

Vědecký výbor výživy zvířat

Silážní inokulanty

**Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
Doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

Praha, září 2010



Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,
PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

ISBN

978-80-7403-069-7

Obsah

Úvod	4
1. Siláž.....	5
1.2. Mikroorganismy v siláži	6
1.2.1. Epifytní mikroflóra.....	7
1.2.2. Přirozená mikroflóra siláže	7
1.3. Hodnocení siláže.....	13
1.4. Silážní přísady	14
2. Silážní inokulanty.....	15
2.1. Mikroorganismy v silážních inokulantech	16
2.1.1. Rod Lactobacillus.....	16
2.1.2. Rod Enterococcus	18
2.1.3. Rod Pediococcus.....	20
2.1.4. Rod Lactococcus	21
2.2. Mechanismus účinku inokulantů.....	22
2.2.1. Produkce kyseliny mléčné	22
2.2.2. Zlepšování aerobní stability.....	23
2.2.3. Detoxikační a inhibiční účinky	24
2.2.4. Silážní inokulanty jako zdroj probiotických bakterií.....	24
2.3. Komerční preparáty.....	25
2.3.1. Aplikace a skladování silážních inokulantů.....	26
2.3.3. Silážní inokulanty určené pro konzervaci kukuřice	26
2.3.3. Silážní inokulanty určené pro konzervaci vojtěšky a travních porostů	27
3. Vlastní pokus	28
3.1. Materiál a metody.....	28
3.1.1. Mikrobiologický rozbor komerčních preparátů.....	28
3.1.2. Identifikace bakterií vyizolovaných z komerčních preparátů.....	30
3.1.3. Laboratorní příprava siláže s obsahem bakterií izolovaných z komerčních preparátů a sledování přežívání bakterií v siláži	31
3.1.4. Reizolace a identifikace dodaných bakterií	32
3.2. Výsledky.....	32
3.2.1. Počty a druhy bakterií stanovené v komerčních silážních inokulantech.....	32

3.2.2. Stanovení počtu a identifikace bakterií v laboratorně připravené siláži.....	36
3.3. Závěr.....	41
4. Souhrn.....	42
5. Summary.....	42
6. Použitá literatura.....	44
7. Přílohy.....	51

Úvod

První zmínky o silážování jsou přibližně 3000 let staré a pocházejí ze starého Řecka. Slovo „siláž“ pravděpodobně pochází z řeckého „siros“ z kterého pravděpodobně vzniklo „silo“ a následně „silage“, „siláž“ atd. Prvotně vyráběné siláže měly nepochybně řadu vad, problémy musely být zejména s adekvátním utěsněním, a proto bylo hlavním konzervačním postupem pro krmiva po dlouhou, prakticky donedávna, sušení. Popularita siláže prudce vzrostla v posledním 50-60 letech.

Silážovaná a senážovaná zelená píce je dnes hlavním krmivem pro přežvýkavce jak v Evropě, tak v Severní Americe. Hlavním cílem silážování je konzervace zelené píce při současném udržení poměrně vysoké vlhkosti. Siláže jsou používány především jako náhrada pastvy v zimních měsících, avšak je možné i celoroční podávání.

Siláž a senáž je zdrojem živin, zejména vlákniny, vitamínů, organických kyselin a dalších mikrobiálních metabolitů a také minerálních látek. Na druhé straně, tak jako prakticky každé krmivo, může být zdrojem zdraví nebezpečných a technologicky nežádoucích mikroorganismů, toxických látek a faktorů působících metabolické poruchy hospodářských zvířat.

Přirozená mikroflóra siláže zahrnuje jak mikroflóru žádoucí (prospěšnou), tak i část mikroflóry nežádoucí. Společným znakem těchto mikroorganismů je to, že jsou zpravidla vždy (v různé míře) přítomny a je tedy nutno počítat s jejich pozitivní i negativní metabolickou aktivitou. Siláž je přirozeným zdrojem bakterií mléčného kvašení (BMK), z nichž řada může mít kromě technologických vlastností pro výrobu (konzervační vlastnosti) také příznivé účinky na zdravotní stav hospodářských zvířat, čímž naplňují definici probiotických bakterií. V širším slova smyslu jsou za probiotické bakterie někdy považovány i silážní inokulanty, kde se klasicky používají homofermentativní BMK (hlavním cílem je rychlé a důkladné primární kvašení – produkce kyseliny mléčné), v poslední době se stále více používají také heterofermentativní BMK, které kromě kyseliny mléčné produkují také kyselinu octovou, která zvyšuje aerobní stabilitu siláže. Jako homofermentativní BMK se používají hlavně *L. plantarum*, *E. faecium*, jako heterofermentativní BMK hlavně *L. buchneri* a *L. fermentum*. Hlavním cílem inokulantů je však konzervační činnost – produkce organických kyselin, zatímco pravé probiotické bakterie by měly být aktivní i v batoru a/nebo v dalších částech trávicího traktu. Nicméně u inokulantů byly prokázány i další

pozitivní účinky na zdraví zvířat. Mezi další efekty silážních inokulantů patří možné vlivy na nutriční hodnotu a stavitelnost siláže.

Navržená studie shrnuje poznatky o silážních inokulantech, informace o přežívání BMK v siláži a v bacheru. Součástí studie je také testování hlavních silážních inokulantů používaných v ČR a EU.

1. Siláž

Silážování a senážování je konzervace zelené píce pomocí bakterií mléčného kvašení za anaerobních podmínek. Pro úspěšné silážování je třeba splnit tři základní podmínky:

- a) Musí být přítomen dostatek zkvasitelných cukrů, tak aby konečné pH výrobku pokleslo na 4,0–4,2. Což je ovlivněno hlavně použitou surovinou. Nejlepší je kukuřice v mléčně-voskové zralosti. U některých surovin (vojtěška, luskoviny) jsou překážkou látky s pufrujícím účinkem (hlavně bílkoviny). Pokud je použita surovina na zkvasitelné cukry chudá (pasevní porosty) je možno tyto látky dodat (např. ve formě melasy, nebo zvýšit jejich obsah přidávkem hydrolytických enzymů (amylázy, hemicelulázy, celulózy).
- b) Přítomnost bakterií mléčného kvašení (BMK), hlavně jde o laktokoky, streptokoky, leukonostokoky, pediokoky, laktobacily, zejména *Lactobacillus plantarum*. BMK za anaerobních podmínek pomocí homo a heterofermentativního mléčného kvašení vytvoří kyselinu mléčnou, která prostoupí a konzervuje rostlinnou hmotu.
- c) Anaerobní podmínky jsou zajištěny tím, že rostlinná hmota je nařezána na drobné kousky (5-10 cm) a je důkladně utlačena v silážním žlabu – ideálně na hodnotu cca 600 kg/m³. Silážní žlab je po stranách částečně zakryt nejprve stranovými fóliemi (tloušťka 120-160 µm), na celý povrch se následně rozprostře podkladová fólie (tloušťka 40 µm), která dokonale přilne k povrchu a nakonec se aplikuje vlastní silážní fólie o tloušťce 125-200 µm. Na povrch je možno ještě umístit ochrannou síť proti divokým zvířatům. Nakonec se povrch rovnoměrně zatíží, přičemž místo „klasických“ ojetých pneumatik jsou vhodnější zátěžové rašlové pytle naplněné šterkem (Anonym 1).

Siláž můžeme dále rozdělit podle mnoha kritérií. Podle použité suroviny je nejčastější siláž kukuřičná, silážovat lze také travní a pasevní porosty, cukrovarské řízky, luskovinoobilné směsky a pařené brambory. Určitou kuriozitou je silážování méně kvalitních ryb („fish silage“) jako krmivo pro prasata.

Silážování zavadlé píce vede k vyšší výsledné sušině, což má za následek na jedné straně horší růst nežádoucích bakterií, ale na druhé straně také menší produkci kyseliny mléčné. Pokud se sušina blíží 40 % a pH 5,0, mluvíme o senáži, kde je konzervace zajištěna kombinací kyseliny mléčné (pH), osmotického tlaku a také přítomností CO₂. Vztah mezi sušinou a chemickým složením siláže je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Vztah mezi sušinou a chemickým složením siláže (podle Wilkinson, 2005, upraveno).

	Čerstvá píce	Zavadlá píce	
		1 den	2 dny
Sušina (g/kg čerstvé hmoty)	159	336	469
pH	3,7	4,1	4,9
Dusík (g/kg)	69	59	43
Vodorozpustné cukry (g/kg sušiny)	17	117	164
Kyselina mléčná (g/kg sušiny)	121	54	17
Kyselina octová (g/kg sušiny)	36	21	12
Kyselina máselná (g/kg sušiny)	0	0	0
Kyselina mléčná (g/kg z celkové kyseliny)	770	720	590

Siláž můžeme také dělit podle použité technologie, nejčastěji se používají silážní žlaby, což jsou betonové stavby o rozměrech např. 10 x 50 x 4 m (šířka x výška x délka), senáže se vyrábějí v úzkých a vysokých senážních věžích. Silážovat (senážovat) lze také v balících, kde je konzervovaná hmota zpravidla nejprve okyselená a poté zabalena strečovou fólií (Anonym 1).

1.2. Mikroorganismy v siláži

Mikroorganismy hrají v konzervačním procesu silážování klíčovou roli. Mikroflóra siláže se tradičně dělí na dvě skupiny: žádoucí (prospěšná) a nežádoucí mikroflóra. Stručně řečeno první skupinu zahrnují BMK. Do druhé pak patří bakterie účastníci se kažení siláže za anaerobních podmínek (klostridie a enterobakterie), nebo aerobních podmínek jako jsou kvasinky, plísně a listerie (Driehuis a Elferink, 2000). Nežádoucí mikroorganismy mohou buď snižovat kvalitu (obsah živin, chutnost) siláže, často však představují zdravotní riziko pro

zvířata a potažmo i pro člověka, a/nebo mají negativní vliv na kvalitu mléka a mléčných produktů (Wilkinson, 2005).

1.2.1. Epifytní mikroflóra

Mikroflóra siláže závisí především na složení tzv. epifytní mikroflóry na povrchu, rostlin (tabulka 2). Jak vyplývá z údajů, počty bakterií mléčného kvašení jsou nejvíce variabilní, což ospravedlňuje použití silážních inokulantů, počty koliformních bakterií kolísají také dramaticky v závislosti na intenzitě a způsobu hnojení. Muck (1989) sledoval populaci bakterií mléčného kvašení na povrchu vojtěšky před a po sklizni. Rostliny na poli měly velmi malý výskyt (méně jak 10 buněk na 1 g rostlinné hmoty). Bezprostředně po seči počet BMK stoupl na 51 buněk/g a během zavádání počty dále stouply až na 104/g při naskladňování do sila. Počet BMK také stoupá přímo úměrně s teplotou okolního vzduchu. Na povrchu kukuřice jsou v době mléčně-voskové zralosti počty BMK zhruba 10× vyšší oproti vojtěšce (Muck, 2000).

Pasebani et al. (2010) našli na povrchu pastevních porostů $8,3 \times 10^3$ buněk BMK/g a jako hlavní druhy byly nalezeny *Weissella confusa*, *W. paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* a *Lactococcus lactis*.

Tabulka 2: Složení epifytní mikroflóry (podle Mitřík, 2006, upraveno).

Skupina	Počet v log KTJ/g
Aerobní bakterie	> 7
Bakterie mléčného kvašení	1 – 6
Koliformní bakterie	3 – 6
Kvasinky	3 – 5
Plísňe	3 – 4
Klostridie (spory)	2 – 3
Bacily (spory)	2 – 3

1.2.2. Přirozená mikroflóra siláže

Přirozená mikroflóra siláže zahrnuje jak mikroflóru žádoucí (prospěšnou), tak i část mikroflóry nežádoucí. Společným znakem těchto mikroorganismů je to, že jsou zpravidla vždy (v různé míře) přítomny a je tedy nutno počítat s jejich pozitivní i negativní metabolickou aktivitou. Hlavní skupiny přirozené mikroflóry siláže uvádí tabulka 3.

Pokud proběhne celý proces silážování optimálním způsobem, uskuteční se pouze tzv. primární kvašení, pH poklesne na hodnotu 4,0-4,2, vytvoří se cca 1,7 % kyseliny mléčné, 0,7 % kyseliny octové a kyseliny máselné je přítomno do 0,3 % (Wilkinson, 2005). Takto vyrobená siláž je při správném skladování dlouhodobě stabilní a bez větších chemických změn vydrží nejméně 3-4 měsíce. Pokud z různých příčin (nedostatečná mikroflóra, obsah pufrujících látek, ale hlavně nedostatek zkvasitelných cukrů) neproběhne důkladně primární kvašení, zpravidla následuje tzv. sekundární kvašení, kterého se účastní hlavně klostridie a někdy také koliformní bakterie. Při sekundárním kvašení dochází ke zvýšení pH následkem fermentace dvou molekul relativně silné kyseliny mléčné či octové na jednu molekulu slabší kyseliny máselné a také proto, že kvašením aminokyselin a rozkladem bílkovin vzniká amoniak. Průběh primárního a sekundárního kvašení je graficky znázorněn v obrázku 1 a 2.

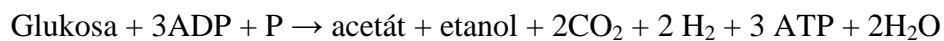
Tabulka 3: Hlavní skupiny mikroorganismů účastnících se fermentačních pochodů v siláži (podle McDonald et al., 1991).

Druh	Zdroj	Substrát	Metabolity
Enterobakterie (koliformní bakterie)	Splašky, chlévská mrva, půda	Vodorozpustné cukry	Kyselina octová, etanol, CO ₂ , amoniak
Kvasinky	Povrch rostlin, obiloviny	Vodorozpustné cukry	Etanol, CO ₂
Homofermentativní BMK	Povrch rostlin, obiloviny	Vodorozpustné cukry	Kyselina mléčná
Heterofermentativní BMK	Povrch rostlin, obiloviny	Vodorozpustné cukry	Kyselina mléčná, kyselina octová, etanol, manitol, CO ₂
Klostridie	Půda	Kyselina mléčná, bílkoviny, aminokyseliny	Kyselina máselná, kyselina octová, CO ₂ , H ₂ , aceton, butandiol, aminy, amoniak

V průběhu silážování se také mění složení dusíkatých látek a to nejenom činností klostridií jak je uvedeno v tabulce 3, ale omezenou proteolytickou aktivitu mají také laktobacily a v menší míře i ostatní BMK (Thomas a Thomas, 1985). Obsah bílkovin klesá ze

zhruba 90 % v surovině na méně než 60 % v siláži. Obsah aminokyselin naopak stoupá z cca 10 % na téměř 40 %. Následkem silážování také stoupá obsah amoniaku (z 0 na cca 5 %). K větším biochemickým změnám dochází nutně po otevření sila. Nejvíce aktivní jsou enterobakterie (koliformní bakterie) a BMK. Také může dojít k pomnožení kvasinek a plísní (Wilkinson, 2005).

Koliformní bakterie, nebo enterobakterie jsou zastoupeny *Escherichia coli* a příbuznými rody jako je *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Hafnia* a *Serratia*. Hlavní metabolickou činností v siláži je konverze glukosy na acetát a etanol podle rovnice (McDonald et al., 1991):



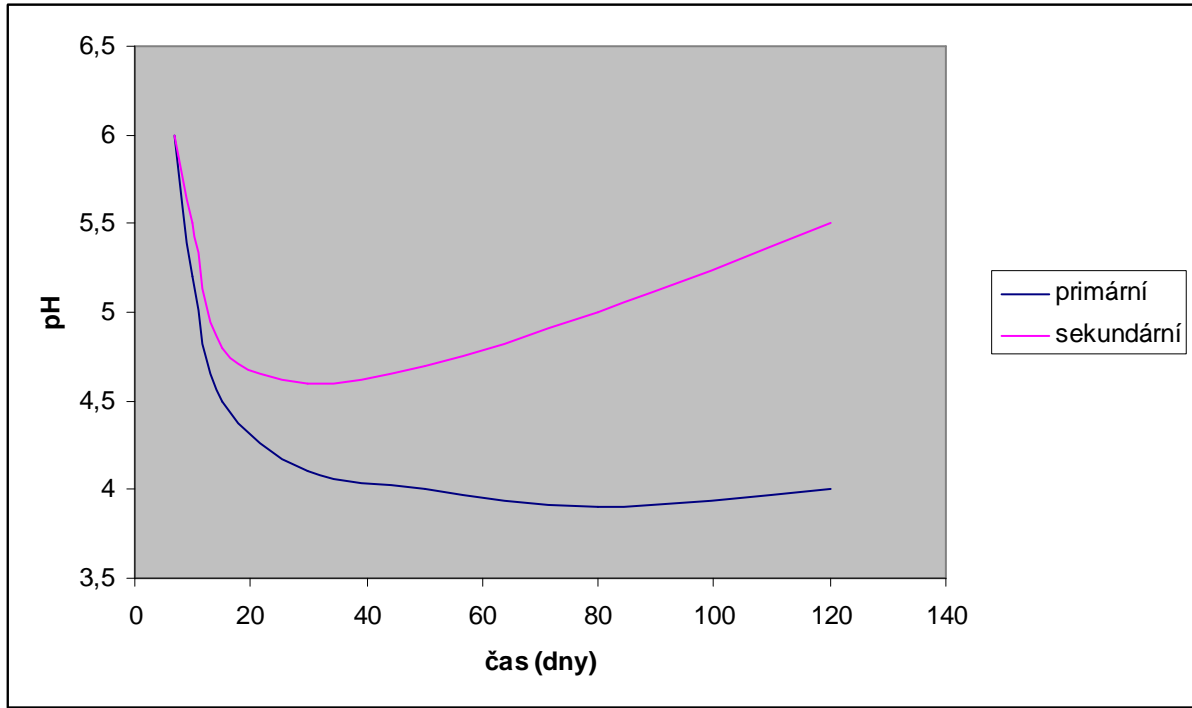
Jak vyplývá z rovnice v důsledku této fermentace dochází ke ztrátám uhlíku (ve formě plynu) a protože z jednoho molu glukosy vzniká pouze jeden mol acetátu, je proces okyselení nedostatečný. K dalším metabolickým aktivitám koliformních bakterií patří produkce biogenních aminů a redukce dusičnanů přes dusitany až na oxidy dusíku, které mohou ze sila unikat v podobě žlutohnědých plynů (Driehuis a Elferink, 2000). Koliformní bakterie se nemnoží při $\text{pH} < 5$, a proto je důležité rychlé okyselení při silážování.

Bakterie mléčného kvašení, které se uplatňují při silážování, patří hlavně mezi epifytní mikroflóru, což znamená, že se vyskytují na povrchu zelených rostlin. Jinak se BMK vyskytují také v trávicím traktu, ale v siláži dominují epifytní BMK a to vzhledem k použité surovině a konkurenčním výhodám (tolerance na osmotický tlak a ke kyslíku, acidotolerance, schopnost využívat určité substráty (McDonald et al., 1991). Při silážování se uplatňují tři skupiny BMK:

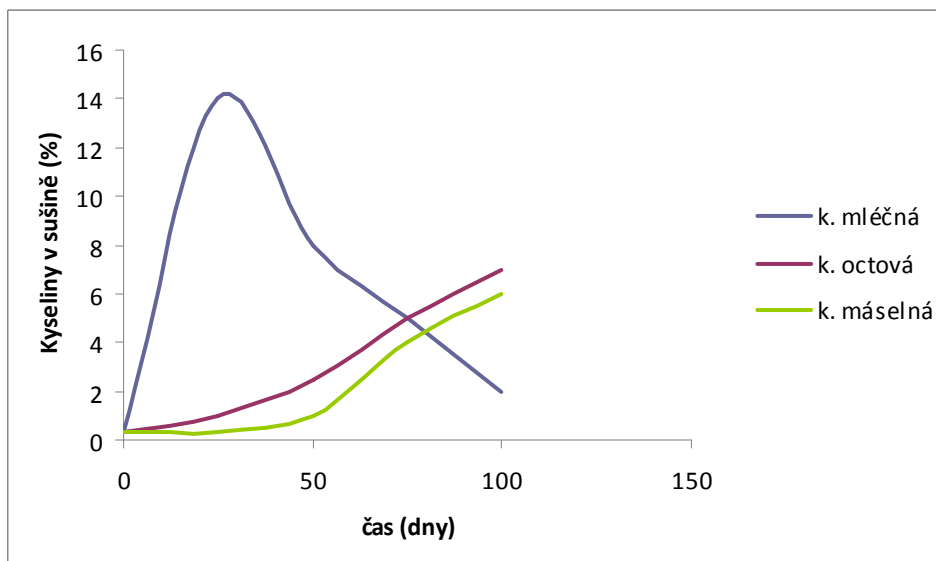
- Obligátně homofermentativní BMK
- Fakultativně heterofermentativní BMK
- Obligátně heterofermentativní BMK

Mezi obligátně homofermentativní BMK patří např. *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus damnosus* a *Lactococcus lactis*. Tyto bakterie jsou žádoucí mikroflórou siláže, a

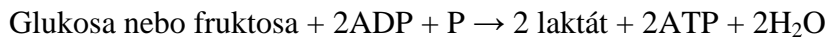
Obrázek 1: Charakteristické změny pH siláže v průběhu primárního a sekundárního kvašení (podle Wilkinson, 2005).



Obrázek 2: Změny v koncentracích organických kyselin v průběhu sekundárního kvašení (podle Wilkinson, 2005).



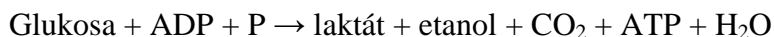
tudíž jsou často součástí silážních inokulantů. Jeden mol glukosy nebo fruktosy fermentují vždy na dva moly kyseliny mléčné podle rovnice:



Jak vyplývá z rovnice, nedochází ke ztrátám uhlíku, samozřejmě pokud nepočítáme možný únik silážních šťáv. Určitou nevýhodou obligátně homofermentativních BMK je, že většinou nejsou schopny využívat pentosy, např. xylosu.

Fakultativně heterofermentativní BMK jako *Lactobacillus plantarum* a *L. casei* patří mezi nejvíce žádoucí a nejdůležitější bakterie siláže, proto se rovněž používají jako silážní inokulanty. Poněkud menší význam (např. vzhledem k menší acidorezistenci) mají další fakultativně heterofermentativní BMK, jako je *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*. Fakultativně heterofermentativní BMK fermentují hexosy (glukosa, fruktosa) stejně jako homofermentativní mléčné bakterie, ale pentosy (xylosa, arabinosa) na laktát, acetát a někdy i etanol (Kandler a Weiss, 1986).

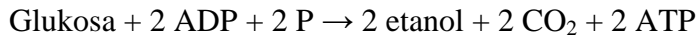
Poslední skupinou mléčných bakterií jsou obligátně heterofermentativní BMK jako je *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* a *Leuconostoc mesenteroides*. Tyto bakterie tvoří kromě kyseliny mléčné i další metabolity podle rovnic (Wilkinson, 2005):



Heterofermentativní mléčné bakterie jsou v siláži méně žádoucí, vzhledem k menší produkci kyselin. V poslední době je ale zdůrazňován pozitivní vliv kyseliny octové na aerobní stabilitu siláže a proto je *L. buchneri* také používán jako silážní inokulant (Kung et al., 2007).

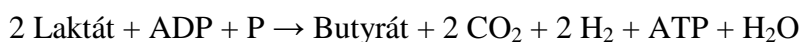
Kompletní analýzu BMK pomocí biochemických metod a s využitím analýzy 16S rDNA provedli Ennahar et al. (2003). Testovány byly izoláty ze silážované neloupané rýže. Celkově měly převahu homofermentativní druhy. Konkrétní četnost výskytu byla: *Lactobacillus plantarum* (24%), *Lactococcus lactis* (22%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (20%), *Pediococcus acidilactici* (11%), *Lactobacillus brevis* (11%), *Enterococcus faecalis* (7%), *Wessella kimchii* (3%) a *Pediococcus pentosaceus* (2%).

Kvasinky jsou eukaryotní, fakultativně anaerobní mikroorganismy. V siláži se vyskytují především rody *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces* a *Torulopsis*. Za anaerobních podmínek provádějí alkoholové kvašení podle rovnice (Wilkinson, 2005):



Alkoholové kvašení není pro silážování vhodné, protože nevzniká žádná kyselina a navíc dochází ke ztrátám uhlíku, navíc některé acidotolerantní kvasinky, jako jsou kandidy, mohou sekundárně fermentovat i kyselinu mléčnou. Po otevření sila kvasinky oxidují kyselinu mléčnou na vodu a oxid uhličitý a tak v důsledku stoupajícího pH připravují půdu pro kažení siláže dalšími mikroorganismy (Driehuis a Elferink, 2000).

Klostridie jsou sice v siláži považovány za nežádoucí, ale jsou prakticky vždy přítomné, účastní se v různé míře anaerobních pochodů, a proto je nutno je považovat za přirozenou mikroflóru. Jejich extrémní výskyt znamená vadu až znehodnocení siláže, ale přítomnost některých patogenních druhů (např. *Clostridium botulinum*) je spíše vzácná. Klostridie jsou téměř univerzálními obyvateli různých anaerobních prostředí jako je dno stojatých vod, kvašení odpadků na skládkách, zamokřené půdy, trávicí trakt zvířat a člověka, chlévská mrva, vyhnívací komory čistíren odpadních vod a také v různé míře siláž. Příčinou širokého rozšíření je široká škála metabolických aktivit klostridií (amylolytická, celulytická, proteolytická, lipolytická a další) a také fakt, že rod *Clostridium* je rozmanitý, zahrnující mnoho desítek druhů (Cato et al., 1986). V siláži jsou hlavními druhy *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* a *C. bif fermentans* (Driehuis a Elferink, 2000). V siláži se klostridie uplatňují zejména při sekundárním kvašení, když nedojde k rychlé tvorbě kyselin pH (pH > 4,6), kde jako substrát používají kyselinu mléčnou podle následující rovnice (Wilkinson, 2005):



Tato činnost je z hlediska kvality siláže vesměs negativní, protože dochází ke ztrátě uhlíku a ze dvou molekul poměrně silné kyseliny mléčné, vzniká jedna molekula slabší kyseliny máselné. Kromě této činnosti jsou klostridie schopné rozkládat také jednoduché cukry a polysacharidy. Metabolity jsou nejčastěji kyselina máselná, kyselina octová, CO₂ a H₂ (Cato et al., 1986). Méně často se v siláži a kyselém zelí může vyskytnout i druh *C. acetobutylicum*, který kromě plynů a kyselin produkuje i značné množství alkoholů (butanol,

etanol) a hlavně rozpouštědel (aceton, acetoin), potom může výrobek páchnout po acetonu (Cato et al., 1986; Kaprálek, 1986). Pokud v siláži převládnu druhy *C. tyrobutiricum* a *C. butyricum*, je metabolizována hlavně kyselina mléčná a sacharidy, pokud se pomnoží *C. sporogenes* a *C. bifermentans*, dojde také k silné proteolýze, hromadí se amoniak a dojde k tvorbě biogenních aminů (Driehuis a Elferink, 2000).

Ostatní mikroorganismy, které se v různé míře vyskytují v siláži, jsou octové bakterie, plísně, bacily a listerie. Všechny tyto mikroorganismy vesměs do anaerobních pochodů v siláži nezasahují, jsou to typičtí aerobové a v siláži se pomnožují v případě, že není dostatečně utěsněna, nebo po jejím otevření. Růst je většinou omezen na povrchovou vrstvu (10-20 cm), přičemž často může dojít k tvorbě toxických látek (Driehuis a Elferink, 2000).

1.3. Hodnocení siláže

Zcela jistě nejlepším znakem kvalitní siláže je následná efektivní produkce mléka a dobré přírůstky živé váhy krmených zvířat. Protože však produkční užitkovost hospodářských zvířat je výsledkem mnoha dalších faktorů, je třeba kvalitu siláže hodnotit pomocí buď organoleptických, nebo lépe s použitím rutinních laboratorních testů. Podle Wilkinson (2005) mezi doporučené laboratorní analýzy patří:

- stanovení sušiny – kde platí, že nižší obsah vede častěji k sekundárnímu kvašení, zatímco příliš vysoký obsah sušiny bývá spojován s náchylností k plesnivění,
- pH – dobře fermentovaná siláž má pH okolo 4. Obecně u dobře konzervované siláže platí, že čím vyšší sušina, tím vyšší pH,
- stanovení kyselin a alkoholu – hlavní je vysoký obsah laktátu, vysoký obsah etanolu má za následek horší aerobní stabilitu,
- stanovení stravitelnosti a energetické hodnoty – stravitelnost lze odvodit ze stanovení ligninu a vlákniny. Energetickou hodnotu vyjadřujeme jako metabolizovatelnou energii (ME). Obecně jsou hodnoty ME siláže nižší než u obilovin, ale vyšší než u čerstvé píce a sena,
- stanovení proteinů – používáme hrubý protein (dusík x 6,25) a dále různé formy stravitelného dusíku,
- organoleptické hodnocení – subjektivní stanovení barvy, textury, vůně a chuti.

Z dalších postupů je navrhován potencionální příjem siláže (když je siláž použita jako jediné krmivo). Složení ideální siláže uvádí tabulka 4.

Tabulka 4: Laboratorní analýza ideální siláže (Wilkinson, 2005).

Parametr	Ideální hodnota
Sušina (g/kg)	300–350
pH	4,0–4,2
Popeloviny (g/kg sušiny)	< 80
Hrubý protein (g/kg sušiny)	150–170
Kyselina mléčná (g/kg sušiny)	100–150
Kyselina octová (g/kg sušiny)	20–30
Kyselina máselná (g/kg sušiny)	0
Etanol (g/kg sušiny)	< 10
ME (MJ/kg sušiny)	> 11
Amonný dusík (g/kg celkového dusíku)	< 50
Aminokyselinový dusík (g/kg celkového rozpustného dusíku)	> 700

1.4. Silážní přísady

Do silážované suroviny je za určitých okolností vhodné vložit specifické přísady, které se v podstatě snaží vyrovnat chybějící faktory pro silážování (BMK, zkvasitelné cukry), nebo se snaží zabránit zkažení siláže (konzervační látky). I když siláž z kukuřice v mléčně voskové zralosti prakticky nepotřebuje žádné doplňky, i takovýto materiál může za určitých okolností podlehnout sekundárnímu kvašení. Např. během prudkého ochlazení (Wilkinson, 2005). Jako silážní přísady se používají (Spoelstra, 1991):

- Aditiva redukující kažení siláže (kyselina propionová, octová, mravenčí a sorbová, allicin)
- Aditiva zvyšující obsah dusíku (močovina)

- Aditiva zvyšující obsah zkvasitelných cukrů (melasa, hydrolytické enzymy)
- Silážní inokulanty (*Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri*, *Enterococcus faecium*, ostatní BMK)

Jak bylo výše uvedeno, nejsou silážní přídavky absolutně nezbytné. Rozsah použití těchto preparátů se mění od země k zemi, přičemž závisí na různých silážních technologiích, zeměpisných a klimatických podmínkách, ekonomické situaci a také tradici. Např. podle Wilkinson et al. (1996) byl rozsah použití silážních aditiv ve Finsku 100%, ve Velké Británii 25-65% a pouze 10% v Nizozemí.

2. Silážní inokulanty

Jako silážní inokulanty se používají především bakterie mléčného kvašení. Původně byly tyto organizmy selektovány z epifytní mikroflóry, později také z jiných zdrojů, jako jsou sýry a bacherová mikroflóra. Vhodné kmeny by měly splňovat řadu požadavků, které se postupně upřesňují (Starling a Whittenbury, 1963; Sharp et al., 1992, Kalač 2009):

- musí mít schopnost rychle růst v silážované hmotě a stát se dominantními mikroorganismy,
- měly by být homofermentativní, v poslední době se však stále více používají i heterofermentativní bakterie mléčného kvašení,
- tvoří kyselinu mléčnou (hlavní konzervační látka) a popř. kyselinu octovou (zvyšuje aerobní stabilitu),
- musí dobře snášet nízké pH (~4,0),
- musí zkvašovat zejména glukosu, fruktosu a sacharosu, popř. další oligosacharidy,
- nesmí vytvářet polysacharidy slizovité povahy,
- neměly by vytvářet manitol z fruktosy (vzhledem ke zhoršení chuťových vlastností),
- nesmí mít výraznější proteolytickou aktivitu a nesmí tvořit z aminokyselin (biogenní) aminy,
- nesmí dále utilizovat a pozměňovat přítomné organické kyseliny
- jsou pro zvířata zdravotně nezávadná.

2.1. Mikroorganismy v silážních inokulantech

Klasicky se používají homofermentativní BMK, v poslední době se stále více používají také heterofermentativní BMK, které kromě kyseliny mléčné produkují také kyselinu octovou. Jako homofermentativní BMK se používají hlavně *L. plantarum*, *E. faecium*, jako heterofermentativní BMK hlavně *L. buchneri* a *L. fermentum* (Weinberg et al., 2004; Jalc et al., 2009a; 2009b). Celkový přehled používaných silážních inokulantů je uveden v příloze 2.

Obecně lze říci, že více se používají druhy a kmeny vyskytující se primárně na povrchu zelených rostlin (*L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. fermentum*), než druhy primárně se vyskytující v trávicím traktu (*E. faecium*, *Streptococcus bovis*). Použití enterokoků je vysvětlitelné asi především dobrými technologickými vlastnostmi, jako je dobré přežívání po lyofilizaci a během skladování. Typicky „bachorové“ mikroby jako např. *Streptococcus bovis* byly sice testovány (Jones et al., 1991), dokonce s údajně slibnými výsledky, které však nebyly potvrzeny dalšími, nezávislými studiemi, a proto se ani v praxi neužívají. Příloha 1 uvádí příklady pokusného použití bakterií jako silážních inokulantů.

Obvyklá dávka inokulantů je 10^5 - 10^6 živých buněk bakterií na jeden gram píce. Vyšší dávky nemají význam, neboť bakterie se v příznivých podmínkách velmi rychle pomnoží (Huisden et al., 2009). Komerční preparáty jsou zpravidla lyofilizované a obsahují 10^{10} - 10^{11} živých buněk v 1 gramu. Dávkují se zpravidla řádově kilogramy na 100 tun silážované suroviny.

V následujících kapitolách budou popsány rody bakterií, které jsou nejčastěji používané jako silážní inokulanty.

2.1.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je velmi rozsáhlým a rozmanitým bakteriálním rodem. Bakterie tohoto rodu se vyskytují na rostlinách, v trávicím traktu a vagíně živočichů, v mléčných a masných výrobcích, ve fermentovaném rostlinném materiálu, v kazících se potravinách a v odpadních vodách. Některé druhy se uplatňují jako nežádoucí kontaminanty piva, vína a masných výrobků. Jsou součástí čistých potravinářských kultur, pekařského kvásku a používají se jako inokulanty do siláží nebo jako probiotické bakterie. Podle posledního vydání Bergey's manual of systematic bacteriology zahrnuje 96 druhů a několik poddruhů (Hammes a Hertel, 2009). Laktobacily jsou grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé, anaerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky. Morfologie buněk je velice rozmanitá. Vyskytují se ve formě dlouhých rovných nebo mírně prohnutých nepohyblivých tyčinek až po krátké kokotyčinky. Délka tyčinek a stupeň zakřivení je

závislý především na stáří kultury a složení živného média (Jacques et al., 1980). Laktobacily jsou fakultativně anaerobní, jejich růst jde podpořen v anaerobním prostředí, v prostředí se sníženým parciálním tlakem kyslíku nebo v atmosféře s 5-10 % CO₂. Striktně anaerobní prostředí působí inhibičně. Bakterie tohoto rodu jsou kataláza negativní, ale přesto jsou některé kmeny schopny rozkládat peroxid vodíku pomocí pseudokatalázy nebo mohou v přítomnosti hemu produkovat i katalázu.

Laktobacily rostou nejlépe v kyselém prostředí s hodnotou pH 5,5 – 6,4, růstová rychlost je snížena v neutrálním prostředí a laktobacily jsou inhibovány alkalickým pH. Růst ustává v závislosti na určitém druhu či kmeni také při pH 3,6–4,0. Pro většinu druhů jsou optimální mezofilní teploty kolem 40 °C. Některé kmeny rostou i při 15 °C, respektive při 5 °C. Termofilní laktobacily mohou růst i při teplotách 55 °C a nerostou v prostředí s teplotou pod 15 °C (Hammes a Hertel, 2009).

Laktobacily patří mezi bakterie mléčného kvašení a zahrnují homo i heterofermentativní druhy. Metabolismus je adaptován na komplexní organické substráty, a proto jsou laktobacily velmi náročné na obsah živin v kultivačních médiích. Vyžadují sacharidy jako zdroje energie a uhlíku, ale také nukleotidy, peptidy, aminokyseliny, mastné kyseliny a vitamíny (Elli et al., 2000). Laktobacily jsou úspěšně kultivovány a izolovány hlavně z MRS a Rogosa agarů. Nutriční požadavky jsou druhově či kmenově specifické, což se využívá při jejich identifikaci. Hlavní metabolickou cestou přeměny hexos u homofermentativního kvašení je Embden-Meyerhofova dráha, při níž vznikají z 1 molu hexosy 2 moly kyseliny mléčné. Homofermentativní laktobacily nemají enzym fosfoketolázu, proto nejsou schopny štěpit pentózy na glukonát. Patří mezi ně například druhy *L. delbrueckii* nebo *L. acidophilus*. Během heterofermentativního rozkladu vzniká 6-fosfoglukonátovou cestou z 1 molu hexosy 1 mol kyseliny mléčné, 1 mol etanolu nebo kyseliny octové a 1 mol CO₂. Heterofermentativní laktobacily fermentují pentosy pentoso-fosfátovou drahou na kyselinu mléčnou a octovou. Patří mezi ně například *L. kefir* a *L. reuteri*. Poslední skupinou laktobacilů podle způsobu metabolismu jsou fakultativně heterofermentativní laktobacily, ty produkují, v případě zkvašování hexos, výhradně kyselinu mléčnou Embden-Mayerhofovou drahou. Při rozkladu pentos uvolňují navíc kyselinu octovou, etanol a CO₂ (Hammes a Hertel, 2009).

Laktobacily, stejně jako ostatní bakterie mléčného kvašení, mají schopnost inhibovat jiné mikroorganismy, což se uplatňuje v konzervaci potravin a krmiv a v ochraně zdraví lidí a zvířat. Primárním mechanismem je snižování pH produkcí silných organických kyselin, tento efekt je však podporován tvorbou dalších antimikrobiálních látek, jejichž produkce je druhově či kmenově specifická a je ovlivněna i podmínkami prostředí (Ouweland, 1998). Flavoproteiny

katalizují tvorbu peroxidu vodíku, který v mléce prostřednictvím laktoperoxidasy reaguje s thiokyanátem za vzniku hypothianitu, který inhibuje funkce membrán a některé reakce glykolýzy (Kamau et al., 1990). Dalším mechanismem antimikrobiálního působení je syntéza bakteriocinů. Druhy *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. collinoides* a *L. coryniformis* produkují reuterin, který má široké spektrum účinku, jak proti bakteriím, tak mikroskopickým houbám a prvokům (Schnürer a Magnusson, 2005). Pyroglutamovou kyselinu s aktivitou proti *Bacillus subtilis* a pseudomonádám produkují *L. casei*, *L. helveticus* a *L. delbrueckii* (Mucchetti et al., 2002). Grampozitivní bakterie potlačuje reutericyklin vznikající, mimo jiné v kvásku, při růstu *L. reuteri*.

Laktobacily lze identifikovat, podobně jako ostatní bakterie, na základě fenotypových testů, např. pomocí stanovení fermentačních a enzymových profilů nebo analýzou konfigurací kyseliny mléčné vznikající během metabolismu. V posledních letech ovšem vzrůstají požadavky na přesné taxonomické zařazení bakterií používaných při výrobě potravin a krmiv, proto jsou pro identifikaci stále častěji používány genotypizační metody. Pro získání spolehlivějších výsledků je vždy vhodné kombinovat více metod, použít tzv. polyfázický přístup. Z genotypových metod je za nejspolehlivější považována celogenomová DNA-DNA hybridizace (Rosselló-Mora a Amann, 2001). Jedná se však o metodu, kterou nelze využívat pro rutinní a rychlé identifikace, k těmto účelům jsou výhodnější komparativní analýzy sekvencí 16S a 23S rRNA genů (Amann et al., 1995), druhově specifická PCR (Dickson et al., 2005) nebo restriční analýza amplifikované rDNA (ARDRA; Bouton et al., 2002).

2.1.2. Rod *Enterococcus*

Enterokoky zahrnují grampozitivní, fakultativně anaerobní, kataláza negativní, nesporulující koky. Koky jsou ovoidního tvaru, vyskytující se samostatně, v párech nebo krátkých řetězcích, buňky bývají protáhlé ve směru řetězku. Dříve byly zařazovány do rodu *Streptococcus*. Odděleny byly na základě výsledků DNA-DNA hybridizačních studií. Celkem rod *Enterococcus* zahrnuje 34 druhů. Od streptokoků se odlišují rezistencí k poměrně vysokému pH, snášejí i hodnotu 8,5. Dobře rostou na krevním agaru, na kterém vytvářejí šedobílé kolonie bez hemolýzy. Kolonie jsou vždy pravidelné a kruhové s hladkým povrchem, a to až do 5 mm v průměru. Kmeny některých druhů mohou být pohyblivé pomocí malých bičíků (Švec a Devriese, 2009).

Enterokoky jsou fakultativně anaerobní s preferencí anaerobních podmínek. Několik druhů vyžaduje přítomnost CO₂. Hemolytická aktivita je variabilní a do značné míry závislá na druhu. Mohou růst v hypertonickém prostředí s 6,5% koncentrací NaCl a rovněž při nízké teplotě

10 °C. Optimální teplota pro růst většiny druhů je při 35 – 37 °C. Mnoho druhů je schopno růst při 42 °C a někdy i při 45 °C. Přežívají půlhodinové zahřátí na 60 °C. Enterokoky jsou velmi odolné vůči vysychání, některé kmeny snášejí až 40 % žluči v prostředí. Jsou chemoorganotrofní a mají vysoké nutriční požadavky. Disponují kvasným metabolismem, jsou homofermentativní a produktem fermentace glukózy je L (+) kyselina mléčná. Enterokoky mohou zkvašovat nejrůznější substráty. Hlavní cestou tvorby energie je tvorba kyseliny mléčné z glukózy přes Embden-Meyerhof-Parnas dráhu. Za aerobních podmínek je glukóza metabolizována na kyselinu octovou, butanol a CO₂. Při pH 5,0–6,0 převádí *Enterococcus faecalis* pyruvát na laktát. V neutrální nebo mírně zásadité pH je pyruvát převeden na kyselinu mravenčí, etanol a acetát v poměru 2:1:1. Při nedostatku živin je pyruvát přeměněn na etanol a kyselinu octovou (Garg a Mital, 1991). Druh *E. faecium* může oxidovat glycerol na kyselinu octovou, CO₂ a malé množství peroxidu vodíku. Energii mohou získávat také prostřednictvím degradace některých aminokyselin, jako jsou arginin, tyrosin, serin nebo fenylalanin. I když enterokoky mají vysoké nutriční požadavky, jejich růst na běžně používaných médiích je obvykle bohatý. Na Slanetz-Bartley agaru vytvářejí kaštanově hnědé kolonie. Vyžadují několik aminokyselin, vitamin B a purinové a pyrimidinové báze (Švec a Devriese, 2009).

U enterokoků se často nacházejí plazmidy, které většinou kódují rezistenci k antibiotikům a faktory virulence (Paulsen et al., 2003). Rezistence k antibiotikům může být kódována i na transpozómech (Weaver, et al., 2002). Přesto, že jsou enterokoky komenzálové člověka a zvířat, patří mezi důležité podmíněně patogenní mikroorganismy. Navíc vykazují poměrně značnou rezistenci k antibiotikům. Byly izolovány při infekcích močových a žlučových cest, dýchacího traktu a z hemokultur při bakteriální endokarditidě (Teixeira a Facklam, 2003). Enterokoky se přirozeně vyskytují v trávicím traktu člověka a zvířat. Jsou součástí normální mikroflóry tlustého střeva, ale lze je prokázat i ve střevě tenkém. Jejich přítomnost v dalších prostředích je považována za kontaminaci z trávicího traktu živočichů. Mohou se vyskytovat na rostlinném materiálu, více na květech než listech, kde se mohou částečně adaptovat a množit (Müller et al., 2001). V hygienické mikrobiologii a vodohospodářské praxi se pokládají za indikátory fekálního znečištění nejen potravinářských výrobků, ale i pitné nebo povrchové vody (Godfree et al., 1997). Enterokoky jsou často nalézány v potravinách, zejména živočišného původu, jako je mléko, mléčné kysané výrobky a fermentované salámy. Ač je jejich přítomnost považována za sekundární kontaminaci, mohou mít pozitivní efekt a přispívat ke vzniku aroma během zrání výrobků. Jsou používány také jako probiotika (Giraffa, 2002).

Enterokoky, hlavně *E. faecium* a *E. faecalis*, produkují bakteriociny zvané enterociny, které jsou aktivní proti ostatním enterokokům a dalším bakteriím včetně listerií a klostridií (Ott

et al., 2001). Produkce je vázaná jak na plasmidy, tak chromozomální DNA. Enterocin produkující kmeny byly izolovány z mléčných výrobků, fermentovaných masných výrobků, zeleniny a dalšího rostlinného materiálu (Franz et al., 1999).

2.1.3. Rod *Pediococcus*

Pediokoky jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní koky vyskytující se samostatně, v párech nebo tvoří tetrády. Rod *Pediococcus* zahrnuje 9 druhů: *P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. cellicola*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* a *P. stilesii*. Pro identifikaci je možné kromě fenotypových testů použít sekvenaci 16S rRNA (Barney et al., 2001), ribotypizaci (Santos et al., 2005), náhodnou amplifikaci polymorfní DNA (PCR-RAPD; Fujii et al., 2005) nebo elektroforézu v pulzním poli (PFGE; Simpson et al., 2006). Za zlatý standard je ovšem stále považována DNA-DNA hybridizace (Franz et al., 2006). Vzhledem k tomu, že není vyvinuto plně selektivní kultivační prostředí pro stanovení pediokoků, je možné použití kvantifikace pomocí PCR v reálném čase (Real-time PCR; Stevenson et al., 2005). Pediokoky mají podobné požadavky na živiny a prostředí jako ostatní BMK, proto je těžké je od sebe odlišit. Pro izolaci jsou tedy používána semiselektivní kultivační prostředí. Simpson et al. (2006) vyvinuly medium selektivní pro pediokoky (*Pediococcus* Selective Medium, PSM) pro stanovení *P. acidilactici* a *P. pentosaceus* v krmivech a v silážních inokulantech. Jedná se o MRS agar s přidavkem novobiocinu, vankomycinu, nystatinu a ampicilinu.

Pediokoky neredukují nitráty, jsou kataláza negativní, ale asi 50 % kmenů druhu *P. pentosaceus* izolovaných z mléka a sýrů vykazuje slabou aktivitu katalázy. Jsou schopny růstu v rozmezí pH 5-9, optimální kultivační teplota 25-35 °C. Pediokoky se řadí mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení, z glukosy tvoří DL-laktát, pravděpodobně Embden-Mayerhofovou drahou. Atypický metabolismus má *P. dextrinicus*, který produkuje L(+) formu kyseliny mléčné z glukosy přes fruktoso-1,6-difosfát, a proto by mohl být v budoucnu navržen jako samostatný rod. Kmeny pediokoků produkují různý poměr α a β glukosidasy v závislosti na teplotě, pH a přítomnosti etanolu a cukrů v prostředí (Grimaldi et al., 2005).

Některé pediokoky produkují termostabilní bakteriociny zvané pediociny, které jsou aktivní většinou proti listeriím. Jedná se o malé proteiny o velikosti méně než 10 kDa (Rodrigues et al., 2002). Některé kmeny mohou být oportunně patogenní a způsobovat infekce u lidí (Barton et al., 2001). Pediokoky se přirozeně vyskytují na rostlinách, zejména ovoci. Podílí se na fermentaci rostlinného materiálu, jako je siláž, kukuřice, okurky a olivy,

ale také masných výrobků. Uplatňují se jako kontaminanty piva a jiných alkoholických nápojů a jako mlékařské kultury používané pro výrobu sýrů s tvorbou ok. Byly izolovány z různých částí trávicího traktu, včetně slin, zvířat a lidí (Holzapfel et al., 2009).

2.1.4. Rod *Lactococcus*

Jedná se o grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, mikroaerofilní, kataláza negativní koky mléčného kvašení s homofermentativním metabolismem. Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytují se ve dvojicích, párech nebo řetězcích. Laktokoky patří do čeledi *Streptococcaceae* a na základě porovnání 16S rRNA sekvencí byly jasně odlišeny od streptokoků a ostatních bakterií mléčného kvašení (Schleifer a Ludwig, 1995). Rod *Lactococcus* zahrnuje 5 druhů *Lc. garvieae*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* a *Lc. lactis* se třemi poddruhy *lactis*, *cremoris* a *hordniae* (Teuber, 2009).

Laktokoky jsou mezofilní a rostou v teplotním rozmezí 10-45 °C, některé jsou schopny množení i při 7 °C, kultivace se pak prodlužuje na 10-14 dní (Sakala et al, 2002). Jsou náročné na živiny a požadují komplexní média s dostatečným obsahem aminokyselin a vitamínů. Jsou kultivovány na M17 médiu v mikroaerofilním prostředí. Podobně jako v případě pediokoků, při kultivačním stanovení rostou na médiích pro laktokoky i příbuzné koky. Jejich vzájemné odlišení je možné pomocí jednoduché analýzy fermentačních produktů vznikajících z glukosy. Laktokoky produkují L(+) laktát, pediokoky DL-laktát a leukonostoky D(-) kyselinu mléčnou společně s CO₂, kyselinou octovou a etanolem. Kultivace laktokoků je možná i za aerobních podmínek, vznikají však vysoce toxické sloučeniny kyslíku jako je superoxid, peroxid vodíku a vodíkové radikály. Ačkoliv jsou laktokoky kataláza negativní, mají jiné enzymy štěpící tyto produkty, které jsou aktivovány přítomností kyslíku v prostředí. V komplexním médiu s obsahem hemu je *L. lactis* dokonce schopen respiračního metabolismu (Gaudu et al., 2002). Kromě *Lc. lactis* subsp. *cremoris* snáší laktokoky až 4 % soli v prostředí. Optimální pH je pro ně neutrální, ale růst je možný i v prostředí s pH 4,5.

Laktokoky mají fermentativní metabolismus a jako hlavní produkt z glukosy cestou glykolýzy tvoří L(+) kyselinu mléčnou. Častá je produkce exopolysacharidů složených z galaktosy, glukosy a ramnosy, které mají technologický význam při výrobě sýrů a kysaných mléčných výrobků. Syntéza těchto polysacharidů je kódována na plazmidech, které byly kompletně osekvenovány (van Kranenburg et al., 2000). Plazmidy jsou u laktokoků běžně přítomny a kódují důležité metabolické funkce jako je transport laktózy, degradace kaseinu, funkce permeáz (Gasson, 1983), dále rezistenci k bakteriofágům a produkci bakteriocinů. Bakteriociny jsou látky proteinové povahy a jsou schopny potlačovat bakterie blízké příbuzné

produkčnímu kmeni. Laktokoky produkují bakteriociny třídy I, tedy lantibiotika a třídy II, tedy nelantibiotické malé termostabilní proteiny (Nes et al., 1996). Nejznámějším laktokokovým bakteriocinem je nisin produkovaný *L. lactis* ssp. *lactis*. Nisin potlačuje široké spektrum grampozitivních bakterií tím, že perforuje cytoplazmatickou membránu a je znám ve dvou variantách A a Z. Je používán jako potravinářský konzervant proti *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, ale i dalším klostridiím a grampozitivním bakteriím (Teuber, 2009).

Vyskytují se na rostlinách, zvířatech a v živočišných produktech. Nejvýznamnější je jejich využití v mlékařském průmyslu jako startovacích kultur. Uplatňují se také při fermentaci rostlinného materiálu a jsou přidávány do silážních inokulantů. Z technologického hlediska jsou u laktokoků nejdůležitější vlastnosti tvorba kyseliny mléčné z laktosy, produkce diacetylu z citrátu, který dodává výrobkům aroma a částečná proteolýza uplatňující se u zrajících sýrů (Tauber, 2009). Druh *L. garvieae* je lidským i animálním patogenem a způsobuje mastitidy u skotu a hemoragické septikémie u ryb (Vela et al., 2000). *L. piscium* je kontaminantem vakuově baleného chlazeného masa (Sakala et al., 2002).

2.2. Mechanismus účinku inokulantů

Hlavním úkolem bakterií v silážních inokulantech je fermentovat monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy za tvorby **kyseliny mléčné**. V poslední době se dává čím dál větší význam také určité produkci kyseliny octové, která zvyšuje **aerobní stabilitu** siláže po otevření sila. Některé BMK mají také **detoxikační účinky** na mykotoxiny. Konečně siláž je do určité míry také zdrojem živých mikroorganismů, a proto může být považována za eventuální **zdroj probiotických mikroorganismů**. Mezi méně prokázané, nebo sporné účinky inokulantů patří redukce ztrát živin v silu (která snad funguje při homofermentativním mléčném kvašení) a zlepšení stravitelnosti potravy, hlavně vlákniny (Muck, 2000).

2.2.1. Produkce kyseliny mléčné

Produkce kyseliny mléčné je hlavním úkolem homofermentativních BMK (hlavním cílem je rychlé a důkladné primární kvašení – produkce kyseliny mléčné). U prvních inokulantů se zpravidla používal pouze jeden kmen BMK, nejčastěji *L. plantarum* a *E. faecium*. Prvotní idea byla, že nejdůležitější je co největší podíl kyseliny mléčné a co nejmenší produkce kyseliny octové jako vedlejšího produktu heterofermentativního mléčného kvašení (McDonald, 1981). Jako inokulanty se tedy začaly používat homofermentativní

bakterie mléčného kvašení, které však byly občas neúspěšné ze dvou důvodů. Za prvé v důsledku nedostatku zkvasitelných cukrů. Druhým důvodem může být konkurenční divoká mikroflóra (Jones et al., 1991). Jako zkvasitelné cukry jsou využívány hlavně volná glukosa a fruktosa, bakterie obsažené v inokulantech by měly také využívat sacharosu, fruktosany a pentosany (Kalač, 2009).

2.2.2. Zlepšování aerobní stability

V poslední době se stále více používají také heterofermentativní BMK, které kromě kyseliny mléčné produkují také kyselinu octovou, která zvyšuje aerobní stabilitu siláže. Jako homofermentativní BMK se používají hlavně *L. plantarum*, *E. faecium*, jako heterofermentativní BMK hlavně *L. buchneri* a *L. fermentum* (Weinberg et al., 2004; Jalc et al., 2009a; 2009b).

V metaanalýze (Kleinschmit a Kung, 2006), ve které bylo analyzováno 43 experimentů ze 23 publikací byly rozděleny siláže do tří kategorií: 1) neošetřené (kontrolní siláže, 2) siláže ošetřené *L. buchneri* v koncentraci <100 000 KTJ/g a 3) siláže ošetřené koncentrací větší než 100 000 KTJ/g. Přídavek bakterie snižoval obsah kyseliny mléčné, přičemž pokles byl přímo úměrný u kukuřičné siláže na rozdíl od senáží. Inokulace se také projevila signifikantním zvýšením obsahu kyseliny octové a to přímo úměrně dávce u všech siláží. Účinek na aerobní stabilitu se projevila snížením výskytu kvasinek přímo úměrným na dávce. U některých senáží nebyly kvasinky prakticky vůbec detekovatelné. Obecně byl výskyt kvasinek v negativní korelaci s koncentrací kyseliny octové. Neošetřená siláž se v průměru zkazila po 25 h expozice vzduchu. Na druhé straně menší dávky *L. buchneri* prodloužily aerobní stabilitu na 35 h, vysoké dávky dokonce až na 503 h. Výsledkem shrnutí řady prací (Elferink et al., 2001; Holzer et al., 2003; Kleinschmit a Kung, 2009; Kung et al., 2007) je závěr, že inokulace siláže pomocí *L. buchneri* snižuje pH a koncentraci kyseliny mléčné, zatímco obsah kyseliny octové stoupá, stejně jako se zvyšuje aerobní stabilita. Účinek většinou stoupá s počáteční (inokulační) dávkou a použití je vhodné zejména pro kukuřičné siláže o nižší sušině.

Podle firmy Pioneer (Anonym1) se *Lactobacillus buchneri* LN40177 od ostatních kmenů odlišuje tím, že je schopen produkovat specifické enzymy (mezi jinými např. ferulát esterázu), které zvyšují stravitelnost silážované hmoty. Dochází údajně ke štěpení ligninové vazby buněčné stěny. Tento způsob je určen pro silážování pícnin také pro bioplynové stanice.

2.2.3. Detoxikační a inhibiční účinky

Hernandez-Mendoza et al., (2009) izolovali kmeny *Lactobacillus casei* ze sýra, lidské stolice, fermentovaných nápojů a také z kukuřičné siláže. Všechny kmeny byly schopny v podmínkách *in vitro* vázat aflatoxin B1. Tato schopnost byla ještě zvýšena po působení žluče, což dává určitou naději na probiotický účinek *in vivo*. Broberg et al. (2007) zase analyzovali téměř dvacet metabolitů laktobacilů izolovaných ze siláže a zjistili, že 3-fenylmléčná a 3-hydroxykaprinová kyselina mají antifugální aktivitu. Gollop et al. (2005) uvádějí, že siláže s přísadkou inokulantů měly oproti kontrolním silážím vyšší antibakteriální aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Micrococcus luteus*. Nutno však podotknout, že se nejedná o hlavní bakterie kazící siláž, zajímavější by byl inhibiční účinek např. proti *C. tyrobutyricum*.

2.2.4. Silážní inokulanty jako zdroj probiotických bakterií

Podle Fullera (1989): „Probiotika jsou živé mikrobiální krmné doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenoty“. Při aplikaci probiotik přežvýkavcům je třeba přihlížet významně k věku zvířat. Mikroflóra bacheru je podstatně hůře ovlivnitelná, a proto použití probiotik přichází v úvahu spíše u mladých zvířat. U mladých zvířat v období mléčné výživy není vyvinut bacher a rovněž složení potravy je jiné, tzn. méně vlákniny, více proteinů a snadno zkvasitelných sacharidů. Problémem jsou podobně jako u selat průjmová onemocnění, která se v četných pokusech podařilo eliminovat pomocí aplikace BMK, hlavně *Lactobacillus acidophilus*, další laktobacily a enterokoky z ostatních bakterií potom *Bacillus toyoi* (Wallace and Newbold, 1992). Z telat byly také často izolovány bifidobakterie (Scardovi, 1986), avšak existuje pouze jedna starší práce o aplikaci bifidobakterií telatům (Abe et al., 1995). Chybí podrobnější studie o kvantitativním výskytu bifidobakterií u telat, podle našich údajů jsou počty těchto bakterií u mladých přežvýkavců vysoké a dokonce se v tomto směru podobají lidským kojencům (Rada et al., 2006). Siláž je přirozeným zdrojem BMK, z nichž řada může mít kromě technologických vlastností pro výrobu (konzervační vlastnosti) také příznivé účinky na zdravotní stav hospodářských zvířat, čímž naplňují definici probiotických bakterií. V širším slova smyslu jsou za probiotické bakterie někdy považovány i silážní inokulanty. Hlavním cílem použití inokulantů je však konzervační činnost – produkce organických kyselin, zatímco pravé probiotické bakterie by měly být aktivní i v bacheru a/nebo v dalších částech trávicího traktu. Nicméně inokulantům byly prokázány další pozitivní účinky na zdraví zvířat. O přežívání a aktivitě silážních bakterií v trávicím traktu je velmi málo poznatků. Laktobacily a ostatní mléčné bakterie jsou

sice pravidelně přítomny v bacheru, ale jedná se o jiné druhy, než které se podílejí na silážování (Kandler a Weiss, 1986). Weinberg et al. (2003, 2004) testovali schopnost BMK, vesměs silážních inokulantů, přežít v bacherové tekutině. BMK byly schopny v bacherové tekutině přežít, což autoři považují za první krok ke studiu probiotického potenciálu BMK pro přežvýkavce. Na druhé straně některé práce poukazují na pozitivní účinek silážních inokulantů na zdraví a užitkovost zvířat (Keady a Steen, 1994, 1995). Tyto práce však nejsou podpořeny mikrobiologickými rozbory, a proto nelze přesvědčivě určit případný mechanismus účinku. Navíc výsledků je málo a nejsou jednoznačné, např. Sanderson (1993) nenašel žádný vliv inokulantů na stravitelnost vlákniny. Možné probiotické účinky silážních mikroorganismů je tedy třeba dále studovat.

2.3. Komerční preparáty

Na českém trhu je dostupné velké množství silážních přísad s obsahem bakteriálních inokulantů. Některé příklady jsou uvedeny v příloze 2. Komerční přísady na bázi bakterií lze rozdělit do dvou základních skupin podle plodin, do kterých jsou přidávány, na inokulanty pro konzervaci vojtěšky a travních porostů a na preparáty určené pro kukuřici. Existují také výrobky, které jsou lze použít pro více různých plodin a pro výrobu směsných siláží.

Silážní inokulanty obsahují různý poměr homo a heterofermentativních bakterií mléčného kvašení. V preparátech jsou heterofermentativní bakterie zastoupeny v množství 0 až více než 70 %. Někteří výrobci nabízejí speciální směsi bakterií nejen pro konkrétní plodiny, ale také pro určité obsahy sušiny silážovaném materiálu. Například pro fermentaci pícnin s vysokým podílem sušiny jsou vybírány osmotolerantní kmeny bakterií mléčného kvašení.

Při použití silážních inokulantů deklarují výrobci urychlení fermentace, v některých případech i na 2-3 týdny. Zlepšení fermentace rostlinného materiálu a prodloužení trvanlivosti siláže. Dochází k nižšímu úbytku sušiny během zrání siláže a ke snížení odtoku silážních šťáv. Měla by být zajištěna lepší aerobní stabilita materiálu při jeho odkrytí. Produkce velkého množství organických kyselin, hlavně mléčné a octové, zajišťuje potlačení rozvoje klostridií, nedochází tedy k sekundární fermentaci, a při použití silážních inokulantů by mělo dojít k inhibici většiny kvasinek. Siláž s dodanými bakteriálními kulturami vykazuje nižší obsah amoniaku, kyseliny máselné a alkoholů. Zlepšení chutnosti rostlinného materiálu vede k zvýšení příjmu krmiva zvířaty, krmivo je také lépe stravitelné, dochází k zvýšení konverze živin a to vše se projeví ve zlepšení užitkovosti zvířat.

Ovšem i při používání silážních inokulantů musí být dodržena správná technologie přípravy rostlinného materiálu. Silážovaná hmota musí být vždy dobře udusána, tak aby byl vytěsněn vzduch, a musí být skladována v dobře utěsněných silech, silážních žlabech, balících nebo vacích. Použití přípravků nemůže vykompenzovat technologické chyby během procesu silážování.

2.3.1. Aplikace a skladování silážních inokulantů

Silážní inokulanty jsou zpravidla dodávány jako lyofilizovaný prášek s obsahem bakterií 10^{10} - 10^{11} bakterií na 1 gram výrobku. Aplikují se ve formě vodného roztoku do rostlinné řezanky. V případě zpracování kukuřice dochází k aplikaci na čerstvou rostlinnou hmotu již během řezání. U travních porostů a vojtěšky se inokulant přidává až při sběru materiálu, to znamená po zavadnutí hmoty. Konečná aplikační dávka je většinou 10^5 - 10^6 na 1 gram silážované hmoty. Přípravky některých výrobců obsahují stejné druhy bakterií, rozdíl je pouze v aplikační dávce, která bývá pro vojtěšku a traviny 3x vyšší než pro kukuřičnou siláž. V některých silážních inokulantech jsou kromě bakterií obsaženy také enzymy, pak je využití určeno právě podle druhu použitého enzymu. Vodný roztok doporučují výrobci připravit těsně před použitím a spotřebovat do 6 hodin. V nutném případě je možné roztok uchovávat po dobu 24 hodin při teplotě do 10 °C. V originálních neotevřených obalech je možné inokulanty skladovat obvykle 9-18 měsíců při 4-8 °C, doba trvanlivosti se prodlužuje při -20°C na 12-24 měsíců v závislosti na výrobku.

2.3.3. Silážní inokulanty určené pro konzervaci kukuřice

Preparáty pro konzervaci kukuřice obsahují jeden nebo více různých druhů homo či heterofermentativních laktobacilů, mléčné koky jsou přidávány v menší míře. Mezi nejčastěji používané laktobacily patří: *L. plantarum* a *L. buchneri*, některé přípravky ale obsahují i další druhy, zejména jde o: *L. brevis*, *L. casei* a *L. rhamnosus*. Část silážních inokulantů obsahuje kromě laktobacilů také koky. Nejčastěji jde o druh *E. faecium*, dále jsou používány blíže neurčené pediokoky nebo *P. pentosaceus* a *P. acidilactici*, v menší míře pak *Lc. lactis*.

V případě použití silážních inokulantů s obsahem koků a laktobacilů, na začátku fermentačního procesu působí zejména koky jako startovací kmeny. Na ně navazují laktobacily, které fermentační proces dokončují. Rychlý pokles pH zajistí konzervaci krmiva.

Prvním z testovaných komerčních silážních inokulantů byl Tekrosil K (Tekro, Uničov) určený pro konzervaci kukuřičné siláže. Lze jej využít jak při zpracování celých rostlin, tak při výrobě siláže z kukuřičných palic. Obsahuje dva kmeny homofermentativních

bakterií mléčného kvašení, na počátku fermentace působící *P. acidilactici* a navazující *L. plantarum*. Výrobek neobsahuje žádné přidané enzymy a konzervace je zajištěna výhradně enzymy bakterií.

Další ze sledovaných inokulantů do kukuřičné siláže byl přípravek Pioneer® 11CFT (Pioneer, Břeclav), kde je deklarován obsah dvou druhů bakterií a to *L. buchneri* a *L. casei*. Během procesu silážování dochází k narušení ligninových vazeb rostlinných buněčných stěn enzymy produkovanými heterofermentativní *L. buchneri*. Tento mechanismus umožňuje využití většího množství živin rostlinné hmoty. Enzymaticky narušená vláknina je lépe degradovaná bakteriemi bacheru. Jak homofermentativní *L. casei*, tak *L. buchneri* zajišťují během procesu fermentace vznik dostatečného množství kyselin konzervujících rostlinný materiál.

2.3.3. Silážní inokulanty určené pro konzervaci vojtěšky a travních porostů

Komerčně dostupné silážní inokulanty pro konzervaci vojtěšky a travních porostů obsahují většinou širší spektrum homo i heterofermentativních bakterií mléčného kvašení než inokulanty určené pro kukuřici. Vždy je přítomen buď jeden nebo víc kmenů laktobacilů, často jsou kombinovány s mléčnými koky, zejména pak pediokoky. Nejčastěji obsaženým druhem laktobacilů je jednoznačně *L. plantarum*. Dále jsou používané druhy: *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. casei* a *L. rhamnosus*, výjimečně jsou do komerčních přípravků přidávány *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. collinoides* nebo *L. cellobiosus*. Laktobacily jsou nejvíce kombinovány s *E. faecium* nebo *P. pentosaceus*, méně často jsou používány *Lc. lactis* a *P. acidilactici*, výjimečně pak s *P. freudenreichii*.

Přípravky určené pro konzervaci těžko silážovatelných plodin jako jsou vojtěška a travní porosty obsahují často kromě bakterií také enzymy, které naštěpí rostlinné polysacharidy a zpřístupňují cukry pro bakteriální kultury. Jedná se hlavně o celulázy, pektinázy, hemicelulázy a xylanázy. Přítomné bakterie pak působí stejně jako při výrobě kukuřičné siláže.

V této studii byly testovány 3 výrobky určené pro konzervaci vojtěšky, dalších bobovitých rostlin a travních porostů. Inokulant Biomin® BioStabil Plus (Biomin Czech, Havlíčkův Brod) obsahuje tři kmeny bakterií mléčného kvašení a neobsahuje enzymy. Bakterie *E. faecium* BIO34 (DSM3530) se v silážované hmotě intenzivně množí na počátku

fermentačního procesu při pH 6,5-5,5. Následuje rozvoj kmene *L. plantarum* IFA92 (DSM19456), který pH dále snižuje. Obě tyto homofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují kyselinu mléčnou. Heterofermentativní *L. brevis* IFA96 (DSM19457) vytváří vedle kyseliny mléčné také kyselinu octovou, která přispívá k udržení aerobní stability siláže po zahájení jejího odběru.

Dalším z testovaných výrobků byl Sila-Bac® Luzerne (Pioneer, Břeclav) určený pro vojtěškové senáže. Přípravek neobsahuje enzymy a jsou v něm deklarovány dva kmeny *L. plantarum* ATCC55943 a ATCC 55944. Jedná se o kmeny selektované speciálně pro vojtěšku, které s maximální efektivitou využívají cukry a přeměňují je na kyselinu mléčnou, čímž dochází k razantnímu snížení pH v krátké době po naskladnění hmoty. Oba kmeny přispívají ke snižování stupně proteolýzy v siláži.

Poslední sledovaný silážní inokulant byl Sila-Bac® Kombi (Pioneer, Břeclav) určený pro travní siláže. Jedná se o přípravek s dvojím účinkem. Zatímco homofermentativní bakterie *L. plantarum* ATCC53187 a *E. faecium* ATCC55593 přispívají produkcí kyseliny mléčné ke správnému průběhu fermentace, produkty heterofermentativní bakterie *L. buchneri* ATCC2494 zlepšují aerobní stabilitu siláže. Jde hlavně o kyselinu octovou, propionovou a 1,2-propandiol. V počáteční fázi fermentace se uplatňují enterokoky a následuje kvašení sacharidů působením laktobacilů.

3. Vlastní pokus

3.1. Materiál a metody

3.1.1. Mikrobiologický rozbor komerčních preparátů

Bylo testováno 5 komerčně dostupných preparátů s deklarovaným obsahem živých bakterií od 3 různých dodavatelů (tabulka 5). Jednalo se o silážní inokulanty obsahující jak homo, tak heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, určené pro konzervaci vojtěšky, bobu, jetele, jetelotravních a travních porostů, kukuřice a dalších krmiv.

Počty bakterií byly stanoveny kultivačně na selektivních pěstebních prostředích. Bylo odebráno 10 g preparátu a převedeno do 90 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid), vzorek byl

sériově anaerobně naředěny ve vialkách se stejným médiem do konečného poměru 1:10⁸ g/ml. Bujóny byly připraveny metodou roll-tube. Příslušně naředěné vzorky byly umístěny na Petriho misky ve třech opakováních a zality příslušným kultivačním médiem. Pro určení

Tabulka 5: Počty (log KTJ/g) a druhy bakterií deklarované v testovaných komerčních silážních inokulantech.

Preparát	Výrobce/ dodavatel	Určený pro konzervaci	Deklarované počty bakterií	Deklarované druhy bakterií
Tekrosil K	Tekro (Praha)	kukuřice	10,80 všech bakterií	<i>L. plantarum</i> <i>P. acidilactici</i>
BioMin® BioStabil Plus	BioMin Czech (Havlíčkův Brod)	bobovitých lipnicovitých	10,70 všech bakterií (poměr homo a heteroferm. 1:1)	<i>E. faecium</i> <i>L. brevis</i> <i>L. plantarum</i>
Sila-Bac® Luzerne	Pioneer (Břeclav)	vojtěšky	10,80	<i>L. planarum</i>
Sila-Bac® Kombi	Pioneer (Břeclav)	travních porostů	11,00 9,70 9,70	<i>L. buchneri</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecium</i>
Pioneer11CFT	Pioneer (Břeclav)	kukuřice	11,00 10,00	<i>L. buchneri</i> <i>L. casei</i>

celkového počtu bakterií mléčného kvašení (BMK) ve všech výrobcích byl použit Rogosa agar (Oxoid) o pH 6,2. Jednotlivé skupiny bakterií byly stanoveny jen u výrobků, kde byly deklarovány. Laktobacily byly kultivovány na Rogosa agaru okyseleném ledovou kyselinou octovou na pH 5,5. Agar M17 (Oxoid) byl použit pro stanovení pediokoků a Slanetz-Bartley (Oxoid) agar pro stanovení enterokoků. Kultivace probíhala při 37 °C 72 hodin anaerobně v případě Rogosa a M17 agarů a 48 hodin aerobně v případě Slanetz-Bartley

agaru. Byly spočítány typické kolonie a stanoven počet bakterií. Z každého vzorku a média bylo vyizolováno 5 kmenů, které byly namnoženy v příslušných bujonech a identifikovány.

3.1.2. Identifikace bakterií izolovaných z komerčních preparátů

Izoláty byly identifikovány na rodovou úroveň na základě morfologie buněk a Gramovy reakce. Kmeny laktobacilů a pediokoků byly podle postupu popsáním výrobcem charakterizovány pomocí API 50 CHL kitu (BioMérieux, Francie) a identifikovány počítačovým programem Apiweb (BioMérieux, Francie). Kmeny enterokoků byly identifikovány s použitím kitu SteptoTest24 (Pliva-Lachema, ČR). U druhů *L. casei*, *L. plantarum*, *E. faecium* a *P. acidilactici* byla identifikace potvrzena druhově specifickou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), seznam použitých primerů je uveden v tabulce 6. Pro *L. brevis* a *L. buchneri* nebyla PCR použita, protože podle dostupných zdrojů nejsou pro tyto druhy vyvinuty specifické primery.

Tabulka 6: Seznam druhově specifických PCR primerů, jejich sekvence a použité annealingové teploty.

Druh	Primer	Sekvence nukleotidů (od 5' do 3')	Teplota annealingu	Zdroj
<i>L. casei</i>	PrI	CAGACTgAAAgtCTgACgg	62 °C	Walter et al., 2000
	CasII	gCgATgCgAATTTCTTTTC		
<i>L. plantarum</i>	Lfpr	gCCgCCTAAggTgggACAgAT	58 °C	Walter et al., 2000
	PlanII	TTACCTAACggTAAATgCgA		
<i>E. faecium</i>	EnfF	gCAAaggCTTCTTAgAgA	50°C	Dutka-Malen et al., 1995
	EnfR	CATCgTgTAAgCTAACTTC		
<i>P. acidilactici</i>	PdaF	CTgAATgAgATTTTAACACgAA	57 °C	Cai et al., 1999
	PdaR	AgTgCCAaggCATCCACC		

PCR amplifikace specifického úseku 16S rDNA byla provedena pomocí termocykleru T3000 (Biometra, USA). Reakční směs (celkem 25 µl) pro amplifikaci obsahovala 12,5 µl DreamTaqTM Green PCR Master Mixu (Fermentas, Německo), 0,3 µl každého primeru v koncentraci 100 ng/µl (Proligo, Francie) a DNA vyizolované z čistých kultur pomocí QIAamp DNA mini kitu (Qiagen). Do požadovaného objemu byla směs doplněna Water nuclease-freee (Fermentas). Byly použity programy s následujícími teplotními profily: počáteční denaturace 95 °C po dobu 5 minut; následovalo 35 cyklů: denaturace 30 s při 95 °C,

annealing 30 sekund při teplotě uvedené v tabulce č. , prolongace 60 s při 72 °C; a poslední krok 5 minut při 72 °C. PCR produkty byly separovány gelovou elektroforézou (OWL B2, Thermo, USA) na 1% agarózovém gelu s přídavkem GelRed (Biotium, USA) a analyzovány systémem GelDoc (BioRad, USA).

3.1.3. Laboratorní příprava siláže s obsahem bakterií izolovaných z komerčních preparátů a sledování přežívání bakterií v siláži

Pro laboratorní přípravu siláže byla použita vojtěšková řezanka sklizená 8. 6. 2010. K rostlinnému materiálu byly přidány kmeny *L. plantarum* Tekrosil K, *Pediococcus* Tekrosil K, *E. faecium* Biomin® BioStabil Plus a *L. plantarum* Sila-Bac® Luzerne v celkovém množství 2×10^8 (5×10^7 každého kmene) na 1 kg rostlinné hmoty. Množství inokulovaných bakterií odpovídá množství, které doporučují výrobci při přípravě siláže za provozních podmínek. Před použitím bakterií, byli z izolátů připraveni rifampicin rezistentní mutanti (RRM) deskovou gradientovou metodou (Rada et al. 1995). Tato vlastnost umožnila odlišit podané kmeny od bakterií přirozeně přítomných v siláži. Hermeticky uzavíratelné skleněné lahve (6 ks.) byly naplněny po 0,5 kg řezanky s bakteriemi a uzavřeny. Byl připraven stejný počet sklenic bez použití silážních inokulantů, které sloužily jako kontrola. Sklenice byly umístěny do tmavé místnosti s konstantní teplotou 23 °C.

Ve dnech 14, 22, 30, 49 a 63 po založení siláže byla použita vždy jedna sklenice s inokulanty a jedna kontrolní sklenice pro mikrobiologický rozbor. Bylo odebráno 10 g siláže, převedeno do 90 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid) se skleněnými perlami a vzorek byl 10 minut homogenizován. Siláž byla sériově anaerobně naředěna ve vialkách se stejným médiem do konečného poměru $1:10^8$ g/ml. Bujóny byly připraveny metodou roll-tube. Příslušně naředěné vzorky byly umístěny na Petriho misky ve třech opakováních a zality příslušným kultivačním médiem. Byly stanoveny celkové počty bakterií na Wilkins-Chalgren (Oxoid), kultivace probíhala 24 hodin, při 37 °C anaerobně. Dále pak celkové počty BMK, laktobacily, enterokoky a pediokoky pomocí selektivních pěstebních prostředí stejně, jako je popsáno v kapitole 4.1.1. Pro detekci RRM byla použita stejná média navíc s přídavkem rifampicinu v koncentraci 80 mg/l. Všechna stanovení byla provedena ve třech opakováních a statistické rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou byly vyhodnoceny pomocí t-testu. Během fermentace bylo měřeno pH siláže a koncentrace kyseliny mléčné pomocí přístroje Reflektoquant® (Merck, Germany).

3.1.4. Reizolace a identifikace aplikovaných bakterií

Z agarů s přidavkem rifampicinu byly odebrány kolonie, namnoženy v příslušném bujónu, byla prověřena čistota a morfologie kultury a byla izolovaná DNA pomocí QIAamp DNA mini kitu (Qiagen). Pro ověření identity re-izolovaných RRM z jednotlivých agarů byla použita metoda náhodné amplifikace polymorfní DNA (PCR-RAPD). Pro PCR-RAPD reakci bylo použito: 12,5 μ l DreamTaqTM Green PCR Master Mixu (Fermentas, Německo), 7,5 μ l Water nuclease-freee (Fermentas), 2 μ l DNA a 3 μ l náhodného primeru v koncentraci 100 ng/ μ l (Proligo, Francie). Ve 3 různých reakcích byly použity 3 různé primery, jednalo se o primery podle Sakata (2002): 173 (5' GTGACGCCGC 3') a podle Mättö (2004): OPA-2 (5' TGCCGAGCTG 3') a OPA-13 (5'CAGCACCCAC 3'). PCR-RAPD reakce probíhala podle postupu popsaneho autory. Pro elektroforetickou separaci amplifikovaných produktů byl použit 1,5% agarózový gel s přidavkem GelRed (Biotium, USA). Separace probíhala na horizontální elektroforéze (OWL B2, Thermo, USA) při konstantním napětí 2 V.cm⁻¹. DNA fragmenty byly vizualizovány a analyzovány pomocí Gel-Doc systému (BioRad, USA).

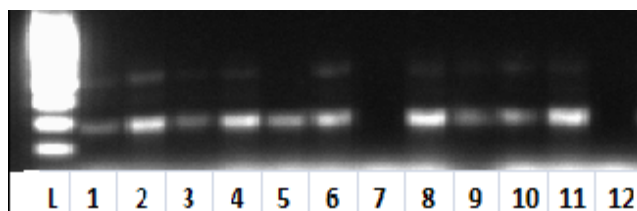
3.2. Výsledky

3.2.1. Počty a druhy bakterií stanovené v komerčních silážních inokulantech

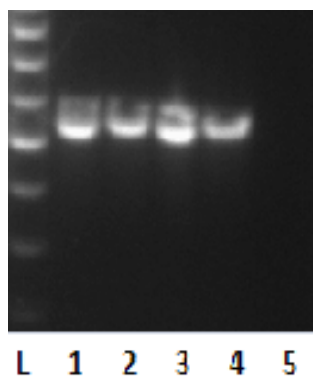
Na obalu výrobku určeného pro silážování kukuřice Tekrosil K (Tekro, Praha) byl deklarován obsah *L. plantarum* a *P. acidilactici* v celkovém množství 10,80 log KTJ/g. Kultivačně stanovené celkové počty bakterií odpovídaly množství uvedenému na obalu výrobku (tabulka 7). Na druhovou úroveň byly identifikovány 2 kmeny laktobacilů. Pomocí biochemických souprav byly určeny jako *L. plantarum* (tabulka 7). Identifikace byla potvrzena druhově specifickou PCR, kdy došlo při amplifikaci k namnožení specifického úseku DNA (obrázek 3). Z výrobku byly vyizolovány také koky, které se ovšem na druhovou úroveň nepodařilo identifikovat. Podle programu Apiweb odpovídaly fermentační profily druhu *L. plantarum*, což je jednoznačně nesprávná identifikace, protože se jednalo o koky. Při porovnání námi stanovených výsledků testů zkvašování cukrů s výsledky uvedenými Holzapfel et al. (2009) nebyla nalezena shoda ani s jedním druhem pediokoků. Ani při použití PCR primerů specifických pro *P. acidilactici* nedošlo k namnožení produktu.

Inokulant Biomin® BioStabil Plus je určený pro konzervaci vojtěšky, bobu, jetele, jetelotravních a travních porostů, kukuřice GPS a dalších krmiv. Měl by obsahovat celkem 10,70 log KTJ/g bakterií mléčného kvašení, homofermentativní (*E. faecium* a *L. plantarum*) a heterofermentativní (*L. brevis*) v poměru 1:1. Po kultivaci bylo ve výrobku stanoveno celkové množství BMK 10,42 log KTJ/g, což je méně, než je uvedeno na obalu. Homo a

Obrázek 3: PCR produkty získané při použití páru primerů specifických pro *L. plantarum* (L – DNA ladder; 1 + 2 – laktobacily Tekrosil K; 3 + 4 – laktobacily Sila-Bac® Luzerne; 5 + 6 – laktobacily Sila-Bac® Kombi; 7 + 8 – laktobacily Biomin® BioStabil Plus; 9 + 10 – laktobacily (malé kolonie) Pioneer 11CFT; 11 – pozitivní kontrola *L. plantarum* CCM2381; 12 – negativní kontrola *E. faecium* Biomin® BioStabil Plus).



Obrázek 4: PCR produkty získané při použití páru primerů specifických pro *E. faecium* (L – DNA ladder; 1 + 2 – enterokoky Biomin® BioStabil Plus; 3 + 4 – enterokoky Sila-Bac® Kombi; 5 – negativní kontrola *L. plantarum* CCM2381).



heterofermentativní laktobacily nebylo možné od sebe při kultivaci odlišit. Poměr enterokoků a laktobacilů byl přibližně 1:1. Za použití biochemických kitů se podařilo určit všechny tři druhy bakterií, které měly být ve výrobku obsaženy (tabulka 7). U *L. plantarum* a *E. faecium* byla navíc identifikace potvrzena metodou PCR (obrázky 3 a 4). Správné zařazení *L. brevis* nemohlo být molekulárně-biologicky potvrzeno, jelikož nejsou dostupné specifické primery pro tento druh. Kmen byl pro kontrolu použit do reakce obsahující primery pro *L. plantarum* a podle předpokladů nedošlo k amplifikaci PCR produktu (kmen 7, obrázek 3).

Dalším testovaným výrobkem byl Sila-Bac® Luzerne určený pro silážování vojtěšky, u něhož je deklarován obsah jednoho druhu BMK a to *L. plantarum* v počtu 10,80 log KTJ/g. Tento druh byl stanoven jak biochemicky, tak metodou PCR v množství 11,25 log KTJ/g (tabulka 7, obrázek 1). Přípravek tedy splňuje údaje uvedené výrobcem.

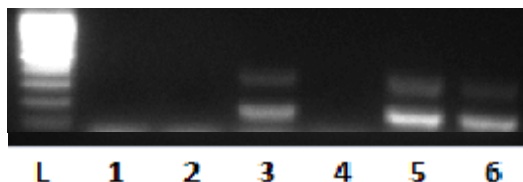
Tabulka 7: Počty (log KTJ/g) a druhy bakterií stanovené v komerčních silážních inokulantech.

Preparát	Stanovené počty bakterií		Stanovené druhy bakterií
Tekrosil K	celkové počty BMK	10,92	<i>L. plantarum</i> koky mléčného kvašení
	laktobacily	10,73	
	pediokoky	10,93	
Biomín® BioStabil Plus	celkové počty BMK	10,42	<i>E. faecium</i>
	laktobacily	10,02	<i>L. brevis</i>
	enterokoky	10,13	<i>L. plantarum</i>
Sila-Bac® Luzerne	celkové počty BMK	11,26	<i>L. plantarum</i>
	laktobacily	11,25	
Sila-Bac® Kombi	celkové počty BMK	11,39	<i>L. plantarum</i> <i>E. faecium</i>
	laktobacily	11,33	
	enterokoky	9,81	
Pioneer 11CFT	celkové počty BMK	11,76	<i>L. pentosus/L. casei</i>
	laktobacily	11,75	<i>L. plantarum</i>

V řadě Sila-Bac® je nabízen také inokulant pro silážování travních porostů o vyšší sušíně (35-45 %) Sila-Bac® Kombi. Výrobek má obsahovat heterofermentativní *L. buchneri* v množství 11,00 log KTJ/g a homofermentativní *L. plantarum* a *E. faecium*, obě bakterie po 9,7 log KTJ/g výrobku. Celkové počty BMK mají tedy být 11,04 log KTJ/g, což bylo dodrženo, stejně jako celkové počty laktobacilů a enterokoků (tabulka 7). Z přípravku byly vyizolovány laktobacily se dvěma různými fermentačními profily, které podle Apiweb i Hammes a Hertel (2009) odpovídají druhu *L. plantarum*. Identifikace byla potvrzena také druhovou PCR, kdy došlo k amplifikaci specifického produktu (obrázek 3). *L. buchneri* se tedy použitými metodami nepodařilo izolovat a identifikovat, i když se jednalo o druh, který by měl ve výrobku dominovat. Dalším způsobem detekce by bylo vyizolování celkové DNA z přípravku a použití primeru specifického pro *L. buchneri*, ten ovšem není dostupný.

V případě nekultivovatelných bakterií je možné naamplifikování 16S úseku celkové bakteriální rDNA, separování pomocí DGGE a sekvenace oddělených fragmentů, tento postup ovšem nebyl v našich možnostech. Navíc, druh *L. buchneri* je běžně kultivovatelnou bakterií, což je logický předpoklad pro její využití jako silážního inokulantu, proto nemá využití těchto postupů opodstatnění.

Obrázek 5: PCR produkty získané při použití páru primerů specifických pro *L. casei* (L – DNA ladder; 1 – negativní kontrola *E. faecium* Biomin® BioStabil Plus; 2 – negativní kontrola *L. plantarum* Tekrosil K; 3 – celková DNA vyizolovaná z výrobku Pioneer 11CFT; 4 – laktobacilus (malé kolonie) Pioneer 11CFT; 5 – laktobacilus (velké kolonie) Pioneer 11CFT; 6 – pozitivní kontrola *L. casei* CCM1751.



Posledním testovaným výrobkem byl inokulant Pioneer 11CFT. Jedná se o přípravek určený pro kukuřičné siláže a má obsahovat dva druhy laktobacilů. *L. buchneri* v počtu 11,00 log KTJ/g a 10,00 log KTJ/g bakterie *L. casei*. Celkové množství stanovených laktobacilů převyšuje deklarovaný počet. Na Rogosa agaru byly zaznamenány dva typy kolonií: malé kolonie v počtu 11,74 log KTJ/g, jednalo se o delší pravidelné tyčinky seskupené v řetězcích a velké kolonie v množství 10,11 log KTJ/g, šlo o kratší pravidelné tyčinky vyskytující se samostatně. Oba kmeny vykazovaly odlišné fermentační profily a podle Apiweb byly izoláty z menších kolonií identifikovány jako *L. plantarum* a kmeny z větších kolonií pak jako *L. pentosus* (tabulka 7). Zařazení na druhovou úroveň bylo u *L. plantarum* potvrzeno metodou PCR (obrázek 3), pro *L. pentosus* nejsou dostupné primery. Celková DNA vyizolována z přípravku Pioneer 11CFT a oba kmeny laktobacilů byly použity do PCR reakce s primery specifickými pro *L. casei*. V případě izolátů z větších kolonií a celkové DNA došlo k amplifikaci produktu, u menších kolonií nikoliv (obrázek 5). Z výsledků tedy vyplývá, že kmen stanovený v počtech 11,74 log KTJ/g, který výrobce deklaruje jako *L. buchneri* byl identifikován dvěma různými metodami jako *L. plantarum*. V menším množství měl přípravek obsahovat druh *L. casei*, což bylo potvrzeno pomocí PCR, nikoli však biochemicky. Ale vzhledem k tomu, že při PCR nedocházelo u negativní kontroly k amplifikaci (obrázek 5) a jedná se o metodu specifičtější, je možné tyto výsledky považovat za spolehlivější. Při

identifikaci bakterií nemusí být výsledky vždy jednoznačné a je tedy vhodné kombinovat více metod.

3.2.2. Stanovení počtu a identifikace bakterií v laboratorně připravené siláži

V další části experimentu byla v laboratorních podmínkách připravena siláž z vybraných bakterií izolovaných z testovaných komerčních přípravků. Pro odlišení přidaných bakterií od přirozeně se vyskytujících bakterií siláže, byli z kmenů připraveni rifampicin rezistentní mutanti. Jako kontrola byla připravena siláž bez přídavku inokulantů. Pro sledování množství bakterií během fermentace vojtěšky byla použita selektivní kultivační prostředí. Výsledky stanovení bakterií jsou uvedeny v tabulce 8, grafické znázornění pak v příloze 3.

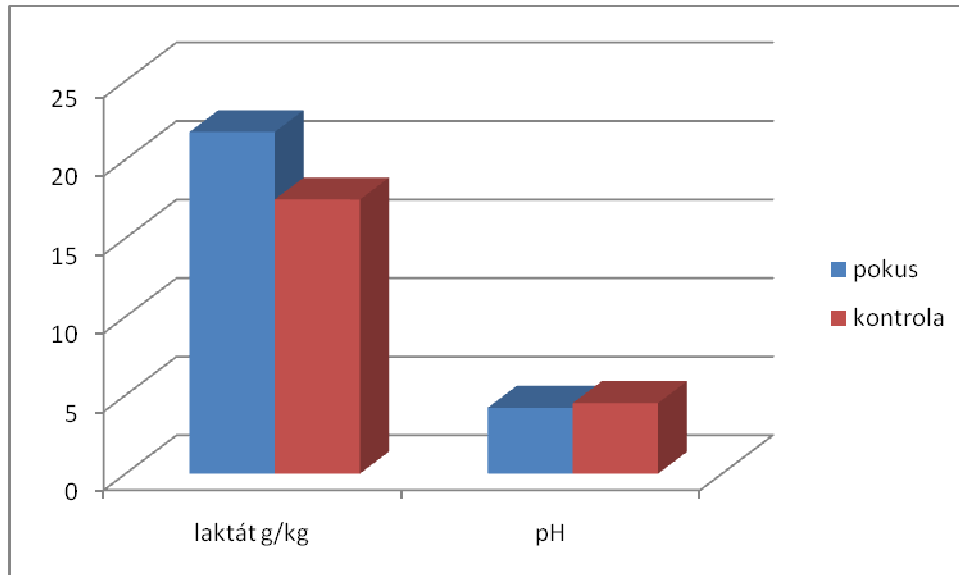
Dva týdny po založení siláže byly celkové počty bakterií u obou skupin kolem 9 log KTJ/g, jednalo se téměř výhradně o bakterie mléčného kvašení. V pokusné skupině byly přirozeně se vyskytující bakterie téměř nahrazeny dodanými kmeny, u kontroly nebyli rifampicin rezistentní mutanti detekováni. V siláži s obsahem komerčních inokulantů došlo k rychlejšímu prokvašení rostlinné hmoty a počty všech sledovaných skupin bakterií klesaly významně rychleji než u kontroly. Statisticky významně nižší ($P > 0,01$) celkové počty BMK byly zaznamenány již za 22 dní po založení pokusu, 8,42 oproti 8,73 log KTJ/g, dále se rozdíl zvětšoval až na téměř dva řády ($P > 0,001$) ve 49. dni sledování. Poslední stanovení proběhlo 63 dní po založení pokusu, v době technologické zralosti siláže, kdy byly zaznamenány počty BMK u obou skupin kolem 5 log KTJ/g, počty byly stále statisticky významně vyšší u kontroly ($P > 0,01$).

Podobný průběh byl zaznamenán i u ostatních skupin bakterií. Laktobacily převyšovaly pediokoky v průměru o jeden řád během celé studie (tabulka 8, obrázky 7 a 8). Vyšší podíl mléčných koků byl sledován v rostlinném materiálu bez silážních inokulantů, což bylo patrné i při mikroskopické kontrole siláže (obrázky 7 a 8). Počty laktobacilů byly na počátku sledování u obou skupin téměř 9 log KTJ/g. K výraznému poklesu došlo ve 30. dni u pokusu na 7,55 log KTJ/g, oproti kontrole 8,57 log KTJ/g, jednalo se o signifikantní rozdíl ($P > 0,001$). U kontroly byly stanoveny nejnižší počty laktobacilů v 63. dni a to 4,92 log KTJ/g, podobně nízké hodnoty byly u pokusu detekovány již o 2 týdny dříve. Také u pediokoků v pokusné skupině došlo k daleko rychlejšímu poklesu než u kontroly, statisticky významný rozdíl ($P > 0,01$) byl sledován již 14 dní po založení siláže. Jejich množství na začátku sledování bylo 7,86 log KTJ/g u pokusné skupiny a 8,55 log KTJ/g u kontroly, na konci pak 4,43 log KTJ/g u pokusu oproti hodnotě 4,69 log KTJ/g stanovené u kontrolní siláže.

Enterokoky byly nejméně početnou skupinou sledovaných bakterií. Při prvním stanovení dosahovaly signifikantně nižších ($P > 0,05$) hodnot 7,18 log KTJ/g u pokusu než u kontroly (7,38 log KTJ/g). Jejich počty rapidně klesly u obou skupin ve 22. dni na 4,43 log KTJ/g (pokus), respektive na 4,16 log KTJ/g (kontrola) a jejich počty se prakticky neměnily až do konce studie. U enterokoků docházelo na Slanetz-Bartley agaru k nárůstu netypických nabělalých kolonií. Pravděpodobně se tedy nejednalo o typické enterokoky, což bylo později potvrzeno také PCR-RAPD. Selektivita agarů byla ověřována pomocí stanovení morfologických vlastností izolovaných kmenů bakterií.

Hodnoty pH a obsah kyseliny mléčné v silážích je znázorněn na obrázku 6. Konečné pH bylo u pokusné siláže s přidavkem inokulantů 4,2. Takto nízká hodnota byla u pokusné siláže naměřena již 22 dní po založení pokusu. Kontrolní siláž měla pH pouze 4,5, což je z technologického hlediska pH příliš vysoké, které nezajišťuje dostatečnou konzervaci. Obsah laktátu byl u pokusné siláže 21,75 g/kg, což odpovídá 2,18 %. V kontrolní siláži byl naměřen nižší obsah a to 17,45 g/kg, tedy 1,75 %. Jedná se o hraniční hodnotu, které musí kvalitní siláž dosáhnout.

Obrázek 6: Obsah laktátu (mg/kg) a pH pokusné a kontrolní siláže po 63 dnech fermentace.



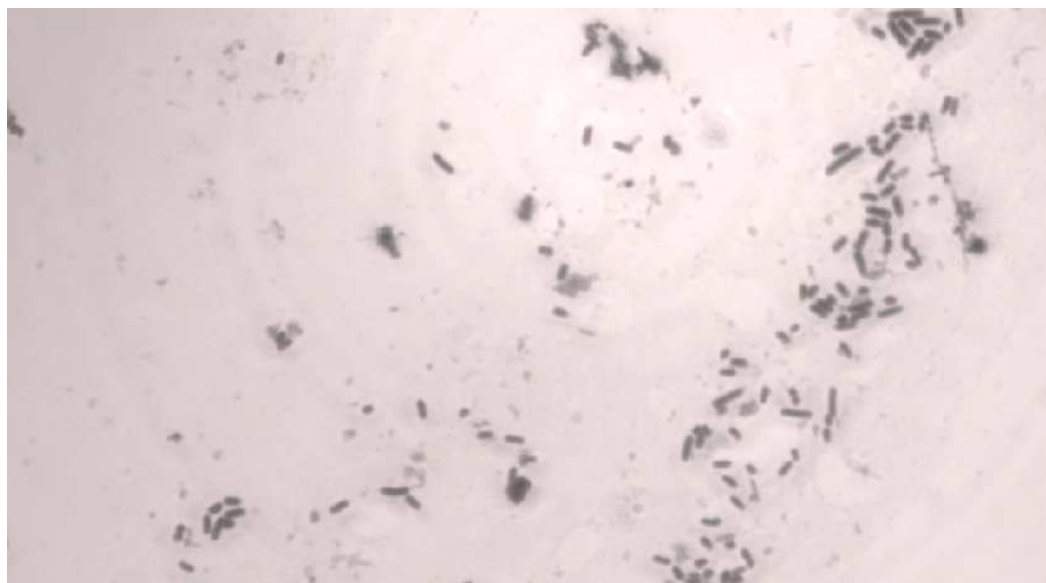
Tabulka 8: Počty (log KTJ/g) bakterií stanovené v laboratorně připravené siláži.

dny po založení	skupina	celkové počty	celkové počty BMK	RR celkové počty BMK	laktobacily	RR laktobacily	pediokoky	RR pediokoky	enterokoky	RR enterokoky
14	pokus	8,94 ± 0,12	8,92 ± 0,13	8,94 ± 0,15	8,74 ± 0,21	8,97 ± 0,22	7,86 ± 0,08**	7,56 ± 0,06	7,18 ± 0,04*	7,44 ± 0,17
	kontrola	9,06 ± 0,13	9,04 ± 0,12	<2	8,89 ± 0,10	<2	8,55 ± 0,10**	<2	7,38 ± 0,07*	<2
22	pokus	8,62 ± 0,02	8,42 ± 0,07**	8,47 ± 0,12	8,52 ± 0,08	8,44 ± 0,17	7,69 ± 0,22	7,65 ± 0,14	4,43 ± 0,12*	4,23 ± 0,07
	kontrola	8,71 ± 0,08	8,73 ± 0,03**	<2	8,59 ± 0,01	<2	7,69 ± 0,17	<2	4,16 ± 0,04*	<2
30	pokus	7,74 ± 0,05**	7,55 ± 0,08**	7,28 ± 0,33	7,55 ± 0,06***	7,58 ± 0,05	6,40 ± 0,14***	6,59 ± 0,23	3,28 ± 0,14**	3,22 ± 0,18
	kontrola	8,50 ± 0,16**	8,45 ± 0,14**	<2	8,57 ± 0,12***	<2	7,48 ± 0,10***	<2	4,47 ± 0,15**	<2
49	pokus	5,08 ± 0,28***	5,31 ± 0,06***	5,17 ± 0,15	4,99 ± 0,22***	4,76 ± 0,35	4,58 ± 0,36***	4,83 ± 0,41	3,69 ± 0,25	2,20 ± 0,14
	kontrola	7,16 ± 0,07***	7,10 ± 0,01***	<2	6,70 ± 0,11***	<2	6,87 ± 0,06***	<2	4,14 ± 0,04	<2
63	pokus	4,88 ± 0,07	4,65 ± 0,08**	3,66 ± 0,47	4,23 ± 0,04**	4,27 ± 0,10	4,43 ± 0,12	3,83 ± 0,38	3,48 ± 0,12	3,51 ± 0,02
	kontrola	4,83 ± 0,08	4,97 ± 0,12**	<2	4,92 ± 0,23**	<2	4,69 ± 0,29	<2	3,48 ± 0,09	<2

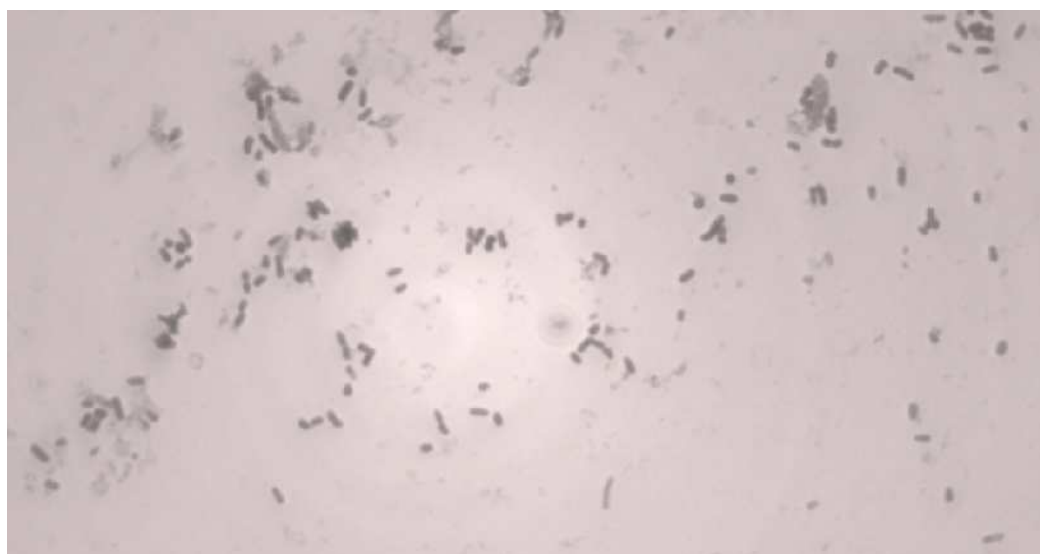
*P>0,05; **P>0,01; ***P>0,001; statisticky významné rozdíly mezi počty bakterií stanovenými v kontrolní a pokusné skupině ve stejném čase.

RR – rifampicin rezistentní

Obrázek 7: Mikroskopický preparát siláže vyrobené s použitím silážních inokulantů.



Obrázek 8: Mikroskopický preparát siláže bez silážních inokulantů.



Z agarů s přídavkem rifampicinu byly vyizolovány kolonie a namnoženy v příslušných bujónech, byla extrahována DNA a izoláty byly identifikovány metodou PCR-RAPD. Jedná se o metodu vhodnou pro odlišení bakterií až na kmenovou úroveň, kdy navíc není nutné znát přesné sekvence DNA studovaných kmenů. Při amplifikaci jsou používány nespecifické primery, které nasedají náhodně na DNA sledovaného organismu, a vzniká soubor různě dlouhých fragmentů DNA, které jsou separovány na agarózovém gelu. PCR-RAPD profily jsou pak porovnávány mezi sebou nebo s referenčním kmenem. V našem případě bylo do PCR-RAPD reakce zařazeno 7 izolátů a jako referenční byly použity kmeny, jež byly

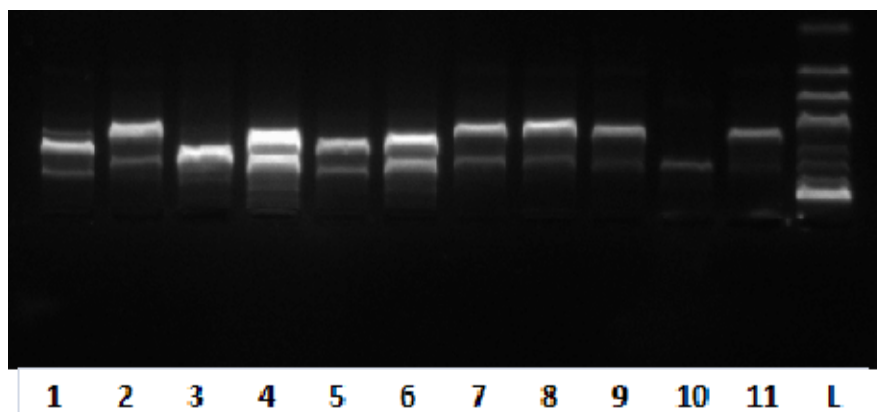
inokulovány do laboratorně připravované siláže (tabulka 9, obrázek 9). Byly použity 3 náhodné primery, ale pouze jeden (OPA13) se ukázal jako vhodný pro odlišení testovaných kmenů. Ostatní dva kmeny poskytovaly naprosto stejné PCR-RAPD profily pro všechny izoláty.

Tabulka 9: Výsledky identifikace reizolovaných bakterií z laboratorně připravené siláže.

reizolovaný kmen	identifikován jako
RR- <i>Lactobacillus</i> 1	<i>L. plantarum</i> Tekrosil K
RR- <i>Lactobacillus</i> 2	<i>L. plantarum</i> Tekrosil K
RR- <i>Lactobacillus</i> 3	<i>L. plantarum</i> Tekrosil K
RR- <i>Pediococcus</i> 1	<i>Pediococcus</i> Tekrosil K
RR- <i>Pediococcus</i> 2	<i>Pediococcus</i> Tekrosil K
RR- <i>Enterococcus</i> 1	neurčeno
RR- <i>Enterococcus</i> 2	neurčeno

Výsledky identifikace jsou uvedeny v tabulce 9. Byly reizolovány 3 kmeny laktobacilů, jejichž PCR-RAPD profily se shodovaly s profilem *L. plantarum* Tekrosil K (obrázek 9). Ani jeden z laktobacilů nebyl identifikován jako *L. plantarum* Sila-Bac® Luzerne, který byl rovněž použit pro přípravu siláže. Z výsledků tedy vyplývá, že kmen *L. plantarum* Tekrosil K přežíval v siláži po delší dobu. PCR-RAPD profily reizolovaných pediokoků se shodovaly s profilem kmene, který byl přidán k silážované hmotě. Ze Slanetz-Bartley agaru s přidavkem rifampicinu byly izolovány kolonie koků, tyto kmeny však netvořily typické kaštanově hnědé kolonie. Nejednalo se tedy pravděpodobně o kmeny inokulované do siláže, ale o jiné koky rezistentní k rifampicinu. To potvrzuje i vzniklý PCR-RAPD profil, který je odlišný od profilu kmene *E. faecium* Biomin® BioStabil Plus (obrázek 9), který byl pro přípravu siláže použit.

Obrázek 9: PCR-RAPD profily rifampicin rezistentních kmenů reizolovaných z laboratorně připravené siláže s použitím náhodného primeru OPA13 (1 – RR-*Enterococcus* 1; 2 – RR-*Enterococcus* 2; 3 – *E. faecium* Biomin® BioStabil Plus; 4 – RR-*Pediococcus* 1; 5 – RR-*Pediococcus* 2; 6 – *Pediococcus* Tekrosil K; 7 – RR-*Lactobacillus* 1; 8 – RR-*Lactobacillus* 2; 9 – RR-*Lactobacillus* 3; 10 – *L. plantarum* Sila-Bac® Luzerne; 11 – *L. plantarum* Tekrosil K.



3.3. Závěr

Čtyři z pěti testovaných výrobků splňovaly deklarované množství bakterií. U jednoho z preparátů byl zaznamenán mírně nižší počet. Ve dvou inokulantech byly stanoveny přesně ty druhy bakterií, které jsou uvedeny na obalu. Druhy *P. acidilactici* a *L. buchneri* se ve výrobcích námi použitými metodami nepodařilo detekovat. Pro kmenovou charakterizaci a identifikaci reizolovaných kmenů laktobacilů, pediokoků a enterokoků z laboratorně připravené siláže byla úspěšně použita metoda PCR-RAPD.

V pokusné skupině byly přirozeně se vyskytující bakterie téměř nahrazeny dodanými kmeny. V siláži s obsahem komerčních inokulantů došlo k rychlejšímu prokvašení rostlinné hmoty a počty všech sledovaných skupin bakterií klesaly významně rychleji než u kontroly. Konečné pH bylo u pokusné siláže s přídatkem inokulantů 4,2. Takto nízká hodnota byla naměřena již 22 dní po založení pokusu. Kontrolní siláž měla pH pouze 4,5, což je z technologického hlediska pH příliš vysoké. Také konečný obsah laktátu byl u siláže s použitím silážních inokulantů vyšší než u kontroly.

Z výsledků vyplývá, že použití komerčních přípravků s obsahem bakterií mléčného kvašení významně napomáhá k dostatečnému prokvašení, jinak těžko silážovatelné, vojtěškové řezanky na hodnoty pH, které zajišťují kvalitní konzervaci rostlinné hmoty. Ovšem ne všechny silážní inokulanty obsahují bakterie v deklarovaném množství a kvalitě.

4. Souhrn

Silážní inokulanty jsou kultury bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus plantarum*, jiné laktobacily, pediokoky nebo *Enterococcus faecium*), které pomáhají zlepšovat proces kvašení (produkce kyseliny mléčné) v silu. Bakterie inokulantů jsou obvykle vybírány z epifytní mikroflóry nebo z jiných prostředí. Bakteriální spektrum zahrnuje homofermentativní druhy produkující výhradně kyselinu mléčnou a heterofermentativní druhy produkující směs kyseliny mléčné a octové kyseliny a/nebo jiné vedlejší produkty, jako je ethanol a oxid uhličitý. Mechanismus účinku inokulantů zahrnuje: 1) rychlou produkci kyseliny mléčné, 2) zlepšení aerobní stability siláže vzhledem k produkci kyseliny octové, 3) detoxikace mykotoxinů a inhibice patogenních bakterií a mikroorganismů působících kažení siláže, 4) probiotické účinky.

V této studii byly testovány čtyři komerčně dostupné inokulanty. Celkové počty mikroorganismů v preparátech se pohybovaly od 10 do 11 log KTJ/g. Z produktů byly izolovány dva kmeny *Lactobacillus plantarum* a jeden kmen sp *Pediococcus* a *Enterococcus* sp., které byly následně použity k pokusné výrobě siláže. Ošetřené vzorky siláže měly nižší pH (4,2 vs 4,5 u kontrolních vzorků) a obsahovaly více kyseliny mléčné ve srovnání s kontrolní siláží.

5. Summary

Inoculants are silage additives containing lactic acid bacteria (e.g. *Lactobacillus plantarum*, other lactobacilli, pediococci or *Enterococcus faecium*) that help to improve fermentation (production of lactic acid) in the silo. Inoculants bacteria are usually selected from epiphytic microflora or other environments. Bacterial spectrum includes homofermentative species producing exclusively lactic acid and heterofermentative species producing mixture of lactic and acetic acids and/or other by-products like ethanol and carbon dioxide. Mode of action of inoculants include: 1) rapid production of lactic acid, 2) improvement of the aerobic stability of silage due to production of acetic acid, 3) detoxification of mycotoxines and inhibition of pathogenic and/or spoiling bacteria, 4) probiotic action.

In this study four commercially available inoculants were tested. Total viable counts in inoculants varied from 10 to 11 log CFU/g. Two strains of *Lactobacillus plantarum* and one strain of *Pediococcus* sp. a *Enterococcus* sp. isolated from inoculants were used for the

experimental production of alfalfa silage. Treated silage samples had lower pH (4.2 vs. 4.5 in control samples) and contained more lactic acid compared to control silage.

6. Použitá literatura

- Abe F., Ishibashi N., Shimamura S.: Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci*, 78, 2838-2846, 1995
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59, 143-169, 1995
- Anonym 1: www.pioneer.cz/download/11CH4_CZ.pdf
- Barney M., Volgyi A., Navarro A., Ryder D.: Ribotyping and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67, 553-560, 2001
- Barton L.L., Rider E.D., Coen R.W.: Bacteremic infection with *Pediococcus*: vancomycin-resistant opportunist. *Pediatric*, 107, 775-776, 2001
- Bouton Y., Guyot P., Beuvier E., Tailliez P., Grappin R.: Use of PCR-based method and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *Int J Food Microbiol*, 76, 27-38, 2002
- Broberg A., Jacobsson K., Strom K., Schnurer J.: Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5547-5552, 2007
- Cai Y., Kumai S., Ogawa M., Benno Y., Nakase T.: Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2901-2906, 1999
- Cato E.P., George W.L., Finegold S.M.: Genus *Clostridium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA, 1141-1200, 1986
- Chagnaud P., Machinis K., Coutte L.A., Marecat A., Mercenier A.: Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J Microbiol Method*. 44, 139-148, 2001
- Dickson E.M., Riggio M.P., Macpherson L.: A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *J Med Microbiol*, 54, 299-303, 2002
- Driehuis F., Elferink S.J.W.H.: The impact of the quality of silage on animal health and food safety. *Wet Quart*, 22, 212-217, 2000
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 24-27, 1995

- Elferink O., Krooneman J., Gotschal C., Spoelstra S.F., Faber F., Driehuis F.: Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol*, 67, 125-132, 2001
- Elli M., Zink R., Rytz A., Reniero R., Morelli L.: Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol*, 88, 695-703, 2000
- Ennahar S., Cai Y., Fujita Y.: Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl Environ Microbiol*, 69, 444-451, 2003
- Fitzsimos A., Duffner F., Curtin D., Brophy G., O'Kiely P., O'Connell M.: Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Appl Environ Microbiol*, 58, 3047-3052, 1992
- Franz C.M., Holzapfel W.H., Stiles M.E.: Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol*, 47, 1-24, 1999
- Franz C.M., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., De Wachter M., Cleenwerck I., Hoste B., Schilinger U., Holzapfel W.H., Swings J.: *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 329-333, 2006
- Fujii T., Nakashima K., Hayashi N.: Random amplified polymorphic DNA-PCR based cloning of markers to identify the beer-spoilage strains of *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus coryniformis*. *J Appl Microbiol*, 98, 1209-1220, 2005
- Fuller R.: Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, 365-378, 1989
- Garg S.K., Mital B.K.: Enterococci in milk and milk products. *Crit Rev Microbiol*, 18, 15-45 1991
- Gasson M.J.: Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol*, 154, 1-9, 1983
- Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaiki L., Lamberret G., Sourice S., Duwat P., Gruss A.: Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 263-269, 2002
- Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 163-171, 2002
- Godfree A.F., Kay D., Wyer M.D.: Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J Appl Microbiol Symp Suppl*, 83, 110S-119S, 1997
- Gollop N., Zakin V., Weinberg Z.G.: Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J Appl Microbiol*, 98, 662-666, 2005

- Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.: Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glucosidase activities that are important in oenology. *J Appl Microbiol*, 99, 1061-1069, 2005
- Hammes W., Hertel Ch.: Genus *Lactobacillus*, In Whitman (Ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, London, 465-511, 2009
- Hernandez-Mendoza A., Garcia H.S., Steele J.L.: Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*, 47, 1064-1068, 2009
- Holzappel W., Franz CH., Ludwig W., Dicks L.: Genus *Pediococcus*, In Whitman (Ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, London, 513-532, 2009
- Holzer M., Mayrhuber E., Danner H., Braun R.: The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol*, 21, 282-287, 2003
- Hristov A.N., McAllister T.A.: Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. *J Anim Sci*, 80, 510-516, 2002
- Huisden C.M., Adesogan A.T., Kim S.C., Ososanya T.: Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J Dairy Sci* 92, 690-697, 2009
- Jacques, N. A., Hardy, L., Knox, K. W., Wicken, A. J.: Effect of tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under the glucose limitation. *J General Microbiol*, 119, 195 -201, 1980
- Jalc D., Laukova A., Simonova M.P., Vyradyova Z., Homolka P.: Bacterial inoculant effects on corn silage fermentation and nutrient composition. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 22, 977-983, 2009
- Jones B.A., Muck R.E., Ricke S.C.: Selection and application of *Streptococcus bovis* as a silage inoculant, *Appl Environ Microbiol*, 57, 3000-3005, 1991
- Kalač P.: Inokulanty v procesu silážování. http://www.agroweb.cz/Inokulanty-v-procesu-silazovani_s366x33159.html., 2009
- Kamau D.N., Doores S., Pruitt K.M.: Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl Environ Microbiol*. 56, 2711-2716, 1990
- Kandler O., Weiss N.: Genus *Lactobacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA, s 1208-1234, 1986
- Kaprálék F.: *Fyziologie bakterií*, SPN Praha, 603 s., 1986

- Kizilsimsek M., Schmidt R.J., Kung Jr. L.: Effects of mixture of lactic acid bacteria applied as a freeze-dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. *J Dairy Sci*, 90, 5698-5705, 2007
- Kleinschmit D.H., Kung Jr.L.: A Meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J Dairy Sci*, 89, 4005-4013, 2006
- Kung L., Schmidt R.J., Ebling T.E., Hu W.: The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. *J Dairy Sci*, 90, 2309-2314, 2007
- Mättö J., Malinen E., Suihko M.L., Alander M., Palva A., Saarela M.: Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 97, 459-470, 2004
- McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E.: *The Biochemistry of Silage*, Second Edition, Chalcombe Publication, Lincoln, UK, 1991
- McDonald P.: *The biochemistry of silage*. John Wiley and Sons, Ltd., New York, 1981
- Mitřík T.: *Silážování*, FedLab s.r.o., Creative-Studio-Slovakia, s.r.o., 88 s., 2006
- Mucchetti G., Locci F., Massara P., Vitale R., Neviani E.: Production of pyroglutamic acid by thermophilic lactic acid bacteria in hard-cooked mini-cheeses. *J Dairy Sci*, 85, 24892496, 2002
- Muck R.: Inoculants for corn silage. *Focus on Forage* 2, 1-3, (http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/Inoculating_Corn_Silage.htm), 2000
- Muck R.E., Filya I., Contreras-Govea F.E.: Inoculant effects on alfalfa silage: In vitro gas and volatile fatty acid production. *J Dairy Sci*, 90, 5115-5125, 2007
- Muck R.E.: Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. *Grass Forage Sci*, 44, 19-25, 1989
- Müller T., Ulrich A., Ott E.M., Müller M.: Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol*, 91, 268-278, 2001
- Nes I.F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsing V., Holo H.: Biosynthesis of bacteriocin in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113-128, 1996
- Ott E.M., Müller T. Müller M., Franz C.M., Ulrich A., Gabel M., Seyfarth W.: Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J Appl Microbiol*, 91, 54-66, 2001
- Ouwehand A.C.: Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen and von Wright (Eds.): *Lactic acid bacteria*, Marcel Dekker, New York, 139-159, 1998

- Pasebani M., Yaakub H., Sijam K.: Isolation and identification of epiphytic lactic acid bacteria from guinea grass (*Panicum maximum*). *Am J Anim Vet Sci*, 5, 146-150, 2010
- Paulsen I.T., Banerjee L., Myers G.S., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Heidelberg J.F., Tettelin H., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., DeBoy R.T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Vamathevan J., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K.A., Dougherty B.A., Fraser C.M.: Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299, 2071-2074, 2003
- Phillip L.E., Fellner V.: Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers, *J Anim Sci*, 70, 3178-3187, 1992
- Rada V., Marounek M., Rychlý I., Šantrůčková D., Voříšek K.: Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *J Anim Feed Sci*, 4, 161-170, 1995
- Rada V., Vlková E., Nevorál J., Trojanová I.: Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiol Lett*, 258, 25-28, 2006
- Rodrigues J.M., Martinez M.I., Kok J.: Pediocin PA-1, a widespectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42, 91-121, 2002
- Rosselló-Mora R., Amann R.: The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 39-67, 2001
- Sakala R.M., Hayashidani H., Kato Y., Hirata T., Makino Y., Fukushima A., Yamada T., Kaneuchi C., Ogawa M.: Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int J Food Microbiol*, 74, 87-99, 2002
- Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M., Benno Y.: Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52, 1945-1951, 2002
- Sanderson M.A.: Aerobic stability and in vitro fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages. *J Anim Sci*, 71, 505-514, 1993
- Santos E.M., Jaime I., Rovira J., Lyhs U., Korkeala H., Björkroth J.: Characterization and identification of lactic acid bacteria in „morcilla de Burgos“. *Int J Food Microbiol*, 97, 285-296, 2005
- Scardovi V.: Genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1418-1434, 1986

- Schleifer K.H, Ludwig W.: Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In Wood and Holzapfel (Eds.): The genera of lactic acid bacteria. Blackie academic & professional, London, 7-18, 1995
- Schnürer J., Magnusson J.: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends Food Technol, 16, 70-78, 2005
- Sharp R., O'Donnelli A.G., Gilbert H.G., Hazlewood G.P.: Growth and Survival of genetically manipulated *Lactobacillus plantarum* in silage. Appl Environ Microbiol, 58, 2517-2522, 1992
- Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P.: Enumeration and identification of pediococci in powder-ased products using selective media and rapid PFGE. J Microbiol Methods, 64, 120-125, 2006
- Spoelstra S.F. : Chemical and biological additives in forage conservation. In Pahlow (Ed.): Conservation Towards 2000 Proceeding, Braunschweig, 48-70, 1991.
- Stevenson D.M., Muck R.E., Shinnors K.J., Weimer P.J.: Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. Appl Microbiol Biotechnol, 71, 329-338, 2005.
- Švec P., Devries L.A.: Genus Enterococcus, In Whitman (Ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer, London, 594-611, 2009
- Teixeira L.M, Facklam R.R.: *Enterococcus*. In Murray, Baron, Jorgensen, Pfaller, Tenover, Tenover (Eds.): Manual of clinical microbiology, ASM Press, Washington, 422-433, 2003
- Teuber M.: Genus *Lactococcus*, In Whitman (Ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer, London, 711-722, 2009
- Thomas C., Thomas P.C.: Factors affecting the nutritive value of grass silages. In Haresingn Cole (Eds): Recent advances in Animal Nutrition, Butterworths, London, 223-256, 1985
- van Kranenburg R., Kleerebezem M., de Vos W.M.: Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. Plasmid, 43, 130-136, 2000
- Vela A.I., Vazquez J., Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Liebana P., Albendea C., Alcalá B., Mendez A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F.: Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. J Clin Microbiol, 38, 3791-3795, 2002
- Wallace, R. J., and C. J. Newbold: Probiotics for ruminants., Probiotics - The Scientific Basis.: London, Chapman & Hall, 317-353, 1992

- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 66, 297-303, 2000
- Wardynski F.A., Rust S.R., Yokoyama M.T.: Effect of microbial inoculation of high-moisture corn on fermentation characteristics, aerobic stability, and cattle performance. *J. Anim Sci*, 71, 2246-2252, 1993
- Weaver K.E., Rice L.B., Churchward G.: Plasmids and transposons. In Gilmore, Lewell, Courvalin, Dunny, Murray, Rice (Eds.): *The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*, ASM Press, Washington, 219-263, 2002
- Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y., Gamburg M.: Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Appl Biochem Biotechnol*, 118, 1-9, 2004
- Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J.: The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *J Appl Microbiol*, 94, 1066-1071, 2003
- Wilkinson J.M., Wadephul F., Hill J: *Silage in Europe a survey of 33 countries.*, Welton, Chalcombe Publication, 1996
- Wilkinson J.M.: *Silage*. Chalcombe Publication, Lincol, UK, 254, 2005

7. Přílohy

Příloha 1: Příklady pokusného použití bakterií jako silážních inokulantů.

Bakterie	Silážovaný materiál	Citace	Poznámka
<i>Sc. bovis</i> , <i>E. faecium</i>	Vojtěška	Jones et al., 1991	<i>Sc. bovis</i> dosáhl nižšího pH, přičemž neštěpil škrob.
<i>Serratia rubidaea</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Kukuřice	Rhillip a Fellner, 1992	Kombinace mikrobů zlepšila aerobní stabilitu.
<i>P. acidilactici</i> , <i>L. plantarum</i>	Travní porost	Fitzsimons et al., 1992	Pediokoky jsou vhodné jako inokulanty pro siláže o nižší sušině.
<i>L. plantarum</i>	Jílek (<i>Lolium perenne</i>)	Sharp et al., 1992	Geneticky modifikované bakterie dominovaly v siláži.
<i>L. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>P. acidilactici</i>	Kukuřice	Wardynski et al., 1993	Použití inokulantů pro siláž s nízkou sušinou, nemá žádný efekt, spíše zhoršuje aerobní stabilitu.
<i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i>	Kukuřice, širok technický (<i>Sorghum bicolor</i>)	Sanderson, 1993	Inokulanty snižovaly dosažené pH, ale nezlepšily aerobní stabilitu.
<i>P. pentosaceus</i> <i>P. acidilactici</i> <i>L. casei</i>	Vojtěška, jílek	Cai et al., 1999	Některé kmeny <i>P. acidilactici</i> jsou vhodné jako inokulanty
<i>L. plantarum</i> <i>E. faecium</i>	Ječmen	Hristov a McAllister, 2002	Inokulanty měly lepší účinek na čerstvou píci než na zavadlou.
<i>L. buchneri</i>	Travní porost	Holzer et al., 2003	Zlepšení aerobní stability.
<i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>L. pentosus</i> <i>E. faecium</i> <i>L. buchneri</i>	Kukuřice	Gollop et al.,	Některé inokulanty vykazovaly antibakteriální aktivitu.
<i>L. buchneri</i>	Kukuřice	Kleinschmit a Kung, 2006	Zlepšení aerobní stability, metaanalýza
<i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>L. pentosus</i> <i>E. faecium</i> <i>L. buchneri</i>	Vojtěška	Muck et al., 2007	Inokulanty snižovaly během procesu silážování tvorbu plynů a možný je také efekt na bachorovou fermentaci.
<i>L. plantarum</i>	Pastevní porost	Broberg et al., 2007	Produkce antifugálních látek laktobacily.
<i>L. buchneri</i>	Kukuřice	Kung et al., 2007	Zlepšení aerobní stability

<i>L. plantarum</i>	Vojtěška	Kizilsimsek et al., 2007	Více kyseliny mléčné při aplikaci čerstvé kultury v porovnání aplikací lyofilizované kultury.
<i>P. pentosaceus</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. plantarum</i> <i>E. faecium</i>	Kukuřice	Huisden et al., 2009	Inokulanty lepší pro aerobní stabilitu než přídavek melasy. Zvyšování doporučených dávek inokulantů nemá žádný efekt.
<i>E. faecium</i> <i>L. plantarum</i>	Kukuřice	Jalc et al., 2009	Zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin (C-18:2 a C-18:3) v siláži.
<i>L. casei</i>	Kukuřice	Hernandez-Mendoza et al., 2009	Možná vazba aflatoxinu B1 laktobacily

E. – *Enterococcus*, *L.* – *Lactobacillus*, *P.* – *Pediococcus*, *Sc.* - *Streptococcus*

Příloha 2: Silážní inokulanty na českém trhu.

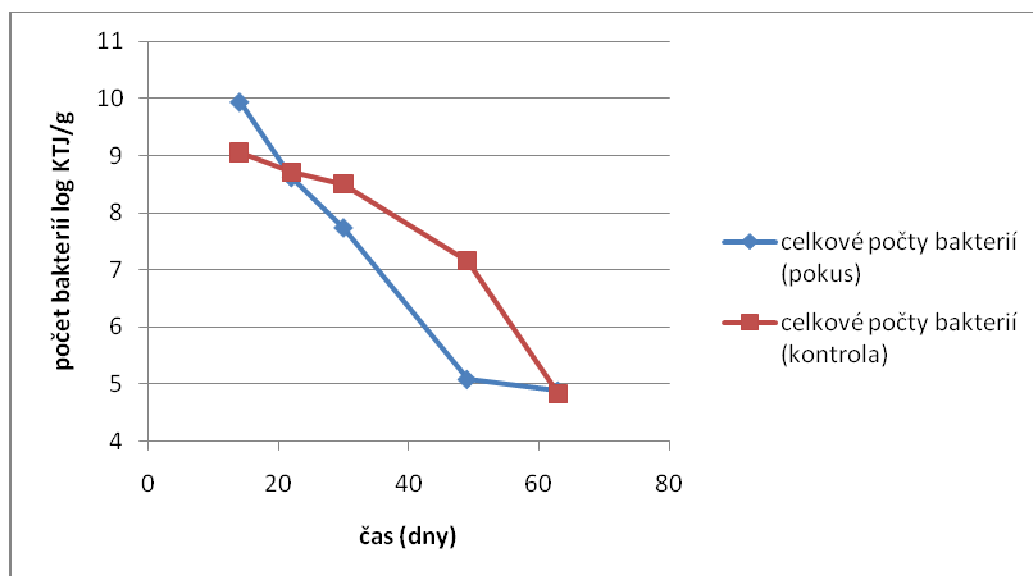
Inokulant	Obsah bakterií	Plodina	Výrobce/dodavatel
Tekrosil K	<i>L. plantarum</i> <i>P. acidilactici</i>	kukuřice	Tekro, Uničov
Tekrosil L	<i>L. plantarum</i> <i>P. acidilactici</i>	travní porosty vojtěška	Tekro, Uničov
Biomin [®] BioStabil Plus	<i>E. faecium</i> DSM3530 <i>L. plantarum</i> DSM19457 <i>L. brevis</i> DSM19456	lipnicovité bobovité	Biomin, Rakousko Bomin Czech, Havlíčkův Brod
Biomin [®] BioStabil Mays	<i>E. faecium</i> DSM3530 <i>L. plantarum</i> DSM19457 <i>L. brevis</i> DSM19456	kukuřice	Biomin, Rakousko Bomin Czech, Havlíčkův Brod
Sila-Bac [®] Mais	<i>L. plantarum</i> DSM4784, 4785, 4786, 4787 <i>E. faecium</i> DSM4788, 4789	kukuřice	Pioneer, Břeclav
Sila-Bac [®] Luzerne	<i>L. plantarum</i> ATCC55943, 55944	vojtěška	Pioneer, Břeclav
Sila-Bac [®] Kombi	<i>L. buchneri</i> ATCC2494 <i>L. plantarum</i> ATCC53187 <i>E. faecium</i> ATCC55593	travní porosty	Pioneer, Břeclav
Pioneer [®] 11CFT	<i>L. buchneri</i> <i>L. casei</i>	kukuřice	Pioneer, Břeclav
Pioneer [®] 11GFT	<i>L. buchneri</i> LN40177 <i>L. casei</i>	travní porosty	Pioneer, Břeclav
Biomax [®] 5	<i>L. plantarum</i> DSM13367 <i>L. plantarum</i> DSM13366	kukuřice	Christian Hansen (USA)
Biomax [®] GP	<i>L. pentosus</i> DSM140025 <i>P. pentosaceus</i> DSM14021	vojtěška travní porosty	Christian Hansen (USA)
Bioprofit	<i>L. rhamnosus</i> DSM7061 <i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> DSM6067	všechny druhy pícnin	Valio, Finsko Bioferm, Brno
Bonsilage	<i>L. rhamnosus</i> NCIMB30121 <i>E. faecium</i> NCIMB30122	vojtěška jeteloviny travní porosty	Schaumann ČR, Volyně
Bonsilage plus	<i>L. rhamnosus</i> NCIMB30121 <i>P. pentosaceus</i> DSM12834 <i>L. plantarum</i> DSM12836 <i>L. brevis</i> DSM12835 <i>L. buchneri</i> DSM12854	vojtěška jeteloviny travní porosty	Schaumann ČR, Volyně
Bonsilage forte	<i>P. acidilactici</i> DSM16243 <i>L. paracasei</i> DSM16245 <i>Lc. lactis</i> NCIMB30160	vojtěška jeteloviny travní porosty	Schaumann ČR, Volyně
Bonsilage mais	<i>L. plantarum</i> DSM12836 <i>P. pentosaceus</i> DSM12834 <i>L. buchneri</i> DSM12856	kukuřice GPS siláže	Schaumann ČR, Volyně
Silostar mais	<i>L. plantarum</i> DSM12836 <i>P. pentosaceus</i> DSM12834	kukuřice	Schaumann ČR, Volyně

	<i>L. buchneri</i> DSM12856		
Bonsilage CCM	<i>L. rhamnosus</i> NCIMB30121 <i>L. plantarum</i> DSM12837 <i>L. buchneri</i> DSM12856	zrno kukuřice	Schaumann ČR, Volyně
AdiSil Lac	<i>Lc. lactis</i> <i>L. plantarum</i>	kukuřice	Bioferm, Brno
AdiSil M-100 Stabil	<i>L. collinoides</i> <i>L. cellosbiousus</i>	travní porosty vojtěška	Bioferm, Brno
AdiSil Fast	<i>L. plantarum</i>	zavadlá píče	Bioferm, Brno
AdiSil LG-100 Perfect	<i>P. acidilactici</i> <i>Lc. lactis</i> <i>L. plantarum</i>	travní porosty vojtěška	Bioferm, Brno
Lactisil 200NB	<i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Lc. lactis</i> <i>E. faecium</i>	všechny druhy pícnin	Medipharm CZ, Hustopeče
Microsil	<i>E. faecium</i> M74 <i>L. casei</i> <i>Pediococcus</i> spp.	kukuřice travní porosty	Medipharm CZ, Hustopeče
Microsil OSMO	<i>L. casei</i> OSMO <i>E. faecium</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Lc. lactis</i>	zavadlá píče	Medipharm CZ, Hustopeče
Bactozym	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>E. faecium</i> <i>P. pentosaceus</i>	vojtěška	Medipharm CZ, Hustopeče
Goldzym	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>E. faecium</i> <i>P. pentosaceus</i>	jeteloviny	Medipharm CZ, Hustopeče
Bio-Sil	<i>L. plantarum</i> DSM8862 <i>L. plantarum</i> DSM8866	kukuřice leguminózy	CRS-Marketing, Čížkovice

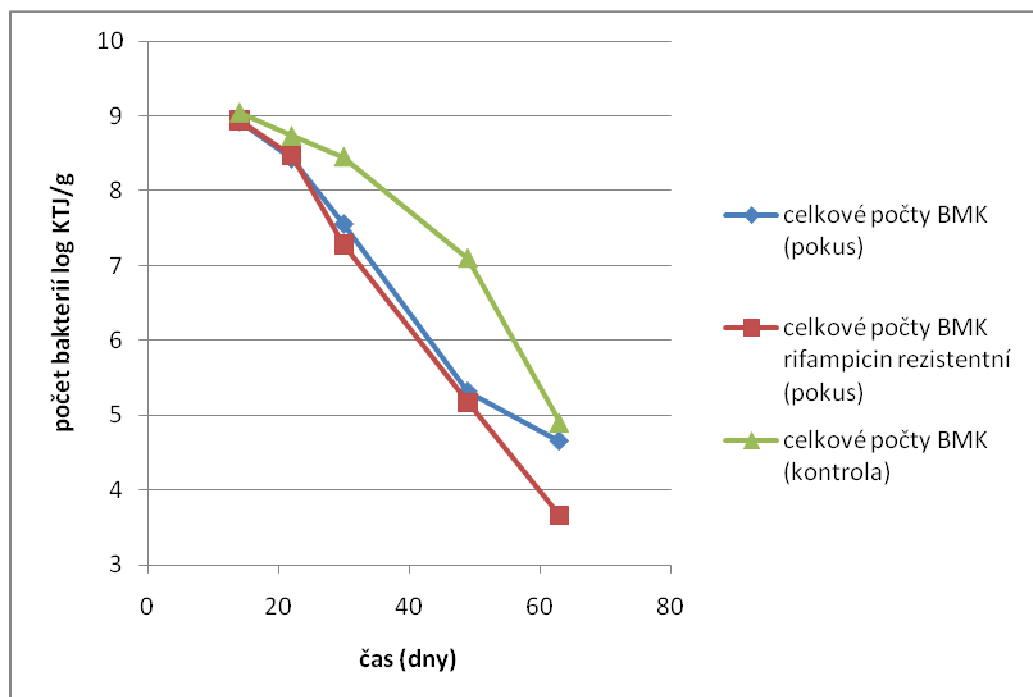
E. – *Enterococcus*, *L.* – *Lactobacillus*, *Lc.* – *Lactococcus*, *P.* – *Pediococcus*

Příloha 3: Množství bakterií stanovené během fermentace laboratorně připravené siláže.

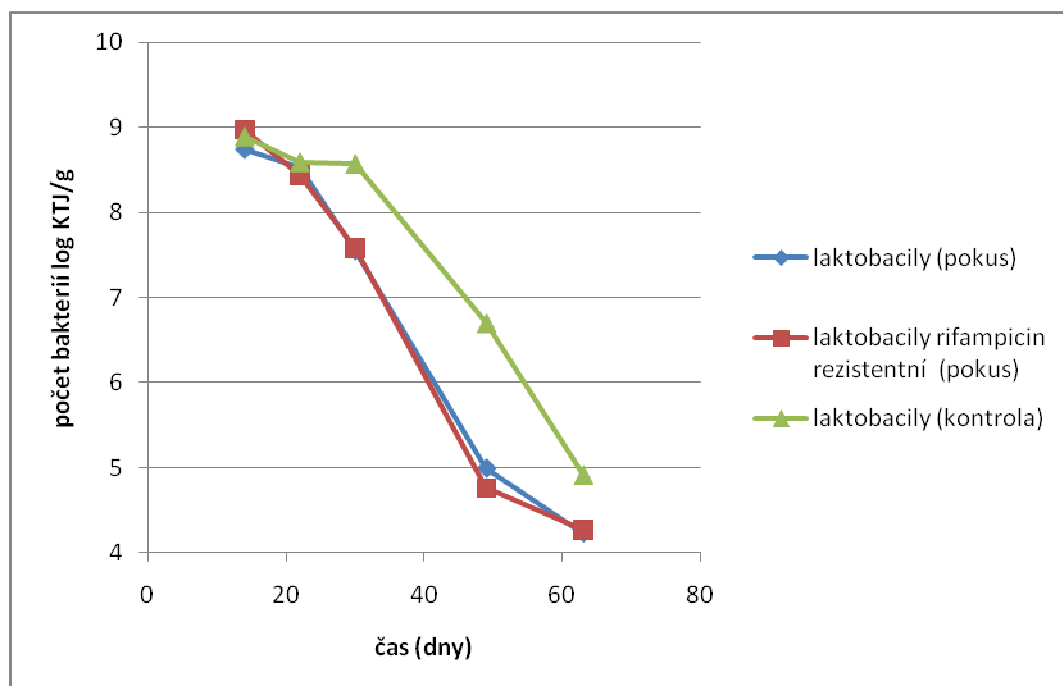
A – celkové počty bakterií



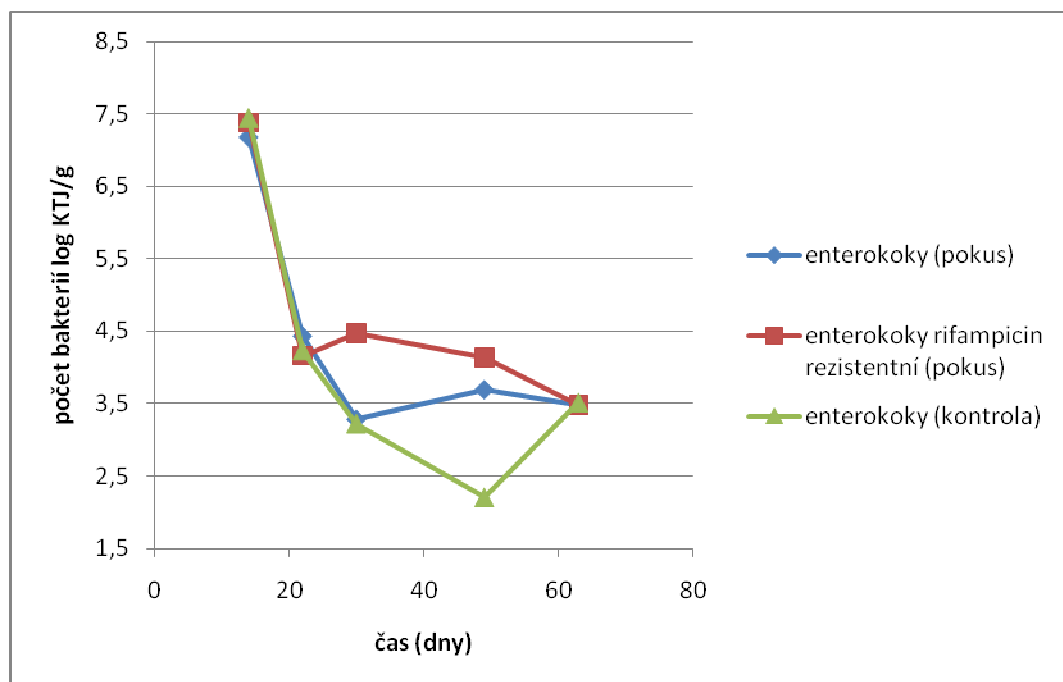
B – celkové počty bakterií mléčného kvašení



C - počty laktobacilů



D – počty enterokoků



E – počty pediokoků

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: Silážní inokulanty

Autoři: Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
Doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze

Stanovisko: Prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves

ISBN **978-80-7403-069-7**

Vydáno bez jazykové úpravy.

Studie vznikla v rámci Vědeckého výboru výživy zvířat.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves