST vs. 42 g/kg ST). S druge strane, u istraživanju Blajmana i sur. (2020.) prikazane su suprotne vrijednosti, odnosno, kontrola (20 g/kg ST) u navedenom istraživanju imala je veći sadržaj octene kiseline od tretmana (19,3 g/kg ST) na koje je apliciran inokulant. Autori navode kako je to rezultat inokulacije s homofermentativnim BMK (Blajman i sur. 2020.). Istraživanje Driehuis i sur. (2001.) koje je bilo provedeno na engleskom ljulju pokazuje kako je octena kiselina bila povećana samo kod inokulanta koji sadrži *Lentilactobacillus bucheri* dok je kod ostalih inokulanata (kombinacija *Pediococcus pentosaceus* i *Lactiplantibacillus plantarum* s *Lentilactobacillus buchneri*) sadržaj octene kiseline bio vrlo sličan kontrolnoj skupini. Ukoliko su se pak koristile samo homofermentativne BMK, sadržaj octene kiseline bio je niži i od kontrolne skupine (Driehuis i sur. 2001.). S obzirom da u ovom istraživanju nisu korištene individualne bakterije, već kombinacija, vidljivo je kako je veća aktivnost heterofermentativnih *Lentilactobacillus bucheri* i *Lentilactobacillus hilgardii* zabilježena u tretmanima 2 i 3 dok je tretman 4 imao slični sadržaj octene kiseline kao kontrola gdje je vjerojatna viša aktivnost homofermentativnih BMK (slika 4.4.1). Istraživanje Adesogan i Salawu (2004.) navodi kako upotreba inokulanata koji su kombinacija *Lentilactobacillus bucheri*, *Pediococcus pentosaceus* i *Lactiplantibacillus plantarum* nije rezultirala drugačijom aerobnom stabilnošću silaža od kontrole (144 sati kontrola vs. 144 sati inokulirane silaže) što je slično s rezultatima u ovom istraživanju (slike 4.1 – 4.4).

4.5. Promjene sadržaja propionske kiseline tijekom aeracije

Propionska kiselina, kao i octena kiselina, ima antimikrobna svojstva te pozitivno djeluje na aerobnu stabilnost silaža (McDonald i sur. 1991., Wilkinson i Davies 2013., Kung i sur. 2018.). Danas na tržištu postoje aditivi koji su bazirani na propionskoj kiselini, no njihova primjena nije toliko zastupljena zbog visoke cijene (Canibe i sur. 2014.). Kung i sur. (2018.) navode kako je sadržaj propionske kiseline u dobro siliranim silažama uglavnom mali (do 1 g/kg ST u silaži lucerne). Ukoliko je sadržaj ove kiseline viši (3 – 5 g/kg ST u silaži lucerne), pretpostavlja se kako je došlo do negativne sekundarne fermentacije koja je uzrokovana aktivnošću *Clostridium propionicum* (Kung i sur. 2018.). Iznimke od ove tvrdnje su silaže koje su inokulirane bakterijama *Propionibacterium* spp. koje sintetiziraju propionsku kiselinu iz mliječne kiseline i glukoze (Dawson i sur. 1998.), ali je njihova aktivnost u silažama najčešće limitirana i nedovoljna za proizvodnju značajnih količina propionske kiseline (Kung i sur. 2018.). Promjene sadržaja propionske kiseline tijekom sedmodnevne aeracije silaža lucerne s inokulantom i u kontroli iz ovog istraživanja prikazane su na slici 4.5.1.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je 0. dan aeracije brojčano najniži sadržaj propionske kiseline bio u kontroli (0,5 g/kg ST), i to signifikantno u odnosu na tretman 2 i tretman 3 (slika 4.5.1.). Pri tom je sadržaj propionske kiseline u tretmanu 3 bio neočekivano visok i signifikantno viši od ostalih tretmana (4 g/kg ST). Tretman 3 (1,5x standardne doze inokulanta) imao je čak 8x viši sadržaj propionske kiseline od kontrole (slika 4.5.1.). Istovremeno, tretman 3 imao je najnižu vrijednost mliječne kiseline od svih tretmana (slika 4.3.1.). U 3. danu aeracije došlo je do pada sadržaja propionske kiseline u svim inokuliranim silažama dok je u kontroli došlo do rasta sadržaja (1,3 g/kg ST). U 7. danu aeracije bio je vidljiv blagi rast propionske kiseline u inokuliranim silažama s najvećom vrijednošću u tretmanu 3 (3,3 g/kg ST). Suprotno tome, propionska kiselina u kontroli u 7. danu aeracije ponovno je pala te je imala najnižu vrijednost, sličnu vrijednost kao i u tretmanu 4 (0,76 g/kg ST vs. 0,83 g/kg ST) što je u skladu s utvrđenom signifikantnom interakcijom tretmana i vremena aeracije ($P=0,032$; tablica 4.1.1).

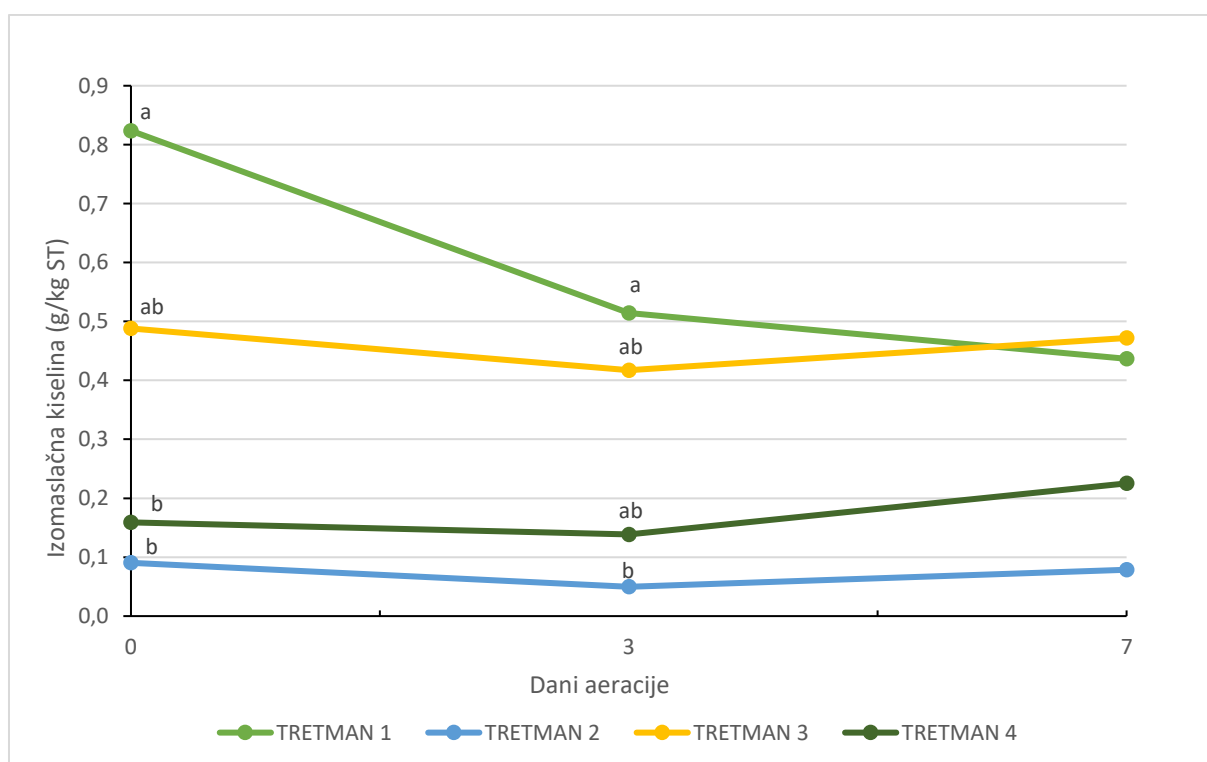


Slika 4.5.1. Promjene sadržaja propionske kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

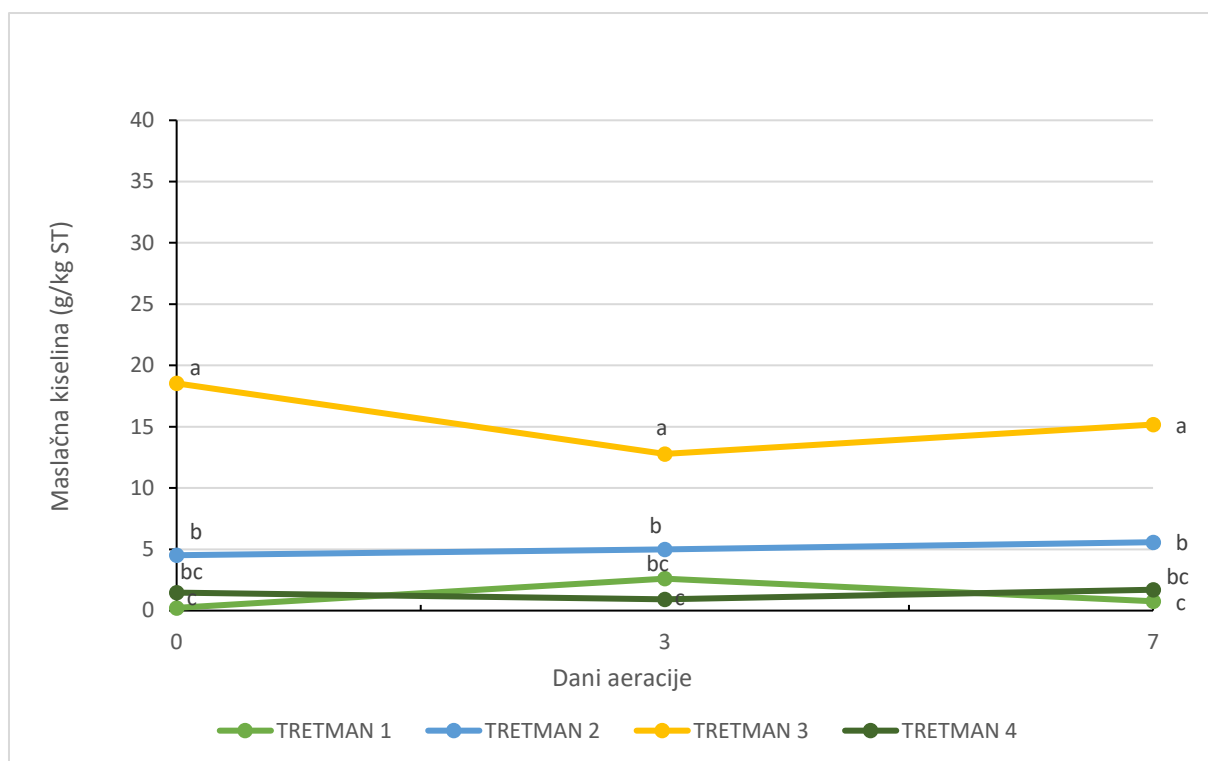
Silaže koje su tretirane s *Lentilactobacillus bucheri* često imaju veći sadržaj propionske kiseline zbog mogućnosti pretvorbe propan-1,2-diola u propanol i propionsku kiselinu uz pomoć *Lentilactobacillus diolivorans* (Krooneman i sur. 2002., Kung Jr i sur. 2003b.). Rezultati navedenih autora u skladu su s ovim istraživanjem. Iz dobivenih rezultata ovog istraživanja, vidljivo je da je mliječna kiselina (slika 4.3.1.) u obrnuto proporcionalnom odnosu s octenom kiselinom (slika 4.4.1.) i propionskom kiselinom (slika 4.5.1.). Ovakve vrijednosti mogu se povezati s dominacijom heterofermentativnih bakterija BMK gdje dolazi do veće sinteze HMK a manje sinteze mliječne kiseline. Slično ovom istraživanju, u istraživanju Kung Jr i sur. (2003b.) sadržaj propionske kiseline u silažama lucerne siliranim s inokulantom *Lentilactobacillus bucheri* nakon 56 dana bio je signifikantno viši u odnosu na kontrolne silaže (2,2 g/kg ST vs. 0,6 g/kg ST). U navedenom istraživanju silaže s inokulantom imale su i veću aerobnu stabilnost u odnosu na kontrolu (100 sati vs. 68 sati; Kung Jr i sur. 2003b.).

4.6. Promjene sadržaja izomaslačne i maslačne kiseline tijekom aeracije

U silažama dobre kvalitete izomaslačna i maslačna kiselina ne bi trebale biti detektirane, no tolerira se 1 – 2 g/kg ST maslačne kiseline u vlažnijim silažama (Kung i sur. 2018.). Na slikama 4.6.1 i 4.6.2. prikazane su promjene u sadržajima izomaslačne i maslačne kiseline tijekom sedmodnevne aeracije silaža. Iz slike 4.6.1. vidljivo je kako je na početku aeracije sadržaj izomaslačne kiseline bio brojčano najviši u kontroli (0,82 g/kg ST), signifikantno u odnosu na tretman 2 (0,09 g/kg ST) i tretman 4 (0,16 g/kg ST). U 3. danu aeracije došlo je do blagog pada izomaslačne kiseline u svim tretmanima (slika 4.6.1.) s ponovno najvišim sadržajem u kontroli. U zadnjem danu aeracije nije utvrđena signifikantna razlika u sadržaju izomaslačne kiseline između testiranih tretmana ($P > 0,05$). Na slici 4.6.2. vidljiv je visoki sadržaj maslačne kiseline na početku aeracije u tretmanu 3 (19 g/kg ST), i to signifikantno u odnosu na ostala tri tretmana. Tretman 1 (kontrola) pokazao je vrijednosti koje su bile unutar očekivanih (0,22 g/kg ST), dok su tretmani 2 i 4 bili izvan optimalnih vrijednosti (4,5 g/kg ST i 1,5 g/kg ST). U trećem danu aeracije došlo je do pada maslačne kiseline u tretmanu 3 (13 g/kg ST) i tretmanu 4 (1,5 g/kg ST). Na kraju aeracije tretman 3 imao je signifikantno veći sadržaj maslačne kiseline u odnosu na ostala tri tretmana (15 g/kg ST) dok je tretman 1 (kontrola) imao brojčano najniži sadržaj (0,75 g/kg ST), signifikantno u odnosu na tretman 2 i već spomenuti tretman 3.



Slika 4.6.1. Promjene sadržaja izomaslačne kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

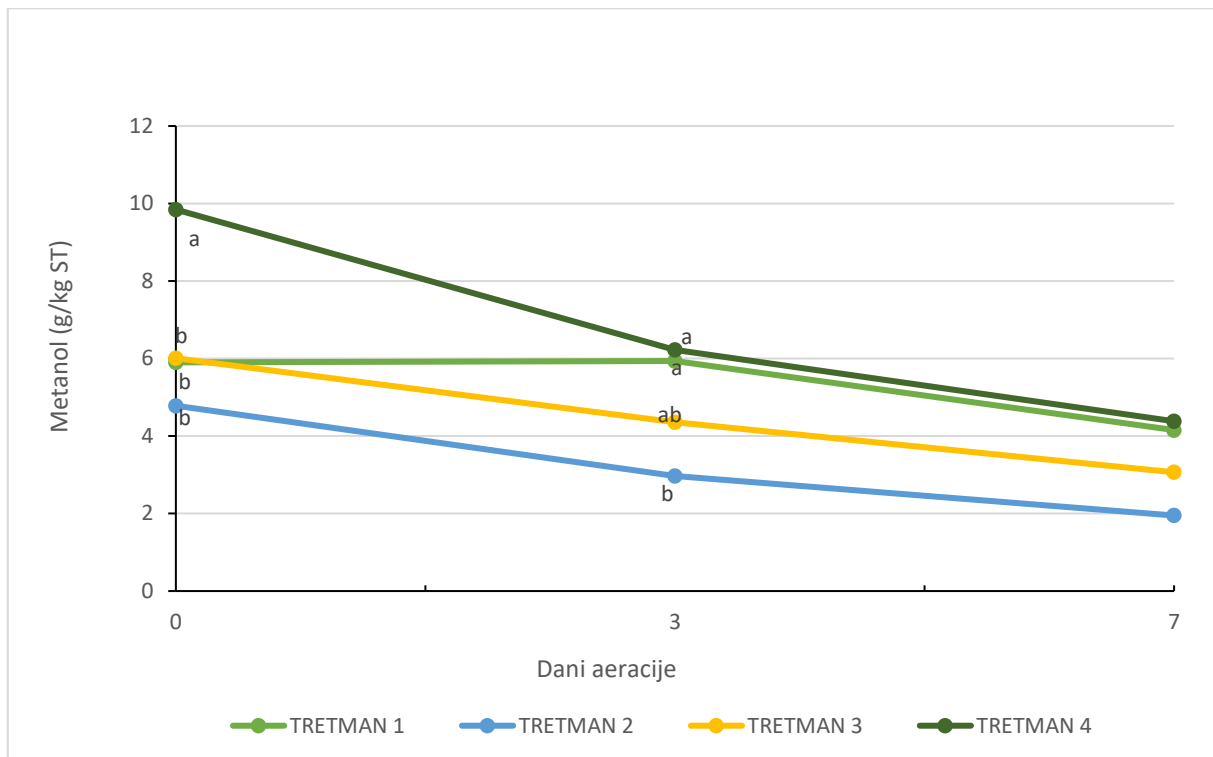


Slika 4.6.2. Promjene sadržaja maslačne kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

Iz rezultata je vidljivo kako je vjerojatno u silažama s 50 % većom koncentracijom inokulanta od preporučene od strane proizvođača (tretman 3) došlo do negativne sekundarne fermentacije klostridijama. Niski sadržaj mliječne kiseline (slika 4.3.1.) te visoki sadržaj propionske, izomaslačne i maslačne kiseline (slika 4.5.1.; slika 4.6.1.; slika 4.6.2.) na početku aeracije u tretmanu 3 ukazuje na aktivnost klostridija (Kung i sur. 2018.). Visoke vrijednosti maslačne kiseline izravno utječu na veliki gubitak ST i na smanjenu nutritivnu vrijednost silaža (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). Silaže lucerne podložne su sekundarnim fermentacijama klostridijama, zbog često niske ST i zbog visokog pufernog kapaciteta koji usporava pad pH u silaži te tako omogućava aktivnost nepoželjnih klostridija (McDonald i sur. 1991., Muck i sur. 2018.). Slične, visoke vrijednosti maslačne kiseline u silažama lucerne detektirali su Liu i sur. (2018.). U navedenom istraživanju silirana je visoko vlažna silaža lucerne te je maslačna kiselina u kontroli > 32 g/kg ST. Međutim, silaže silirane s inokulantima BMK *Lentilactobacillus bucheri* i *Lactiplantibacillus plantarum* imale su smanjeni sadržaj maslačne kiseline (12,9 g/kg ST i 1,43 g/kg ST) u odnosu na kontrolnu silažu (> 32 g/kg ST; Liu i sur. 2018.) što je u suprotnosti s rezultatima u ovom istraživanju. U ovom istraživanju niži sadržaj maslačne kiseline bio je detektiran u kontroli i tretmanu 4, dok je u silažama s povećanom aktivnosti heterofermentativnih BMK (tretmani 2 i tretman 3) bio detektiran veći sadržaj maslačne kiseline i to najviši u tretmanu 3.

4.7. Promjene sadržaja metanola tijekom aeracije

Slika 4.7.1. prikazuje promjene sadržaja metanola u kontroli te inokuliranim silažama tijekom sedmodnevne aeracije. Sadržaj metanola u hrani za životinje ne bi smio biti iznad 150 mg/kg ST, no često je zabilježen veći sadržaj u silažama trava (583 – 878 mg/kg; Sellers 2008.). Na početku aeracije, 0. dan, najveći sadržaj metanola bio je u tretmanu 4 (9,8 g/kg ST; signifikantno u odnosu na ostale tretmane), a najmanji u tretmanu 2 (5,8 g/kg ST; signifikantno samo u odnosu na tretman 4). Tijekom cijelog perioda aeracije zabilježen je pad metanola kod svih tretmana. Brojčano najniža vrijednost pri samom kraju aeracije bila je u tretmanu 2 (1,9 g/kg ST) bez signifikantne razlike u odnosu na ostala tri tretmana (slika 4.7.1.).



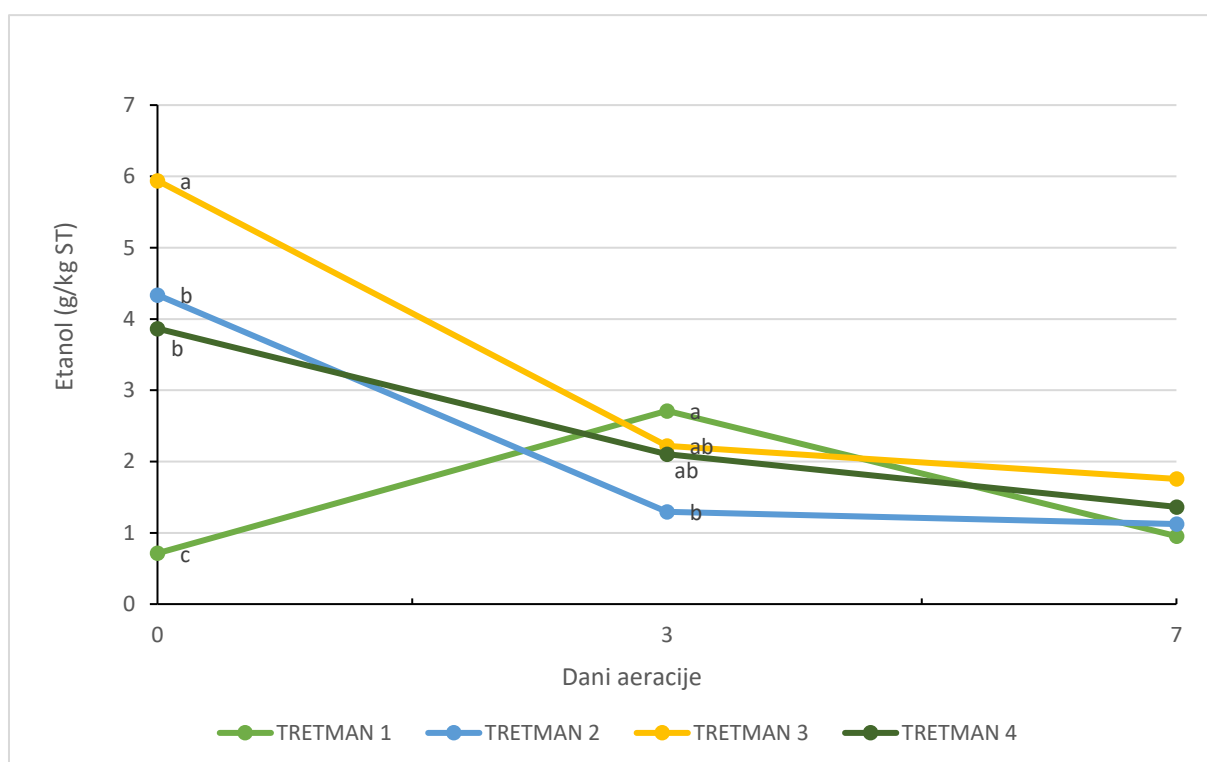
Slika 4.7.1. Promjene sadržaja metanola s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

U istraživanju Malkina i sur. (2011.) u silaži lucerne nije detektiran metanol. Pretpostavka autora je, da je metanol zajedno s etanolom jedan od dominantnih spojeva u emisiji plinova, no isparavanje metanola je prebrzo te se vrijednosti nisu mogle zabilježiti (Malkina i sur. 2011.). Iz tablice 4.1.1. vidljivo je kako tretman ($P = 0,006$) kao i vrijeme aeracije ($P < 0,001$) imaju statistički značajan utjecaj na sadržaj metanola. Tretman 4 imao je najveći sadržaj metanola tijekom cijelog perioda aeracije (slika 4.7.1.), što je zanimljivo, budući da je pretpostavka da se u tretmanu 4 radilo o homofermentativnoj fermentaciji zbog visokog sadržaja mliječne kiseline (slika 4.3.1.) i niskog sadržaja octene (slika 4.4.1.) te propionske kiseline (slika 4.5.1.). Istraživanje Da Silva i sur. (2019.) pokazuje kako silaže visokovlažnog

zrna kukuruza (*engl.* high moisture corn; HMC) i rehidratiranog zrna kukuruza (*engl.* rehydrated corn grain silage; RCGS) inokulirane s *Lentilacobacillus bucheri* imaju veći sadržaj metanola od onih netretiranih, kontrolnih (52,2 mg/kg ST vs. 42,2 mg/kg ST u HMC te 44,8 mg/kg ST i 40 mg/kg ST u RCGS).

4.8. Promjene sadržaja etanola tijekom aeracije

Slika 4.8.1. prikazuje promjene sadržaja alkohola etanola tijekom sedmodnevne aeracije. Etanol se često nalazi u silažama budući da ga veliki broj mikroorganizama može proizvesti te se njegove vrijednosti u kvalitetnim silažama lucerne kreću od 5 – 15 g/kg ST (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). U ovom istraživanju najveći sadržaj etanola bio je na početku aeracije (0. dan) u tretmanu 3 (5,9 g/kg ST) koji je drastično pao u 3. danu aeracije (2,2 g/kg ST) te nastavlja trend padanja do zadnjeg dana aeracije (1,8 g/kg ST). Kontrola je imala statistički najniži sadržaj etanola na početku aeracije (0,7 g/kg ST) koji je blago porastao u 3. danu aeracije (2,7 g/kg ST) te ponovno pao pri kraju aeracije (1,0 g/kg ST). Osim statistički značajnog utjecaja tretmana pri siliranju na promjene sadržaja etanola, zabilježen je i signifikantni utjecaj vremena aeracije ($P < 0,001$) kao i interakcija tretmana i vremena aeracije na sadržaj etanola u aeriranim silažama ($P < 0,001$; tablica 4.1.1.).

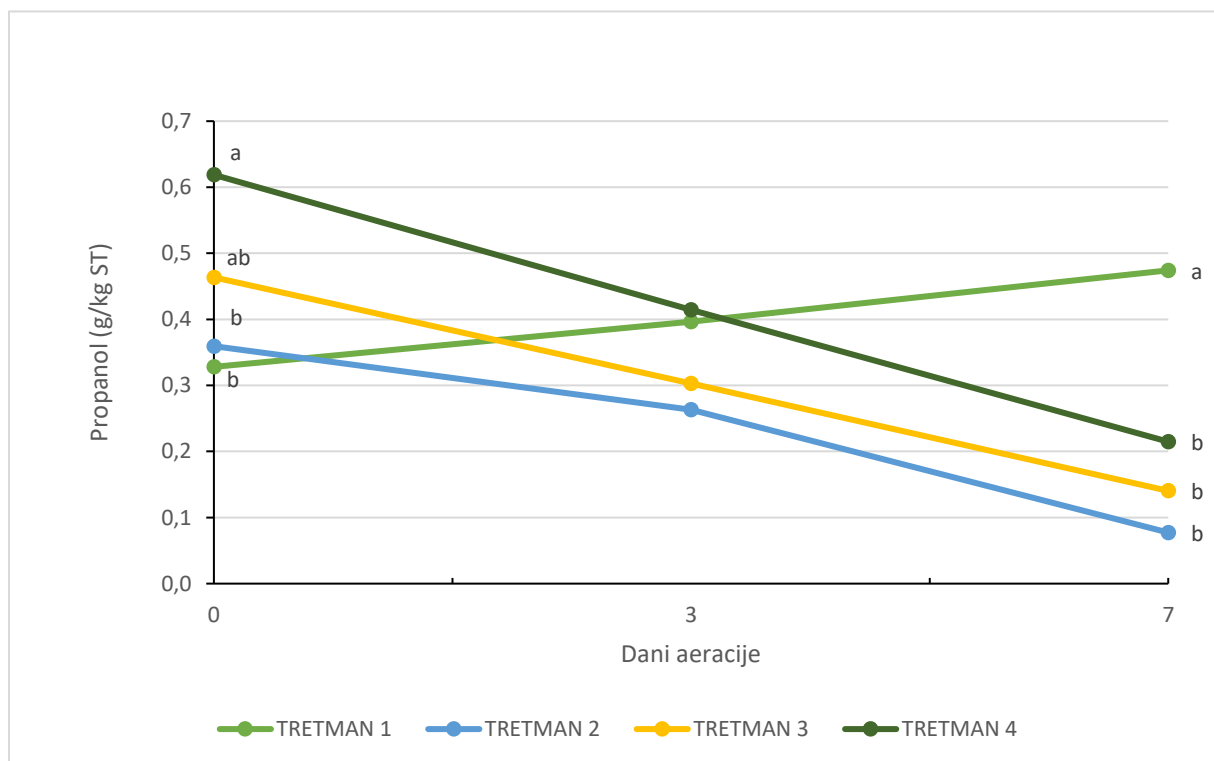


Slika 4.8.1. Promjene sadržaja etanola s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

Silaže kod kojih je pretpostavljena heterofermentativna aktivnost BMK pokazuju najveći sadržaj etanola (tretman 3 i tretman 2) na početku aeracije, dok se kod kontrole, gdje nema primjene inokulanta, uočio gotovo zanemarivi sadržaj etanola (slika 4.8.1.).

4.9. Promjene sadržaja propanola tijekom aeracije

Iako je propanol rijetko detektiran u silažama, silaže koje su tretirane s *Lentilactobacillus bucheri* često imaju veće sadržaje propanola zbog mogućnosti pretvorbe propan-1,2-diola kojeg sintetizira *Lentilactobacillus bucheri* u propanol i propionsku kiselinu uz pomoć *Lentilactobacillus diolivorans* (Krooneman i sur. 2002., Kung Jr i sur. 2003b.). U 0. danu aeracije sadržaj propanola bio je brojčano najveći u tretmanu 4 (0,6 g/kg ST; signifikantno u odnosu na tretman 1 i 2) te je u 3. danu aeracije zabilježen pad sadržaja propanola u istom tretmanu (0,6 g/kg ST na 0,4 g/kg ST) koji se nastavio do kraja aeracije (0,2 g/kg ST). Sličan pad sadržaja propanola bio je vidljiv je i kod ostalih tretmana, uz iznimku kod tretmana 1 (kontrola) gdje je na kraju aeracije bio nešto viši sadržaj propanola (slika 4.9.1.).



Slika 4.9.1. Promjene sadržaja propanola s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne (tretman 1: kontrolna silaža, tretman 2: inokulant 2 g/t svježe mase, tretman 3: inokulant 3 g/t svježe mase, tretman 4: inokulant 4 g/t svježe mase). Tretmani u istoj vremenskoj točki s različitim eksponentima statistički se razlikuju $P < 0,05$.

Iako u istraživanju nije utvrđen statistički značajan utjecaj dodatka inokulanta na promjene sadržaja propanola u testiranim silažama tijekom aeracije ($P = 0,080$; tablica 4.1.1.), detaljnija analiza u pojedinim vremenskim točkama ukazuje na statističku razliku između tretmana (slika 4.9.1.). Rezultati pokazuju veće sadržaje propanola u silažama koje su silirane s inokulantom na početku aeracije što se promijenilo na kraju aeracije kada kontrola ima signifikantno viši sadržaj propanola od silaža s inokulantom (slika 4.9.1.; tablica 4.1.1. interakcija tretmana i vremena aeracije $P = 0,014$). Slično ovom istraživanju, viši sadržaj propanola u silažama siliranim s *Lentilactobacillus bucheri* dobili su i Da Silva i sur. (2019.), propanol u HMC s inokulantom bio je 100 % veći u odnosu na kontrolu (u kontroli propanol nije bio detektiran), a u RCGS je bio 77 % veći u odnosu na kontrolu.

4.10. Promjene parametara mikrobiološke kvalitete silaža tijekom aeracije

Mikroorganizmi koji se nalaze u silažama tijekom fermentacije, ali i aeracije silaža, najvažniji su parametar koji utječe na kvalitetu silaža. Ako u silaži prevladavaju BMK, silaža će biti dobrih karakteristika, međutim ako prevladavaju nepoželjni mikroorganizmi kao što su enterobakterije ili kvasci i plijesni, silaža je nestabilna i loše kvalitete (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018., Muck i sur 2018.). U ovom istraživanju od mikrobioloških parametara kvalitete silaža praćeni su broj BMK, broj kvasaca, broj plijesni i broj BAB.

Iz tablice 4.10.1. vidljivo je kako je broj BMK prevladao ostale detektirane mikroorganizme što se i očekuje u silažama. Bakterije mliječne kiseline usmjeravaju fermentaciju u silažama, proizvode mliječnu kiselinu i HMK te tako snižavaju pH i konzerviraju hranjive tvari (McDonald i sur. 1991.). Međutim, tijekom izuzimanja silaža, silaže se aeriraju i kreću negativni procesi koje provode nepoželjni mikroorganizmi aerobnog kvarenja silaža, primarno kvasci pa nakon njih plijesni (Wilkinson i Davies 2013.).

Na početku aeracije (0.dan), broj BMK bio je signifikantno veći u tretmanima s inokulantom ($8,1 - 8,4 \log_{10}$ CFU/g) u odnosu na broj BMK u kontroli ($7,3 \log_{10}$ CFU/g). Zanimljivo, tretmani 2 i 3 imali su brojčano veći broj BMK od tretmana 4 (bez statističke signifikantnosti), što je neočekivano jer je u tretman 4 dodana najviša koncentracija inokulanta (4 g/t svježe mase). Daljnjom aeracijom nije došlo do značajnih promjena u broju BMK; tretmani 2 i 3 imali su više vrijednosti BMK u odnosu na ostala dva tretmana. Tijekom cijelog perioda aeracije najmanji broj BMK bio je u kontroli (tablica 4.10.1.). Stabilan broj BMK tijekom aeracije (tablica 4.1.2. i tablica 4.10.1.) u ovom istraživanju u skladu je s utvrđenom aerobnom stabilnosti silaža (slike 4.1. - 4.4.).

Broj plijesni na početku aeracije nije bio statistički različit između tretmana (tablica 4.10.1.), što se promijenilo tijekom aeracije kada je u tretmanu 3 utvrđen brojčano najveći broj plijesni u 3. danu ($2,4 \log_{10}$ CFU/g; signifikantno samo u odnosu na tretman 4) i 7. danu ($2,5 \log_{10}$ CFU/g, signifikantno u odnosu na sva tri ostala tretmana). Rezultati istraživanja ukazuju, iako brojčane vrijednosti imaju blagi porast (tablica 4.10.1.), kako tijekom aeracije silaža nije došlo do signifikantnog porasta broja plijesni ($P = 0,166$; tablica 4.1.2.). Tablica 4.10.1. isto tako prikazuje kretanje broja kvasaca gdje je broj kvasaca u svim tretmanima svih dana aeracije bio

ujednačen (oko 1,7 log₁₀ CFU/g) s iznimkom 3. dana aeracije gdje je tretman 2 (preporučena doza inokulanta) imao signifikantno veći broj kvasaca (1,9 log₁₀ CFU/g) te 7. dana gdje je tretman 3 (1,5x uvećana koncentracija inokulanta) imao signifikantno veći broj kvasaca od kontrole (tablica 4.10.1.). Tijekom aeracije silaža nije utvrđen statistički značajan utjecaj tretmana, vremena aeracije, niti njihovih interakcija na broj kvasaca (tablica 4.1.2.).

Zadnji parametar mikrobiološke kvalitete silaža u ovom istraživanju bio je broj BAB. Statistički je utvrđen značajan utjecaj tretmana (P = 0,009) kao i vrijeme aeracije (P = 0,003) na BAB. Tijekom aeracije silaža došlo je do porasta broja spora u silažama (tablica 4.10.1.) te je najveći broj BAB zabilježen u tretmanu 3 cijeli period aeracije, s iznimkom u 3. danu aeracije gdje nije utvrđena signifikantna razlika u broju spora između tretmana (P > 0,05).

Tablica 4.10.1. Promjene broja mikrobioloških pokazatelja kvalitete silaže tijekom sedmodnevne aeracije silaže lucerne

DAN (D)	TRETMAN	BMK (Log ₁₀ CFU/g)	UBP (Log ₁₀ CFU/g)	UBK (Log ₁₀ CFU/g)	BAB (Log ₁₀ /g)
0	1	7,3 ^b	1,8	1,7	1,5 ^b
	2	8,4 ^a	1,8	1,7	1,9 ^{ab}
	3	8,4 ^a	2,3	1,7	2,3 ^a
	4	8,1 ^a	1,9	1,7	2,0 ^a
3	1	7,6 ^b	2,2 ^{ab}	1,7 ^b	1,8
	2	8,5 ^a	2,0 ^{ab}	1,9 ^a	1,6
	3	8,2 ^{ab}	2,4 ^a	1,7 ^b	1,9
	4	8,0 ^{ab}	1,9 ^b	1,7 ^b	2,0
7	1	7,8 ^b	1,9 ^b	1,7 ^b	2,1 ^{ab}
	2	8,3 ^{ab}	1,8 ^b	1,7 ^{ab}	2,2 ^{ab}
	3	8,8 ^a	2,5 ^a	1,9 ^a	2,5 ^a
	4	7,9 ^b	1,9 ^b	1,7 ^{ab}	2,0 ^b

(Tretman 1 – kontrolna silaža; Tretman 2 – inokulant 2 g/t svježe mase; Tretman 3 – inokulant 3 g/t svježe mase; Tretman 4 – inokulant 4 g/t svježe mase; BMK – ukupan broj bakterija mliječne kiseline; UBP – ukupan broj plijesni; UBK – ukupan broj kvasaca; BAB – spore bakterija maslačne kiseline; a,b – vrijednosti označene različitim slovima značajno se razlikuju unutar stupca (P < 0,05))

U Blajman i sur. (2020.) gdje je kroz meta analizu obrađeno oko 1796 istraživanja na silažama, broj BMK detektiran u silažama lucerne (7,1 log₁₀ CFU/g) sličan je broju BMK kontrolne silaže na početku aeracije u ovom istraživanju (7,3 log₁₀ CFU/g). Najveći broj BMK u ovom istraživanju zabilježen je u tretmanima 2 i 3 što je logično jer je u navedene tretmane dodan inokulant (tretman 2: standardna koncentracija inokulanta 2 g/t svježe mase i tretman 3: uvećanje 50 % ili 1,5x standardne koncentracije inokulanta, 3 g/t svježe mase). Međutim, neočekivano, u tretmanu 4 u kojem je dodan inokulant u najvećoj koncentraciji (tretman 4: uvećanje 100 % ili 2x standardne koncentracije, 4 g/t svježe mase) broj BMK bio je niži, sličan kontroli (tablica 4.10.1.; uz iznimku na početku aeracije). Rezultati pokazuju da je u tretmanu 4 najvjerojatnije došlo do međusobne inhibicije BMK, jer se BMK natječu za isti supstrat pa suvišak koncentracije inokulanta često ima kontra efekt i usporava rast i aktivnost BMK (McDonald i sur. 1991.). Dodatno, povećana aktivnost homofermentativnih BMK koja je bila u kontroli i tretmanu 4, što je dokazano kroz viši sadržaj mliječne kiseline u navedenim

tretmanima (slika 4.3.1.) te niže sadržaje octene (4.4.1.) i propionske (4.5.1.) kiseline te etanola (4.8.1.), moguće je dovela do brzog pada pH što je inhibiralo aktivnost mikroorganizama, uključujući i heterofermentativne BMK. Naime, heterofermentativne BMK postaju aktivne tek nakon minimalno 30 dana fermentacije u silazama, što je vidljivo kroz konverziju mliječne u octenu kiselinu (Muck i sur. 2018.). Slično ovom istraživanju, Zhang i sur. (2009.) pokazuju kako su silaže inokulirane BMK rezultirale većim brojem BMK u usporedbi s kontrolom (5,38 log₁₀ CFU/g u kontroli vs. 5,86 log₁₀ CFU/g u silaži inokuliranoj s *Lentilactobacillus bucheri* te 5,89 log₁₀ CFU/g u silaži inokuliranoj s *Lactiplantibacillus plantarum*) u 90. danu siliranja. Korištenje inokulanta koji sadrži BMK isto utječe na mikrobiološki profil silaže tako da povećani broj BMK smanjuje broj kvasaca, plijesni i spora maslačne kiseline (Koc i sur. 2009.).

Broj kvasaca, plijesni i BAB prilikom otvaranja silosa vrlo je važan pokazatelj kvalitete silaže. Istraživanje Borreani i sur. (2018.) naglašava kako pri broju kvasaca > 5 log₁₀ CFU/g svježe mase, dolazi do vidljive pojave plijesni. U ovom istraživanju broj kvasaca u testiranim silazama bio je dosta niži od 5 log₁₀ CFU/g (tablica 4.10.1.) te je broj kvasaca, dodatno uz promjenu temperature (slike 4.1. – 4.4.) potvrda aerobne stabilnosti silaža tijekom sedmodnevne aeracije. Osim broja kvasaca, i broj plijesni u silazama u ovom istraživanju bio je niži od broja plijesni u silazama lucerne. Prosječan broj plijesni u meta analizi na 1796 istraživanja na silaži lucerne bio je 4,1 log₁₀ CFU/g (Blajman i sur. 2020.). Rezultati broja BMK, kvasaca i plijesni (tablica 4.10.1.) ukazuju na izvrsnu aerobnu stabilnost testiranih silaža u ovom istraživanju.

Silaže su najvažniji izvor BAB koje imaju izrazito negativan utjecaj na kvalitetu mlijeka i sira (Vissers i sur. 2007.), pri čemu su silaže lucerne zbog visokog pufernog kapaciteta lucerne te sporijeg pada pH i često povećane aktivnosti klostridija, podložne povećanom broju BAB (McDonald i sur. 1991.). Broj BAB u ovom istraživanju (tablica 4.10.1.) niži je od broja spora prisutnog u silazama (Vissers i sur. 2007.). Istraživanje Vissers i sur. (2007.) navodi kako je prosječni broj BAB u uzorcima silaža trava i kukuruza 3.0 log₁₀/g. te da broj spora u silaži kukuruza može varirati od < 1,5 log₁₀/g do > 7,0 log₁₀/g. Porast broja BAB u ovom istraživanju je očekivan jer je porast vezan uz aeraciju silaža. Aeracijom silaža reaktiviraju se aerobni mikroorganizmi koji metaboliziraju mliječnu kiselinu čime se uspostavljaju uvjeti za aktivaciju mikroorganizama koje je inhibirao nizak pH kao što su klostridije (Wilkinson i Davies 2013., Muck i sur. 2018.). Rezultati ovog istraživanja pokazuju blagi pad mliječne kiseline (slika 4.3.1.), blagi porast maslačne kiseline (slika 4.6.2.) i porast broja BAB (tablica 4.10.1.) tijekom aeracije. Dodatno, tretman 3 je tretman u kojem je bio najveći sadržaj maslačne kiseline i tretman u kojem je bio veći broj BAB (uz iznimku u 3. danu aeracije). Nažalost, u ovom istraživanju klostridije nisu određivane, međutim, broj spora BAB uz sadržaj maslačne kiseline izvrsni su pokazatelji aktivnosti klostridija u silazama (Vissers i sur. 2007., Muck i sur. 2018.).

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja utjecaja dodatka inokulanta na aerobnu stabilnost i promjene sadržaja glukoze, fruktoze, mliječne, octene, propionske, izomaslačne i maslačne kiseline, alkohola etanola, metanola i propanola te mikrobiološku kvalitetu prilikom sedmodnevne aeracije silaže lucerne dobiveni su sljedeći zaključci:

- Silaže lucerne kroz cijeli period istraživanja ostale su aerobno stabilne bez obzira na dodatak inokulanta i koncentraciju inokulanta
- Dodatak inokulanta ima značajan utjecaj na sadržaj svih promatranih šećera, kiselina i alkohola tijekom aeracije
- Uvećanje koncentracije inokulanta za 50 % rezultira sekundarnom aktivnosti klostridija tijekom aeracije
- Uvećanje koncentracije inokulanta za 100 % rezultira s izrazitom homofermentativnom aktivnosti BMK, čak i kada je u pitanju inokulant s kombinacijom homofermentativnih i heterofermentativnih BMK
- Inokulant je poželjno koristiti u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača jer ta koncentracija omogućava optimalnu aktivnost homofermentativnih i heterofermentativnih BMK te proizvodnju silaže s optimalnim sadržajem mliječne kiseline i HMK za aerobnu stabilnost

6. Literatura

1. Adesogan A. T., Salawu M. B. (2004). Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(9): 983-992
2. Blajman J. E., Vinderola G., Paez R. B., Signorini M. L. (2020). The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: a meta-analysis. *The Journal of Agricultural Science*. 158(1-2): 107-118
3. Borreani G., Tabacco E., Schmidt R. J., Holmes B. J., Muck R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3952-3979
4. Canale A., Valente M.E., Ciotti A. (1984). Determination of volatile carboxylic acids (C1–C5i) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35(11): 1178-1182
5. Canibe N., Kristensen N. B., Jensen B. B., Vils E. (2014). Impact of silage additives on aerobic stability and characteristics of high-moisture maize during exposure to air, and on fermented liquid feed. *Journal of applied microbiology*. 116(4): 747-760
6. Coblenz W. K., Muck R. E. (2012). Effects of natural and simulated rainfall on indicators of ensilability and nutritive value for wilting alfalfa forages sampled before preservation as silage. *Journal Dairy Sciences*. 95(11): 6635-6653
7. Da Silva N. C., Nascimento C. F., Campos V. M., Alves M. A., Resende F. D., Daniel J. L., Siqueira G. R. (2019). Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. *Animal Feed Science and Technology*. 251: 124-133
8. Danner H., Holzer M., Mayrhuber E., Braun R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1): 562- 567
9. Dawson T. E., Rust S. R., Yokoyama M. T. (1998). Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. *Journal of Dairy Science*. 81:1015-1021
10. DLG (2018). DLG Testing Guidelines for award use of the DLG Quality Mark for ensiling agents. <https://www.dlg.org/en/> – pristup 30.07.2023.
11. Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H., Van Wixselaar P. G. (2001). Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*. 56(4): 330-343
12. Drouin P., Tremblay J., Da Silva É. B., Apper E. (2022). Changes to the microbiome of alfalfa during the growing season and after ensiling with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lentilactobacillus hilgardii* inoculant. *Journal of Applied Microbiology*. 133(4): 2331-2347
13. Duvnjak M. (2016). Utjecaj hibrida i dodatka silaži na udio ukupnih i kapa zeina tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb
14. DZNM. (2001). HRN ISO 6496:2001. Stočna hrana - Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari

15. Filya I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*. 95(5): 1080-1086
16. Filya I., Muck R. E., Contreras-Govea F. E. (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*. 90(11): 5108-5114
17. Galić I. (2020). Spremanje silaže u bale omotane plastičnom folijom. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
18. Irawan A., Sofyan A., Ridwan R., Hassim H. A., Respati A. N., Wardani W. W., Jayanegara A. (2021). Effects of different lactic acid bacteria groups and fibrolytic enzymes as additives on silage quality. A meta-analysis. *Bioresource Technology Reports*. 14: 100654
19. ISO. (1998). ENG ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – colony – count technique at 30 degrees
20. ISO. (2008). ENG ISO 21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95
21. Ivetić A. M. (2017). Uticaj mikrobioloških inokulanata na hranljivu vrednost i aerobnu stabilnost silaže kukuruza i senaže lucerke. Sveučilište u Beogradu
22. Ke W. C., Yang F. Y., Undersander D. J., Guo X. S. (2015). Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfalfa silage ensiled with apple or grape pomace. *Animal Feed Science and Technology*. 202: 12-19
23. Koc F., Levent Ozduven M., Coskuntuna L., Polant C. (2009). The effects of inoculant lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of sunflower silage. *Poljoprivreda*. 15(2): 47-52
24. Krooneman J., Faber F., Alderkamp A. C., Elferink S. O., Driehuis F., Cleenwerck I., Vancanneyt M. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1, 2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(2): 639-646
25. Kung Jr L. (2010a). Aerobic stability of silage. In Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Crop/Cereal Silage Conference. vol. 2. Visalia. CA. University of California. Davis. CA
26. Kung Jr L. (2010b). Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. In Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference (pp:1-2). Visalia. CA. University of California. Davis. CA.
27. Kung Jr L., Shaver R. D., Grant R. J., Schmidt R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 4020-4033
28. Kung Jr L., Stokes M. R., Lin C. J. (2003a). Silage additives. U: *Silage science and technology* Ur (Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H.). 42: 305-360
29. Kung Jr L., Taylor C. C., Lynch M. P., Neylon J. M. (2003b). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86(1): 336-343

30. Kung L., Ranjit N. K. (2001). The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science*. 84:1149-1155
31. Leto J. (2015). Spremanje silaže. *Gospodarski list*, [online] <https://gospodarski.hr/rubrike/krmno-bilje/prilog-broja-spremanje-silaze/> (pristupljeno 20. travnja 2023.)
32. Liu Q. H., Dong Z. H., Shao T. (2018). Effect of additives on fatty acid profile of high moisture alfalfa silage during ensiling and after exposure to air. *Animal Feed Science and Technology*. 236: 29-38
33. Malkina I. L., Kumar A., Green P. G., Mitloehner F. M. (2011). Identification and quantitation of volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feedstuffs. *Journal of Environmental Quality*. 40(1): 28-36
34. McDonald P., Henderson A. R., Heron S. J. E. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe publications
35. Muck R. E., L. Kung Jr. 1997. Effects of silage additives on ensiling. *Field to Feedbunk*. U: Silage. NRAES99. NRAES, Ithaca, NY. 187-199
36. Muck R. E., Nadeau E. M. G., McAllister T. A., Contreras-Govea F. E., Santos M. C., Kung Jr L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3980-4000
37. NEN (Netherlands Normalisation Institute). (1994). NEN-ISO-6877: Milk and milk products – Detection of spores of butyric acid bacteria and determination of the content of spores of butyric acid bacteria. U: NEN 6877 (Vol. 6877, pp. 1 – 4). Netherlands Normalisation Institute, Delft, the Netherlands.
38. Nishino N., Uchida S. (1999). Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79(10): 1285-1288
39. Ogunade I. M., Martinez-Tupia C., Queiroz O. C. M., Jiang Y., Drouin P., Wu F., Adesogan A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 4034-4059
40. Pahlow G., Rammer C., Slotner D., Tuori M (2001). Ensiling of legumes. U: Legume silages for animal production. LEGSIL, Braunschweig, Germany.
41. Ranjit N. K., Kung L. Jr., (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*. 83: 526-535
42. Schmidt R. J., Hu W., Mills J. A., Kung Jr L. (2009). The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 92(10): 5005-5010
43. Sellers R. S. (2008). Glycerin as a feed ingredient, official definition(s) and approvals. *Journal of Animal Science*. 86(2): 392
44. Selwet M. (2020). Influence of inoculation with *Lactobacillus* on fermentation, production of 1, 2-propanediol and 1-propanol as well as Maize silage aerobic stability. *Open Life Sciences*. 15(1): 373-378
45. Suzzi G., Grazia L., Ferri G. (1990). Studies on isobutyric acid-producing bacteria in silage. *Letters in Applied Microbiology*. 10(2): 69-72

46. Vissers M. M. M., Driehuis F., Te Giffel M. C., De Jong P., Lankveld J. M. G. (2007). Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*. 90(2): 928-936
47. Weinberg Z. G., Ashbell G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2-3): 181-188
48. Weinberg Z. G., Ashbell G., Hen Y., Azrieli A. (1993). The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Microbiology*. 75(6): 512-518
49. Weinberg Z. G., Muck R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*. 19:53-68
50. Wilkinson J. M., Davies D. R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*. 68(1): 1-19
51. Zhang T., Li L., Wang X. F., Zeng Z. H., Hu Y. G., Cui Z. J. (2009). Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 965-971

7. Životopis

Vida Vertuš rođena je 27.05.1999. u Varaždinu. U Varaždinu završava IV.OŠ.Varaždin te dvojezičan smjer na Prvoj Gimnaziji Varaždin. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2018. godine. Aktivno se služi engleskim jezikom na C2 razini (položen FCE ispit) te njemačkim (A2) i španjolskim jezikom (A2). U osmom mjesecu 2021. godine završava preddiplomski studij animalne znanosti i stječe naziv univ. bacc. ing. agr. Kao koautor sudjeluje u radu „Selekcija i dobrobit svinja“ koji je objavljen u časopisu Stočarstvo. Tijekom preddiplomskog studija dobitnica je STEM stipendije te Varaždinske stipendije za uspješnost. Prilikom pisanja ovog rada završava diplomski studij Hranidba životinja i hrana, gdje je ostvaruje prosjek ocjena diplomskog studija 4,94 i ulazi u kategoriju 10 % najuspješnijih studenata na studiju. Dobitnica je STEM stipendije te Varaždinske stipendije za izvrsnost tijekom diplomskog studija. 2023. godine usavršavala se na stručnoj praksi u Barceloni (UAB) u sklopu Erasmus+ projekta gdje je sudjelovala na različitim projektima i postigla izvrsne rezultate. Po povratu u Hrvatsku dobiva Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad na temu „Odnos koncentracije inokulanta i parametara fermentacije u silaži lucerne“. Trenutno participira u istraživanju i pisanju znanstvenog rada s suradnji s fakultetom „Universitat Autònoma de Barcelona“.