

Utjecaj komercijalnih inokulanata na kemijski sastav i fermentaciju silaže od lucerne

The Effect of Commercial Inoculants on Chemical Composition and Fermentation of Alfalfa Silage

Uher, D.

Poljoprivreda / Agriculture

ISSN: 1848-8080 (Online)

ISSN: 1330-7142 (Print)

<https://doi.org/10.18047/poljo.30.1.10>



Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Poljoprivredni institut Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Agricultural Institute Osijek

UTJECAJ KOMERCIJALNIH INOKULANATA NA KEMIJSKI SASTAV I FERMENTACIJU SILAŽE LUCERNE

Uher, D.

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Krmne mahunarke teško se siliraju, pa je potrebno primijeniti starter-kulturu od odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline koji podupiru proces siliranja i sprječavaju nepoželjne bakterijske maslačne fermentacije te time doprinose očuvanju i poboljšanju kvalitete silaže. Cilj istraživanja bio je procijeniti učinke komercijalnih inokulanata na kemijski sastav i fermentaciju silaže lucerne kultivara OS99. Masa lucerne podijeljena je u šest jednakih dijelova (kontrola – silaža bez inokulanta) i silaža tretirana komercijalnim inokulantima (PIO1 – Pioneer 11H50, PIO2 – Pioneer 11AFT, SIL – Silko, BON – Bonsilage alfa i SAL – Sil-All4 × 4), sve silirano u mikrosilosima. Nakon 90 dana od siliranja, silaže su analizirane s obzirom na kemijski sastav te fermentacijske parametre. Udio suhe tvari i sirovih proteina bio je veći, a udio mliječne i octene kiseline bio je značajno ($p < 0,05$) veći u silaži tretiranoj inokulantima PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL u odnosu na kontrolu. Silaža lucerne tretirana inokulantima PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL imala je niži udio kiselih i neutralnih deterdžentskih vlakana, niži pH te značajno ($p < 0,05$) niži udio maslačne kiseline, alkohola i NH_3-N u usporedbi s kontrolom. Rezultati istraživanja pokazali su da komercijalni inokulanti PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL povećavaju kvalitetu silaže lucerne kultivara OS99 u odnosu na kontrolu.

Ključne riječi: lucerna, silaža, komercijalni inokulanti, kemijski sastav, fermentacijski parametri

UVOD

Lucerna je značajna u hranidbi svih vrsta domaćih životinja, a koristi se u raznim oblicima, kao što su sijeno, silaža i dehidrirano brašno, a rjeđe kao zelena krma i za ispašu stoke. Međutim, lucerna se često smatra kulturom koju je teško silirati, i to prvenstveno zbog svoje visoke puferske sposobnosti, niskoga udjela ugljikohidrata topljivih u vodi ($< 1,5\%$) i sklonosti nepoželjnim sekundarnim fermentacijama koje uzrokuju klostridije, osobito kada se silira s udjelom suhe tvari manjim od 300 g kg^{-1} (Coblentz i Muck, 2012.). Na kvalitetu silaže i učinkovitost korištenja hranjivih tvari utječu brojni čimbenici, kao što su usjevi, tehnologija siliranja, strojevi i aditivi koji se koriste za upravljanje u procesima fermentacije (Davies i sur., 2005.). Stoga je primjena kemijskih ili bakterijskih dodataka važan čimbenik u siliranju lucerne (Repetto i sur., 2011.). Prednost bakterijskih inokulanata jest to što ne ostavljaju ostatke i negativno ne utječu na zdravlje životinja te na kvalitetu i sigurnost proizvoda. Zbog toga

su posvuda u svijetu u velikoj mjeri potisnuti kemijski konzervansi bez obzira na njihovu učinkovitost. McDonald i sur. (1991.) utvrdili su da su bakterijski inokulanti sigurni, laki za korištenje i ne nagriza radne elemente poljoprivrednih strojeva te ne zagađuju okoliš. Pahlow i sur. (2003.) navode da su bakterije mliječne kiseline koje se nalaze u silaži pripadnici rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*. Kizilsimsek i sur. (2007.), Zhang i sur. (2009.) i Zielińska i sur. (2015.) utvrdili su da primjena bakterija iz roda *Lactobacillus* može poboljšati fermentaciju silaže lucerne, kvalitetu i aerobnu stabilnost. Također, mnoga su istraživanja utvrdila povoljne učinke bakterija mliječne kiseline na kemijski sastav i fermentaciju silaže lucerne (Bolsen i sur., 1996.; Silva i sur., 2016.). Tvrtke koje proizvode komercijalne inokulante očekuju da će novi sojevi i mješavine bakterija biti visoko konkurentni i da će poboljšati fermentaciju silaže smanjenjem pH i

Prof. dr. sc. Darko Uher (duher@agr.hr), Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska.

proizvodnjom veće količine mliječne kiseline u usporedbi sa spontano fermentiranom silažom. Tijekom siliranja bakterije mliječne kiseline fermentiraju ugljikohidrate topive u vodi do organskih kiselina, i to uglavnom mliječne kiseline, koja smanjuje pH i inhibira rast patogenih bakterija i bakterija kvarenja, kvasca i plijesni, što utječe na zagrijavanje i kvarenje silaže te na gubitke suhe tvari (Zhang i sur., 2009.). Mliječna kiselina trebala bi biti količinski dominantna kiselina u dobrim silažama. Ova je kiselina jača od drugih kiselina u silaži (octene, propionske i maslačne) i stoga je obično odgovorna za smanjenje pH vrijednosti silaže. Mliječna kiselina treba imati udio od najmanje 65 do 70 % od ukupnih kiselina u dobroj silaži (Kung, 2010.). Ovo je istraživanje provedeno kako bi se procijenilo koje mješavine bakterija (koje proizvode mliječnu kiselinu imaju veći potencijal za poboljšanje fermentacije kod silaže lucerne. Rezultati istraživanja pozitivno će doprinijeti rješavanju problema siliranja lucerne na mliječnim farmama u Republici Hrvatskoj.

MATERIAL I METODE

Za potrebe ovih istraživanja uzet je prvi otkos lucerne kultivar OS99, koja je pokošena u fenofazi početka cvatnje u 2022. godini. Nakon košnje lucerna je usitnjena sjeckalicom na duljinu od oko 10 mm. Kontrola i svi komercijalni inokulanti su razrijeđeni destiliranom vodom prije upotrebe kako bi se dobila ciljana količina primjene od 5 ml kg⁻¹ svježe mase lucerne za svaki tretman, a raspršena je pomoću aplikatora za raspršivanje te je masa lucerne ručno dobro izmiješana. Pripremljeni uzorci pakirani su u vakumirane PVC vrećice dimenzija (280 mm × 360 mm), a zatim su PVC vrećice (mikrosilos) završeni vakuumskim uređajem (*SmartVac STATUS SV2000*). Masa lucerne podijeljena je u šest jednakih dijelova (kontrola – silaža bez inokulanta) i silaža tretirana komercijalnim inokulantima (PIO1 – Pioneer 11H50, PIO2 – Pioneer 11AFT, SIL – Silko, BON – Bonsilage alfa i SAL – Sil–All4 × 4), sve silirano u mikrosilosima (Tablica 1.).

Tablica 1. Komercijalni inokulanti korišteni u istraživanjima

Table 1. Commercial inoculants used in the trials

Komercijalni inokulanti / Commercial inoculants	Aktivni sastojak / Active ingredient	Primjena broja jedinica koje formiraju kolonije/g ili ml krmiva / Application CFU/g and ml forage
CON – kontrola / (bez inokulanta) CON – control (without the inoculant)	–	–
PIO1 – Pioneer 11H50	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4 × 10 ⁸
PIO2 – Pioneer 11AFT	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	1.1 × 10 ¹¹
SIL – Silko for alfalfa	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus sp.</i>	1 × 10 ¹¹
BON – Bonsilage alfa	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	1.25 × 10 ¹¹
SAL – Sil–All4 × 4	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i> Alfa–amilaza, celuloza, beta–glukanaza, ksilanaza	2.5 × 10 ¹¹ 1 × 10 ¹¹ 1 × 10 ¹¹ 5 × 10 ¹¹

Ukupno je na 90 dana u tamnu prostoriju, na sobnu temperaturu od 22 °C, pohranjeno 30 uzoraka mikrosilosa (500 g). Dostavna vlaga (g kg⁻¹ svježeg uzorka) utvrđena je sušenjem uzoraka u sušioniku s ventilatorom (ELE International) na temperaturi od 60 °C do konstantne mase uzoraka. Laboratorijska suha tvar utvrđena je sušenjem 5 grama uzorka na temperaturi od 105 °C kroz 4 sata (ISO 6496). Pepeo je određivan zagrijavanjem suhih uzoraka u pećnici na 550 °C tijekom 2 sata. Udio sirovih masti određen je prema Soxhletovoj metodi, udio sirovih proteina određen je prema Kjeldahlu (AOAC, 2005), udio neutralnih deterdžent vlakana i kiselih deterdžent vlakana je utvrđen prema metodi Van Soesta i sur. (1991.) kuhanjem uzoraka u neutralnome i kiselom deterdžentu, NH₃-N određivan je destilacijskom metodom s pomoću analizatora Kjeltex 1026, a pH vrijednost izmjerena je pH metrom Hanna Instruments HI 83141 u masi silaže lucerne nakon otvaranja. Ugljikohidrati topljivi u vodi određeni su antronskom metodom korištenjem liofilizacije uzoraka, pri čemu su ugljikohidrati topljivi u vodi ekstrahirani vodom (Tomas i sur., 1977.). Udio mliječne, octene i maslačne kiseline analiziran je plinskim kromatografom

(GC–2014, Shimadzu, Kyoto, Japan) prema Faithfullu (2002.). Alkoholi su određeni modifikacijom metode za određivanje fermentacijskih produkata u silažama na HPLC–u (Canale i sur., 1984.). Na rezultatima analitičkih istraživanja praćenih pokazatelja provedena je statistička obrada primjenom statističkoga programa SAS Version 9.4 (SAS Inst. Inc., 2013.). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost korištenjem LSD vrijednosti ako je F–test bio signifikantan $p < 0,05$.

REZULTATI I RASPRAVA

Kvantitativno, količina kiseline koja je potrebna za smanjenje početnoga pH=6 na skladišno stabilni pH=4 ovisi o udjelu suhe tvari u silaži, udjelu ugljikohidrata topljivih u vodi i udjelu sirovih proteina. Nadalje, krmiva s visokim udjelom suhe tvari fermentiraju sporije od krmiva s niskim udjelom suhe tvari zbog niske aktivnosti vode (Rizk i sur., 2005.). Udio sirovih proteina (219 g kg⁻¹ suhe tvari) lucerne (Tablica 2.) bio je tipičan udio prijavljen u prethodnim istraživanjima (166–225 g kg⁻¹ suhe tvari), (Contreras–Govea i sur., 2011.; Lynch i sur., 2014.).

Tablica 2. Kemijski sastav krmiva lucerne kultivara OS99 prije siliranja u suhoj tvari

Table 2. Chemical composition of alfalfa herbage cultivar OS99 prior to ensiling in dry matter

Kemijski sastav / Chemical composition	Mean / Srednja vrijednost
Suha tvar u g kg ⁻¹ / Dry matter in g kg ⁻¹	346
Sirovi proteini u g kg ⁻¹ / Crude protein in g kg ⁻¹	219
Sirove masti u g kg ⁻¹ / Crude fat in g kg ⁻¹	33,1
Sirova vlakna u g kg ⁻¹ / Crude fibre in g kg ⁻¹	245
Pepeo u g kg ⁻¹ / Crude ash in g kg ⁻¹	91
Ugljikohidrati topljivi u vodi u g kg ⁻¹ / Water soluble carbohydrates in g kg ⁻¹	45
Kisela deterdžentska vlakna u g kg ⁻¹ / Acid detergent fibre in g kg ⁻¹	317
Neutralna deterdžentska vlakna u g kg ⁻¹ / Neutral detergent fibre in g kg ⁻¹	365
pH	6,2

Seglar (2003.) preporučuje da optimalan udio kiselih deterdžentskih vlakana bude manji od 300 g kg⁻¹ suhe tvari u silaži lucerne. Među silažama tretiranim komercijalnim inokulantima, ugljikohidrati topljivi u vodi preostali nakon fermentacije bili su najveći u silaži lucerne tretiranoj BON inokulantom (Tablica 3.). U usporedbi sa silažama SIL, PIO2, BON, SAL i kontrolom, ugljikohidrati topljivi u vodi preostali nakon fermentacije bili su najniži ($p < 0,05$) u silaži lucerne tretiranoj komercijalnim proizvodom PIO1. Spontana fermentacija u kontrolnoj silaži lucerne proizvela je niže udjele fermentacijskih kiselina; međutim, koristila je više šećera dostupnih u biljkama s manjim smanjenjem pH. Najveće smanjenje pH kod siliranja lucerne nakon 90 dana postignuto je komercijalnim proizvodima PIO1, SIL, SAL i PIO2, dok je BON inokulant proizveo najmanje

smanjenje pH u silaži lucerne (Tablica 4.). Dobro očuvana silaža lucerne s udjelom suhe tvari od 201–300 g kg⁻¹ ima pH vrijednost manju od 4,3, s udjelom suhe tvari od 301–400 g kg⁻¹ ima pH vrijednost manju od 4,5, dok silaža s udjelom suhe tvari od 401–500 g kg⁻¹ ima pH vrijednost manju od 4,7 (Škultéty, 1999.). Korištenjem komercijalnih inokulanata produkti fermentacije prebacuju se u silaže lucerne, što rezultira značajno ($p < 0,05$) većim udjelima mliječne i octene kiseline i značajno ($p < 0,05$) nižim udjelima maslačne kiseline, alkohola i amonijskoga dušika u usporedbi s kontrolom, kao što je navedeno u Tablici 4. To ukazuje da je dodavanje komercijalnih inokulanata omogućilo bržu proizvodnju mliječne kiseline koja potiskuje puferski učinak mahunarki i trava, kao što su predložili Adesogan i Salawu (2004.).

Tablica 3. Sastav hranjivih tvari u silaži lucerne u g kg⁻¹ suhe tvariTable 3. Nutritional composition of the alfalfa silages in g kg⁻¹ dry matter

Komercijalni inokulanti / Commercial inoculants	Suha tvar / Drymatter	Sirovi proteini / Crude protein	Neutralna deterdžentska vlakna / Neutral detergentfibre	Kisela deterdžent- ska vlakna / Acid detergentfibre	Ugljikohidrati topljivi u vodi / Water soluble carbohydrates
CON	325 ^a	190 ^a	380 ^a	330 ^a	6,88 ^a
PIO1	340 ^a	208 ^a	357 ^a	315 ^a	2,97 ^e
PIO2	335 ^a	202 ^a	365 ^a	323 ^a	3,56 ^c
SIL	338 ^a	205 ^a	361 ^a	319 ^a	3,19 ^d
BON	328 ^a	198 ^a	373 ^a	326 ^a	4,29 ^b
SAL	337 ^a	212 ^a	359 ^a	317 ^a	3,73 ^c

Različita slova u stupcu znače značajnu razliku ($p < 0,05$) /Different letters in the column mean significant difference ($p < 0,05$)

U silažama lucerne koje su tretirane komercijalnim inokulantima proizvedene su značajno veće ($p < 0,05$) količine mliječne kiseline od kontrole. Silaža lucerne tretirane komercijalnim proizvodima PIO1, SIL i PIO2 imale su veći udio mliječne kiseline od silaže tretirane komer-

cijalnim proizvodom BON i SAL (Tablica 4.). Općenito, glavni učinak komercijalnih inokulanata za silažu bila je povećana proizvodnja mliječne kiseline uz značajno smanjenje pH (Hashemzadeh–Cigari i sur. 2011.; Sánchez i sur., 2014.). Silaža lucerne tretirane komercijalnim inoku-

lantima PIO2 i BON—om imale su značajno veće ($p < 0,05$) udjele octene kiseline od silaže tretirane inokulantima SAL, PIO1 i SIL. Octena kiselina ima snažan antifungalni učinak, a njezin visok udio vjerojatno dovodi do poboljšanja aerobne stabilnosti silaže tretirane *Lactobacillus buchneri* (Kung i Ranjit, 2001.). Silaže lucerne tretirane komercijalnim inokulantima SAL i BON imale su niži udio mliječne kiseline ($p < 0,05$) u usporedbi sa silažama tre-

tiranim PIO1, SIL i PIO2 inokulantima, ali su proizvodele više ($p < 0,05$) mliječne kiseline nego kontrola (Tablica 4). Si i sur. (2018.) utvrdili su u svojim istraživanjima da silaža tretirana *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus buchneri* imaju značajno niži pH, manji udio maslačne i propionske kiseline te $\text{NH}_3\text{-N}$, a veći udio suhe tvari i više mliječne kiseline u usporedbi s kontrolom.

Tablica 4. Fermentacijski parametri silaže lucerne u g kg^{-1} suhe tvari

Table 4. Fermentation characteristics of the alfalfa silages in g kg^{-1} dry matter

Proizvodi / Products	pH	Mliječna kiselina / Lactic acid	Octena kiselina / Acetic acid	Omjer mliječne i octene kiseline / The ratio of lactic/acetic acid	Maslačna kiselina / Butyric acid	Alkoholi / Alcohols	Amonijski dušik / Ammoniacal nitrogen
CON	5,28a	32,3 ^c	18,9 ^c	1,71 ^b	5,43 ^a	7,35 ^a	98,9 ^a
PIO1	4,56a	75,7 ^a	23,3 ^b	3,25 ^a	0,97 ^d	2,90 ^c	49,3 ^e
PIO2	4,88a	65,6 ^a	37,3 ^a	1,76 ^b	1,60 ^c	2,24 ^c	56,2 ^c
SIL	4,65a	70,2 ^a	23,8 ^b	2,95 ^a	1,47 ^c	2,53 ^c	53,1 ^d
BON	5,08a	56,7 ^b	31,4 ^a	1,81 ^b	2,43 ^b	3,69 ^b	66,2 ^b
SAL	4,82a	53,1 ^b	20,3 ^c	2,62 ^a	1,91 ^c	4,59 ^b	57,8 ^c

Different letters in the column mean significant difference ($p < 0,05$) /

Različita slova u stupcu znače značajnu razliku ($p < 0,05$)

Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline manje su učinkovite u proizvodnji mliječne kiseline od homofermentativnih bakterija mliječne kiseline, što obično rezultira s većom količinom octene kiseline, višim pH, većom količinom etanola i većim gubitcima suhe tvari (Filya i sur., 2007.). Nadalje, Zhang i sur. (2009.) i Sánchez i sur. (2014.) zaključili su da tretirana silaža lucerne s komercijalnim inokulantima ima više mliječne i octene kiseline od kontrole. Najveći omjer mliječne kiseline i octene kiseline nakon siliranja u silažama lucerne dali su komercijalni proizvodi PIO1, SIL i SAL, dok su inokulanti PIO2 i BON dali najmanji omjer mliječne i octene kiseline u silažama lucerne (Tablica 4.). Mnoga su istraživanja utvrdila da octena kiselina ima antigljivična svojstva i smanjuje aerobno kvarenje silaže te rast plijesni i kvasaca (McDonald i sur., 1991.; Schmidt i sur., 2009.). Inače, octena kiselina se prirodno proizvodi tijekom fermentacije s komercijalnim inokulantima ili bez njih. Seglar (2003.) je utvrdio da je prisutnost maslačne kiseline u silaži rezultat aktivnosti klostridije. Spore klostridije razgrađuju mliječnu kiselinu u maslačnu. Pahlow i sur. (2003.) utvrdili su da sprječavanje aktivnosti klostridije rezultira nižim pH, što je postignuto u tretiranoj silaži s komercijalnim inokulantima PIO1, SIL, SAL i PIO2. Prema Škultétyju (1999.), kvalitetna silaža lucerne ima niži udio maslačne kiseline, ispod $2,5 \text{ g kg}^{-1}$ suhe tvari. U usporedbi s kontrolom (Tablica 4.), u silaži lucerne udio $\text{NH}_3\text{-N}$ bio je značajno niži ($p < 0,05$) u silažama tretiranim komercijalnim inokulantima. Viši udio $\text{NH}_3\text{-N}$ ukazuje na razgradnju proteina uslijed proteolitičke enzimske aktivnosti (Seglar, 2003.). Obično silaža s visokim udjelom $\text{NH}_3\text{-N}$ u kombinaciji s maslačnom kiselinom također može sadržavati značajne udjele drugih nepoželjnih krajnjih proizvoda kao što su amini, koji mogu smanjiti učinak u proizvodnji kod životinja (Kung i Shaver, 2001.).

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja utvrdili su da je, u usporedbi s kontrolom, udio mliječne i octene kiseline bio značajno veći u silaži lucerne tretiranoj komercijalnim inokulantima PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL. Silaža lucerne tretirana komercijalnim inokulantima PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL imala je niži udio kiselih i neutralnih deterdžentskih vlakana, niži pH te značajno niži ($p < 0,05$) udio maslačne kiseline, alkohola i $\text{NH}_3\text{-N}$ u usporedbi s kontrolom. Niži pH u silažama tretiranim komercijalnim inokulantima vjerojatno je inhibirao razgradnju proteina i stoga je udio $\text{NH}_3\text{-N}$ bio niži u tim uzorcima, što pokazuje pozitivan učinak komercijalnih inokulanata PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL na hranjivu vrijednost silaže lucerne. Dodavanje komercijalnih inokulanata PIO1, PIO2, SIL, BON i SAL može biti obećavajuća praksa u poboljšanju fermentacije, očuvanje hranjivih tvari u silaži lucerne te povećanje njihove dostupnosti u hranidbi preživača na farmi.

LITERATURA

- Adesogan, A.T., Salawu, M.B. (2004). Effect of applying formic acid, heterolactic bacteria or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation of bi-crops of peas and wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 983–992. <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1745>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), (2005). *Official Methods of Analysis*. 18th ed. AOAC, Gaithersburg, MD.
- Bolsen, K.K., Ashbell, G., Weinberg, Z.G. (1996). Silage fermentation and silage additives. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 9 (5), 483–493. <https://dx.doi.org/10.5713/ajas.1996.483>
- Canale, A., Valente, M.E., Ciotti, A. (1984). Determination of volatile carboxylic acids (C1–C5i) and lactic acid in

- aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35 (11), 1178–1182
5. Coblenz, W. K., Muck, R.E. (2012). Effects of natural and simulated rainfall on indicators of ensilability and nutritive value for wilting alfalfa forages sampled before preservation as silage. *Journal Dairy Sciences*, 95 (11), 6635–6653. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5672>
 6. Contreras–Govea, F.E., Muck, R.E., Mertens, D.R., Weimer, P.J. (2011). Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 163, 2–10. <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.015>
 7. Davies, D.R., Theodorou, M.K., Kingston–Smith, A.H., Merry, R.J. (2005). Advances in silage quality in the 21st century. In: 14th International silage conference. Belfast, Northern Ireland, 121–133.
 8. Faithfull, N. (2002). *Methods in Agricultural Chemical Analysis: A Practical Handbook*. Wallingford: CABI Publishing.
 9. Filya, I., Muck, R.E., Contreras–Govea, F.E. (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*, 90, 5108–5114. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-877>
 10. Hashemzadeh–Cigari, F., Khorvash, M., Ghorbani, G.R., Taghizadeh, A. (2011). The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *South African Journal of Animal Science*, 41 (4), 377–388. <https://dx.doi.org/10.4314/sajas.v41i4.8>
 11. Kizilsimsek, M., Schmidt, R.J., Kung, L.Jr. (2007). Effects of a mixture of lactic acid bacteria applied as a freeze–dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), 5698–5705. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0448>
 12. Kung, L. (2010). Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. In: California Alfalfa & Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference. Visalia, California, 1–2 December 2010, University of California, 1–14.
 13. Kung, L. Jr., Ranjit, N.K. (2001). The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal Dairy Science*, 84, 1149–1155. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74575-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74575-4)
 14. Kung, L., Shaver, R. (2001). Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage*, 3 (13), 1–5.
 15. Lynch, J.P., Jin, L., Lara, E.C., Baah, J., Beauchemin, K.A. (2014). The effect of exogenous fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase–producing inoculant on the fibre degradability, chemical composition and conservation characteristics of alfalfa silage. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.03.013>
 16. McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. (1991). *The biochemistry of silage*. 2nd edition. Bucks, UK: Chalcombe Publ.
 17. Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H. (2003). Microbiology of ensiling. *Silage Science and Technology*, 42, 31–39.
 18. Repetto, J. L., Echarri, V., Aguerre, M., Cajarville, C. (2011). Use of fresh cheese whey as an additive for lucerne silages: effects on chemical composition, conservation quality and ruminal degradation of cell walls. *Animal Feed Science and Technology*, 170, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.09.004>
 19. Rizk, C., Mustafa, A.F., Phillip, L.E. (2005). Effects of inoculation of high dry matter alfalfa silage on ensiling characteristics, ruminal nutrient degradability and dairy cow performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 743–750. <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2034>
 20. Si, H., Liu, H., Li, Z., Nan, W., Jin, C., Sui, Y., Li, G. (2018). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* addition on fermentation, bacterial community and aerobic stability in lucerne silage. *Animal Production Science*, 59, 8. <https://doi.org/10.1071/AN16008>.
 21. Sánchez, D.J.I., Serrato, C.J.S., Reta, S.D.G., Ochoa, M.E. Reyes, G.A. (2014). Assessment of ensilability and chemical composition of canola and alfalfa forages with or without microbial inoculation. *Indian Journal of Agricultural Research*, 48(6), 421–428. <https://dx.doi.org/10.5958/0976-058X.2014.01325.0>
 22. Schmidt, R., Hu, W., Mills, J., Kung, L. (2009). The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 92, 5005–5010. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1701>
 23. Seglar, B. (2003). Fermentation analysis and silage quality testing. In: Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference, Bloomington, Minnesota, 29 May 2003, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 119–136.
 24. Silva, V.P., Pereira, O.G., Leandro, E.S., Da Silva T.C., Ribeiro, K.G., Mantovani, H. C., Santos, S.A. (2016). Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. *Journal of Dairy Science*, 99 (3), 1895–1902. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9792>
 25. Statistical Analysis System (2013). *User's guide: Statistics (Version 8.02)*. Cary, USA: SAS Institute Inc.
 26. Škultéty, M. (1999). Evaluation of quality in silages. In: Forage conservation. Nitra, Slovak Republic, 6–8 September 1999, Research Institute of Animal Production, 46–49.
 27. Tomas, T.A. (1977). An automated procedure for the determination of soluble carbohydrate in herbage. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28, 639–642.
 28. Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
 29. Zhang, T., Li, L., Wang, X., Zeng, Z., Hu, Y., Cui, Z. (2009). Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 965–971. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9973>
 30. Zielińska, K., Fabiszewska, A., Stefańska, I. (2015). Different aspects of *Lactobacillus* inoculants on the improvement of quality and safety of alfalfa silage. *Chilean journal of agricultural research*, 75 (3), 298–306. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400005>

THE EFFECT OF COMMERCIAL INOCULANTS ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND FERMENTATION OF ALFALFA SILAGE

SUMMARY

Forage legumes are difficult to ensile, so it is necessary to apply a starter culture of the selected strains of lactic acid bacteria that support the ensiling process, prevent a bacterial butyric fermentation, and thus contribute to the preservation and improvement of silage quality. The aim of this study was to estimate the effects of commercial inoculants on the chemical composition and fermentation of alfalfa silage cultivar OS99. The alfalfa mass was subdivided into six equal portions (control – silage without inoculant) and silages treated with commercial inoculants (PIO1 – Pioneer 11H50, PIO2 – Pioneer 11AFT, SIL – Silko, BON – Bonsilage alfa and SAL – Sil–All4 × 4), all ensiled in microsilos. Subsequent to 90 days of ensiling, the silages were analyzed with regard to the chemical composition and fermentation characteristics. The dry matter and crude protein values were higher, whereas the lactic and acetic acid values were significantly ($p < 0.05$) higher in the silage treated with the inoculants PIO1, PIO2, SIL, BON, and SAL when compared to the control silage. On the contrary, the alfalfa silage treated with the inoculants PIO1, PIO2, SIL, BON, and SAL had the lower values of acid detergent fiber, neutral detergent fiber, and the pH and significantly ($p < 0.05$) lower values of butyric acid, alcohols, and $\text{NH}_3\text{-N}$ when compared to the control silage. The results demonstrated that the commercial inoculants PIO1, PIO2, SIL, BON, and SAL increase the quality silage of alfalfa cultivar OS99 when compared to the control silage.

Keywords: alfalfa, silage, commercial inoculants, chemical composition, fermentation parameters

(Primljeno 26. siječnja 2023.; prihvaćeno 10. travnja 2024. – Received on January 26, 2023; accepted on April 10, 2024)