

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Liza Babić

**Primjena inokulanta u cilju poboljšanja probavljivosti
silaze rehidriranog zrna kukuruza kod ovaca**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, pod vodstvom doc. dr. sc. Marije Duvnjak i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

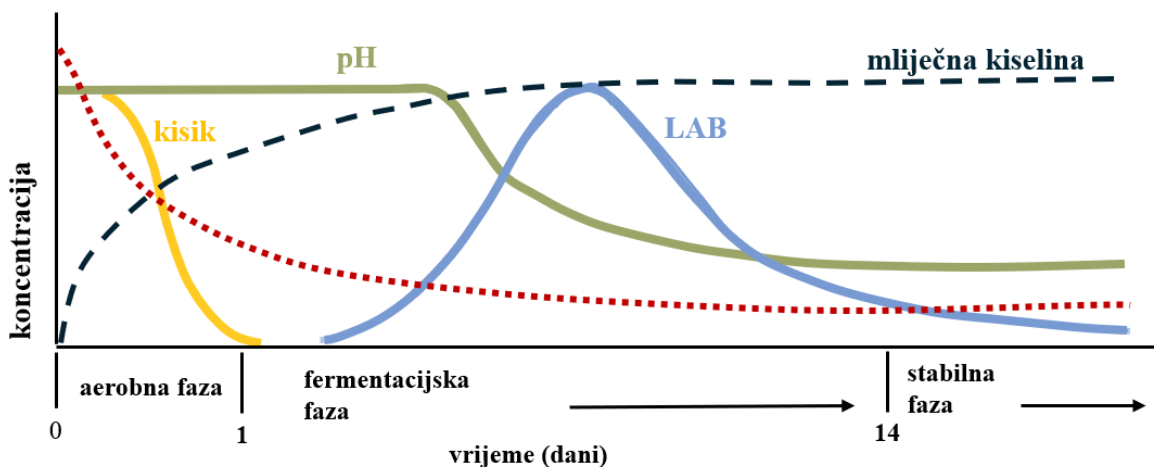
Sadržaj

1. Uvod	1
2. Hipoteza i opći te specifični ciljevi rada	6
3. Materijali i metode	7
3.1. Priprema silaže	7
3.2. Pokusni dizajn	9
3.3. Smještaj životinja	11
3.4. Hranidbeni tretmani	12
3.5. Prikupljanje i vaganje fecesa	14
3.6. Kemijske analize	15
3.7. Mikrobiološke analize silaža	17
3.8. Fermentacijski parametri	18
3.9. Statistička obrada podataka	20
4. Rezultati	21
4.1. Parametri probavljivosti testiranih tretmana u ovaca	21
4.2. Fermentacijski parametri u testiranim tretmanima za probavljivost	23
4.3. Mikroorganizmi	30
5. Rasprava	33
6. Zaključak	38
7. Zahvale	39
8. Literatura	40
9. Sažetak	46
10. Summary	47
11. Životopis	48

1. Uvod

Silaže su tip fermentirane hrane za životinje u kojem se konzerviranje biljne mase događa u anaerobnim uvjetima pomoću bakterija mliječne kiseline (*engl. lactic acid bacteria*, LAB) pri čemu dolazi do pretvorbe ugljikohidrata do organskih kiselina, uglavnom mliječne koja snižava pH (McDonald i sur., 1991). Nizak pH sprječava gubitke hranjivih tvari od žetve i skladištenja do hranidbe te se zbog toga silaže primjenjuju u cijelom svijetu, a ujedno i olakšavaju upotrebu biljne zelene mase tijekom cijele godine (Han i sur., 2022).

Siliranje se dijeli na četiri faze: aerobnu fazu, fazu fermentacije ili aktivnu fazu, stabilnu fazu i fazu izuzimanja silaže. Aerobna faza započinje od trenutka spremanja biljne mase u silos pa sve do njegova zatvaranja i potrošnje kisika u silažnoj biljnoj masi. U ovoj fazi zbog prisutnosti kisika aktivni su aerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi poput kvasaca, plijesni i enterobakterija (McDonald i sur., 1991; Avila i sur., 2019). Kad kisik nestane, slijedi faza fermentacije (slika 1) u kojoj anaerobne LAB pretvaraju vodotopljive šećere u mliječnu kiselinu ($\text{pH} < 5$) koja sprječava negativan utjecaj enterobakterija, klostridija, kvasaca i plijesni na razgradnju hranjivih tvari te tako i na kvalitetu silaže. Ako je djelovanje LAB nedovoljno ili neefikasno da snizi pH dovoljno brzo na optimalnu razinu, rast nepoželjnih mikroorganizama se nastavlja i usmjerava fermentaciju u nepoželjne produkte, primjerice maslačnu kiselinu (McDonald i sur., 1991). Stabilna faza započinje nakon uspostave kiselih uvjeta u silaži ($\text{pH} < 4,5$) i usporavanja anaerobne mikrobiološke aktivnosti zbog niskog pH. Četvrta faza naziva se faza izuzimanja silaže u kojoj zbog hranidbe dolazi do otvaranja silosa. U ovoj fazi, uslijed otvaranja dolazi do aeracije silaže te kisik prodire kroz površinu silaže što omogućava rast mikroorganizama koji se razvijaju u aerobnim uvjetima (kvasci, plijesni, bakterije octene kiseline). Izrazita aktivnost aerobnih mikroorganizama smanjuje hranjivu vrijednost silaže i do 100 % (McDonald i sur., 1991). Glavni cilj pri proizvodnji silaže je što brže i učinkovitije prijeći iz aerobne u stabilnu fazu pomoću fermentacije te pritom svesti izloženost kisiku na minimum. Stoga se mnogi važni faktori upravljanja silažom fokusiraju na uspješnost fermentacije te ograničavanje izloženosti kisiku tijekom izuzimanja (Johnson i Harrison, 2002).



Slika 1. Prikaz promjene koncentracija kisika, pH i bakterija mliječne kiseline (LAB) tijekom različitih faza siliranja
(adaptirano iz Collins i Owens, 2003)

Kukuruz (lat. *Zea mays*) najvažnija je žitarica u hranidbi životinja i jedna je od najčešće korištenih sirovina za silažu zbog visoke produktivnosti po hektaru s visokom nutritivnom kvalitetom. Raznovrsni su tipovi silaža od kukuruza, od silaže cijele biljke kukuruza do visokovlažnog zrna kukuruza ili rehidriranog zrna kukuruza koji uključuju samo siliranje zrna (McDonald i sur., 1991). Karakteristike kukuruza omogućuju idealne uvjete za fermentaciju kao što su sadržaj suhe tvari u visokovlažnom i rehidriranom kukuruзу između 65 i 70 %, nizak puferni kapacitet i visok sadržaj vodotopljivih ugljikohidrata (Oliveira i sur., 2018). Te dodatno, siliranje kukuruza, osim u svrhu konzerviranja biljne mase, u praksi se često primjenjuje u situacijama kada nepovoljni vremenski uvjeti, neizjednačenost optimalnog roka žetve sa stanjem usjeva ili neki drugi čimbenici onemogućavaju berbu i skladištenje suhog zrna kukuruza. Ovo ističu i Borreani i sur. (2018) navodeći da sva krma koja nije izravno ubrana i konzervirana mora proći proces sušenja kako bi se smanjila vlaga, no tijekom tog procesa često dolazi do gubitaka hranjivih tvari i promjene kvalitete. Silaža rehidriranog zrna kukuruza, ako je fermentacija optimalna, pruža alternativnu opciju sušenju kukuruza koja potencijalno može poboljšati hranjivu vrijednost kukuruza povećanjem njegove probavljivosti i stabilnosti, a ujedno i sprječavanjem većih gubitaka hranjivih tvari (Wilkinson, 2015.; Gandra i sur., 2024).

Silaža cijele biljke kukuruza i rehidriranog zrna kukuruza primarno se koriste u hranidbi goveda, ovaca i koza zbog specifičnosti poligastričnog probavnog sustava i mogućnosti dobivanja inače nedostupne energije iz vlaknastog biljnog materijala. Njihova sposobnost fermentacije hrane pomoću mikrobne populacije unutar buraga rezultira pretvorbom složenih ugljikohidrata u hlapive masne kiseline koje služe kao glavni izvor energije (Niwińska, 2012). Iako je najveći broj istraživanja usmjeren na goveda, određeni dio istraživanja proveden je i na ovacama, pri čemu se najčešće ispituju učinci kukuruzne silaže na prirast i mliječnost, ali ne i silaže rehidriranog zrna kukuruza. Wu i sur. (2021) uspoređivali su učinke silaže cijele biljke kukuruza i silaže sirka na rast janjadi te su utvrdili da je hranidba kukuruznom silažom rezultirala bržim dnevnim prirastom, većim udjelom intramuskularne masti i intenzivnijom bojom mesa. Isto tako, u istraživanju Fluharty i sur. (2016) janjad hranjena kukuruznom silažom ostvarila je 21 % veći prosječni dnevni prirast i 50 % bolju konverziju hrane u odnosu na janjad hranjenu silažom lucerne, unatoč nižem dnevnom unosu hrane. S druge strane, novija istraživanja pokazuju da se silaža kukuruza može koristiti i u hranidbi svinja s ograničenjima u udjelu obroka. Primjerice, dodatak silaže cijele biljke kukuruza poboljšao je sastav crijevne mikrobiote i prirast svinja pasmine Hezuo (Yang i sur., 2024), dok je veći udio silaže smanjio oštećenja želučane sluznice (Spanghero i sur., 2024). Ma i sur. (2024) navode da uključivanje do 10 % silaže u hranidbu svinja povećava dnevni unos hrane, probavljivost sirovih proteina i vlakana te razvoj crijevnih resica. Ipak, silaža cijele biljke kukuruza i rehidriranog zrna kukuruza se i dalje najčešće koriste upravo u hranidbi preživača, gdje pokazuje najveću učinkovitost i gospodarski značaj (Allen i sur., 2003).

Kako bi se poboljšala kvaliteta fermentacije i aerobna stabilnost silaža tijekom hranidbe, široko se koriste mikrobnii dodaci na bazi određenih LAB (Han i sur., 2022). Homofermentativne LAB gotovo isključivo proizvode mliječnu kiselinu iz glukoze, čime brzo i učinkovito snižavaju pH u ranim fazama fermentacije, dok heterofermentativne LAB, osim mliječne kiseline, proizvode i octenu kiselinu, etanol i CO₂ te tako pridonose većoj aerobnoj stabilnosti silaža (Guan i sur., 2021). Naime, octena kiselina inhibira aktivnost kvasaca koji su prvi mikroorganizmi aerobnog kvarenja silaža. Kvasci metaboliziraju mliječnu kiselinu što za posljedicu ima porast pH čime se otvara put za aktivnost i ostalih mikroorganizama kvarenja, kao što su plijesni (Wilkinson i Davies, 2013). Stoga, oslanjanje samo na homofermentativne LAB postaje problem pri izuzimanju silaže, budući da tada mliječna kiselina postaje supstrat za rast kvasaca i druge laktat-asimilirajuće mikroorganizme (Blajman i sur., 2018), dok se kod heterofermentativnih sojeva nedostaci očituju u povećanim gubitcima suhe tvari i povišenju konačnog pH (Reich i Kung, 2010; Tobacco i sur., 2011). Kako bi se prevladavala ta ograničenja, razvijeni su inokulanti dvostruke namjene koji kombiniraju homo- i heterofermentativne LAB (Comino i sur., 2014). Najčešće korištena heterofermentativna bakterija je *Lentilactobacillus buchneri*, dok se od homofermentativnih, uz *Lactiplantibacillus plantarum*, često upotrebljavaju i *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* i *Lactobacillus acidophilus* (Blajman i sur., 2018).

Studije potvrđuju da hranidba silažom tretiranom LAB ima pozitivan učinak na proizvodne rezultate preživača zbog otapanja proteina u kiselim uvjetima u silažama čime dolazi do veće dostupnosti hranjivih tvari i porasta probavljivosti (Han i sur., 2022). Primjerice, dodatak *L. plantarum* u silaži lucerne poboljšao je fermentaciju u buragu, probavljivost suhe tvari i vlakana te povećao proizvodnju mlijeka (Monteiro i sur., 2021). Slično tome, *Lactococcus lactis* i *L. buchneri* kod ovnova poboljšali su fermentacijska svojstva silaže uz bolju iskoristivost hranjivih tvari (Nkosi i sur., 2011). Novije istraživanje pokazuje da inokulacija kukuruzne silaže s *L. lactis* i *L. buchneri* može smanjiti unos suhe tvari silaža, ali isto tako povećati probavljivost hranjivih tvari, aerobnu stabilnost i proizvodnju mlijeka kod Holstein krava (Kok i sur., 2024). Međutim, učinci inokulacije na hranjivu vrijednost nisu uvijek jednaki. Rowghani i sur. (2008) su zabilježili nižu probavljivost proteina u kukuruznoj silaži inokuliranoj s *Propionibacterium acidipropionici* i *L. plantarum* za razliku do kontrolne silaže. Prema Filya i sur. (2007), inokulacija različitih vrsta silaža poboljšala je fermentacijska svojstva (smanjen pH, povećan omjer laktata i acetata ili oboje) u oko 60 % pokusa, dok je probavljivost suhe

tvori povećana u samo 30 % pokusa. Oliviera i sur. (2017) navode da učinak inokulacije na hranidbenu vrijednost silaže ovisi o vrsti biljke, dozi i formulaciji inokulanta te uvjetima siliranja. Općenito, iako inokulanti poput *L. plantarum* i *L. buchneri* poboljšavaju fermentacijsku kvalitetu silaže (niži pH, bolja aerobna stabilnost), učinci na probavljivost hranjivih tvari su varijabilni; dok neki autori bilježe poboljšanja, drugi ne uočavaju značajne promjene, a u nekim slučajevima mogući su i negativni učinci na određene komponente poput proteina (Rowghani i sur., 2008). Dodatno, često se zanemaruje usporedba između različitih tipova konzerviranja kukuruza, točnije suhi kukuruz u odnosu na silirani (Kung i sur., 2018; Muck i sur., 2018).

2. Hipoteza i opći te specifični ciljevi rada

Na temelju dosadašnjih istraživanja, postavljena je hipoteza da dodatak komercijalnog inokulanta LAB usmjerava fermentaciju tijekom siliranja, čime se postiže optimalna konzervacija silaže. Posljedično, očekuje se da će silaža s dodatkom inokulanta imati poboljšanu probavljivost ST i sirovih bjelančevina u odnosu na kontrolnu silažu bez inokulanta.

Siliranje rehidriranog zrna kukuruza predstavlja praktičnu alternativu u slučajevima kada sušenje zrna nije izvedivo, bilo zbog visokih troškova, nepovoljnih vremenskih uvjeta ili logističkih ograničenja. Iako se očekuje viša probavljivost u silažama, često nekontrolirano siliranje bez dodatka inokulanata rezultira suboptimalnom fermentacijom i nižom probavljivošću u usporedbi sa suhim kukuruzom.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka LAB inokulanta pri siliranju rehidriranog zrna kukuruza na fermentacijsku kvalitetu silaže te na *in vivo* probavljivost suhe tvari i sirovih bjelančevina kod ovaca.

Specifični ciljevi istraživanja:

- Odrediti sadržaj osnovnih fermentacijskih parametara (glukoze, fruktoze, te mliječne, octene, propionske i maslačne kiseline, kao i metanola, etanola i 1,2-propandiola) u različitim hranidbenim tretmanima: silaži s dodatkom LAB inokulanta, kontrolnoj silaži bez inokulanta i suhom kukuruzu.
- Usporediti broj mikroorganizama ključnih za fermentacijsku kvalitetu (LAB, plijesni i kvasci) između navedenih tretmana.
- Usporediti *in vivo* probavljivost suhe tvari i sirovih bjelančevina, kao i proizvodne parametre (tjelesnu masu i konzumaciju ST) kod ovaca hranjenih različitim tretmanima (silaža s LAB inokulantom, kontrolna silaža, suhi kukuruz).

3. Materijali i metode

3.1. Priprema silaže

3.1.1. Agrotehnika kukuruza

Kukuruz merkantilni BC 572 (BC Institut d.o.o.) posijan je 25. travnja 2024. godine u mjestu Privlaka, Vukovarsko-srijemska županija. Tlo je prethodno bilo jesenski zaorano uz primjenu PK gnojiva 20:30 (200 kg/ha; Elixir Zorka, Srbija), a u predsjetvenoj gnojidbi za poboljšanje strukture tla dodan je biofiziološki aktivator tla GeO_2 (Olmix, Francuska) u količini 200 kg/ha. Tijekom vegetacije provedena je zaštita od korova primjenom sredstva PacK4Asa (480 g/L dikamba, 250 g/kg rimsulfuron, 100 g/L mezotrion, 40 g/L nikosulfuron; Stockton d.o.o., Hrvatska) u količini preporučenoj za 2 ha površine, a folijarna prihrana sredstvom SeaMac 45 (Stockton d.o.o., Hrvatska) - biostimulatorom na bazi morskih algi (*Ascophyllum nodosum*), fitohormona i aminokiselina u količini 2 L/ha. Žetva je obavljena u periodu 13. – 14. rujna 2024. godine s pomoću kombajna Deutz Fahr M 36.10 (Deutz Fahr, Njemačka), u stadiju mliječno-voštane zrelosti.

3.1.2. Priprema silaža rehidriranog zrna kukuruza

Priprema silaža provedena je na području Babine Grede, Vukovarsko-srijemska županija, na privatnom posjedu i staji (45°06'57.53" sjeverne geografske širine i 18°32'29.77" istočne geografske dužine). Kukuruz je najprije usitnjen s pomoću mlina čekićara (Lifam d.o.o, Srbija) na situ veličine pora 8 mm. Samljeveni kukuruz rehidriran je na oko 70 % ST dodatkom destilirane vode u potrebnoj količini (na 100 kg kukuruza dodano je 31,42 L destilirane vode; slika 2). Nakon rehidracije, kukuruz je ravnomjerno raspoređen u dva dijela za proizvodnju, prvi za silažu s inokulantom a drugi za kontrolnu silažu bez dodatka inokulanta.

Komercijalan inokulant Bonsilage CCM (Schaumann, Njemačka) korišten je za pripremu silaže s dodatkom inokulanta. Inokulant sadrži mješavinu homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline: *Lentilactobacillus buchneri*, *Lactiplantibacillus plantarum* i *Lacticaseibacillus rhamnosus* u količini $1,25 \times 10^{11}$ CFU/g. Inokulant za siliranje pripremljen je prema uputama proizvođača, u dozi od 2 g na tonu silaže, a zatim ravnomjerno apliciran na



Slika 2. Rehidriranje samljevenog BC 572 kukuruza
(vlastiti izvor)

samljeveni i rehidrirani kukuruz. Ista količina destilirane vode korištene za pripremu inokulanta aplicirana je i na kontrolnu silažu.

Nakon inokulacije, pripremljena masa rehidriranog kukuruza za svaki tretman pakirana je i čvrsto nabijena u plastične bačve zapremnine 120 L. Svaka bačva hermetički je zatvorena zateznim zatvaračem, a zbog stvaranja što boljih anaerobnih uvjeta, dodatno oblijepljena samoljepljivom trakom. Na vrhu bačvi nalazile su se tzv. vrenjače koje su istovremeno onemogućavale ulazak O_2 ali su omogućavale izlazak CO_2 iz bačvi. Bačve su skladištene na sobnoj temperaturi, a razdoblje fermentacije trajalo je 106 dana (slika 3).



Slika 3. Lijeva bačva = kontrolna silaža (KONT),
desna bačva = silaža s inokulantom (INOK)
(vlastiti izvor)

3.2. Pokusni dizajn

Hranidbeno istraživanje provedeno je na istom posjedu u Babinoj Gredi, gdje je prethodno pripremljena silaža. Istraživanje je trajalo od ožujka do travnja 2025. godine, a provođeno je na devet ženskih ovaca pasmine njemački merino, prosječne starosti 1,5 god i tjelesne mase 43 kg (slika 4).



Slika 4. Ovce pasmine njemački merino korištene u istraživanju
(vlastiti izvor)

Hranidbeno istraživanje provedeno je u obliku 3x3 *crossover* dizajna pri čemu je svaka životinja tijekom istraživanja bila hranjena sa sva tri hranidbena tretmana, ali u različitim periodima prema unaprijed definiranom planu, kako bi se smanjio utjecaj individualnih razlika među životinjama. Istraživanje se sastojalo od tri pokusna perioda, svaki u trajanju od sedam dana u kojem se provodila totalna kolekcija fecesa svake životinje za izračun probavljivosti. Svakom pokusnom periodu prethodio je pripremni period od deset dana tijekom kojeg su životinje prilagođavane novom tretmanu. Na kraju svakog pokusnog perioda ovce su vagane (slika 5).



Slika 5. Vaganje ovaca na kraju svakog pokusnog perioda
(vlastiti izvor)

3.3. Smještaj životinja

Minimalni zahtjevi za držanje ovaca u znanstvenim pokusima definirani su u „Guidelines for the Housing of Sheep in Scientific Institutions“ (NHMRC, 2004). Prema tim smjernicama, preporučena minimalna površina iznosi 1,5 m² po ovci, dok visina pregrada u komercijalnim objektima za odrasle ovce iznosi oko 1 m. U skladu s tim preporukama, devet ovaca uključenih u istraživanje bilo je smješteno u pojedinačne boksove dimenzija 1,5 x 2 m (3 m²) što je iznad minimalno preporučene površine. Boksovi su bili smješteni unutar staje s prirodnom svjetlošću i ventilacijom. U svakom su se boksu nalazile posude s vodom koju su ovce dobivale *ad libitum*¹. Unutar svakog boksa postavljene su i hranilice namijenjene za konzumaciju obroka prema pripadajućem hranidbenom tretmanu za svaku ovcu, jasele za sijeno te mineralni blok koji su ovce imale mogućnost neograničeno konzumirati (slika 6).



Slika 6. Mineralni blok, jasele, posuda za vodu i hranu u boksu (a); boksovi za smještaj ovaca (b, c); ovce u pripremnom (d, e) i pokusnom periodu (f)
(vlastiti izvor)

¹ *Ad libitum*- slobodan pristup hrani i vodi, bez ikakvih ograničenja

3.4. Hranidbeni tretmani

Obrok ovaca tijekom istraživanja pripremljen je u skladu s Goulas i sur. (2001). Svaka ovca dobivala je dnevno 500 g sijena te 400 g koncentratnog dijela obroka u kojem su se razlikovali tretmani. U istraživanju su primijenjena tri različita hranidbena tretmana - koncentrata:

- Tretman 1: silaža rehidriranog zrna kukuruza s dodatkom inokulanta
- Tretman 2: silaža rehidriranog zrna kukuruza bez inokulanta (kontrolna silaža)
- Tretman 3: suhi kukuruz istog hibrida iz kojeg su pripremljene silaže (BC 572) koji je samljeven na istom mlinu čekićaru s istom veličinom sita (8 mm) kao kod pripreme silaža

Kemijski sastav upotrijebljenih krmiva nalazi se u tablici 1.

Ovce su hranjene jedanput dnevno u pojedinačne hranilice. Svaki je obrok prethodno bio vagan, a eventualni ostatak obroka evidentiran kako bi se izračunala konzumacija suhe tvari.

Tablica 1. Kemijski sastav silaža rehidriranog zrna kukuruza (s i bez dodatka inokulanta), suhog kukuruza i sijena

Dio obroka ovaca	ST	SP	SB	NDV
Silaža s inokulantom	671 g/kg	14 g/kg ST	63,93 g/kg ST	/
Kontrolna silaža	699 g/kg	15 g/kg ST	66,2 g/kg ST	/
Suhi kukuruz	871 g/kg	15 g/kg ST	89,4 g/kg ST	/
Sijeno	933 g/kg	79,31 g/kg ST	98,92 g/kg ST	500,54 g/kg ST

*ST = suha tvar, SP = sirovi pepeo, SB = sirove bjelančevine, NDV = neutralna detergent vlakna

Sijeno je bilo proizvedeno od djetelinsko travne smjese čiji je botanički sastav prikazan u tablici 2². Sijeno je košeno 2./3. svibnja 2024. na području Županje, a za potrebe istraživanja korišten je prvi otkos. Nakon košnje, sijeno je sušeno na polju do suhe tvari prikladne za skladištenje te je uskladišteno u suhom i natkrivenom prostoru do početka pokusa.

Tablica 2. Botanički sastav djetelinsko-travne smjese

Botanički sastav
<i>Achillea millefolium</i> (obični stolisnik)
<i>Arrenatherum elatius</i> (francuski ljulj)
<i>Bellis perennis</i> (obična tratinčica)
<i>Centaurea jacea</i> (livadna zečina)
<i>Dactylis glomerata</i> (klupčasta oštrica)
<i>Festuca pratensis</i> (livadna vlasulja)
<i>Galium mollugo</i> (obična broćika)
<i>Geranium molle</i> (mekana iglica)
<i>Knautia arvensis</i> (poljska prženica)
<i>Lathyrus pratensis</i> (livadna graholika)
<i>Leucanthemum vulgare</i> (proljetna ivančica)
<i>Lolium perenne</i> (višegodišnji ljulj)
<i>Lotus corniculatus</i> (roščićava svinjduša)
<i>Phleum pratense</i> (livadna mačica)
<i>Plantago lanceolata</i> (uskoliski trputac)
<i>Poa pratensis</i> (livadna vlasnjača)
<i>Prunella vulgaris</i> (obična celinščica)
<i>Ranunculus acris</i> (livadni žabnjak)
<i>Rumex acetosa</i> (obična kiselica)
<i>Sanguisorba officinalis</i> (ljekovita krvara)
<i>Trifolium pratense</i> (livadna djetelina)
<i>Trifolium repens</i> (puzava djetelina)
<i>Veronica chamaedrys</i> (drvorednodlakava čestoslavica)
<i>Vicia cracca</i> (ptičja grahorica)

² Provjera latinskih i hrvatskih naziva djetelinsko-travne smjese provedena je pomoću baze podataka *Flora Croatica Database (FCD)*, dostupne na: <https://hirc.botanic.hr/fcd/>

3.5. Prikupljanje i vaganje fecesa

Prikupljanje fecesa provodilo se svakodnevno tijekom pokusnog perioda. Ovce su bile smještene pojedinačno, što je omogućilo odvojeno prikupljanje uzoraka fecesa. Feces je prikupljan ujutro, ručno, pomoću lopatice i metle. Potencijalni ostaci sijena uklonjeni su pomoću sita, kako bi se osigurala reprezentativnost uzoraka fecesa (slika 7). Reprezentativni dio svakog uzorka fecesa nakon prikupljanja i vaganja spremljen je u plastične vrećice i pohranjen na -20 °C do kemijskih analiza.



Slika 7. Prikupljanje fecesa i separacija neželjenih ostataka sijena (a) i vaganje fecesa (b)
(vlastiti izvor)

Metoda potpune kolekcije fecesa korištena je za izračun probavljivosti suhe tvari i sirovih bjelančevina. Probavljivost (%) se izračunava pomoću niže navedene formule iz Kljak i Duvnjak (2023). Koeficijent probavljivosti dobiven je usporedbom količine ST koju je životinja pojela s količinom ST koja je neprobavljena izlučena fecesom odnosno količine pojedenih i izlučenih SB:

$$\text{Probavljivost suhe tvari (PST)} = \frac{\text{pojedeni ST} - \text{izlučeni ST}}{\text{pojedeni ST}} * 100$$

$$\text{Probavljivost sirovih bjelančevina (PSB)} = \frac{\text{pojedene SB} - \text{izlučene SB}}{\text{pojedene SB}} * 100$$

3.6. Kemijske analize

Kemijske analize za određivanje sadržaja suhe tvari i sirovih bjelančevina za izračun probavljivosti te analize fermentacijski parametara odrađene su u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

3.6.1. Određivanje sadržaja suhe tvari

Ukupan broj uzoraka fecesa za analizu suhe tvari i sirovih bjelančevina bio je 189. Sadržaj suhe tvari određen je sušenjem u sušioniku (slika 8) UFE 400 (Memmert, Njemačka) do konstantne mase na 105 °C u skladu s normom HRN ISO 6496:2001 (DZNM, 2001). Na temelju razlike mase uzoraka prije i poslije sušenja vaganjem na analitičkoj vagi ML204T/00 (Mettler Toledo, Švicarska) izračunat je sadržaj suhe tvari u uzorku. Ista metoda se koristila i za određivanje suhe tvari u uzorcima hrane za životinje.



Slika 8. Određivanje suhe tvari pojedinačnog uzorka fecesa
(vlastiti izvor)

3.6.2. Određivanje sadržaja sirovog pepela

Određivanje sirovog pepela provodilo se prema normi HRN ISO 5984:2023 (Kljak i Duvnjak, 2023). Uzorak od 3 g spaljen je na 550 °C u mikrovalnoj peći (Pyro 260, Milestone, Italija). Nakon tri sata, uzorak je ohlađen i navlažen destiliranom vodom te osušen i ponovno spaljen kroz jedan sat. Na temelju mase uzorka prije i poslije spaljivanja, određen je sadržaj sirovog pepela u uzorku.

3.6.3. Određivanje sadržaja sirovih bjelančevina

Određivanje sadržaja sirovih bjelančevina provedeno je Kjeldhalovom metodom, u skladu s normom HRN EN ISO 5983-2:2010 (DZNM, 2010). Ukratko, 2,5 g uzorka fecesa izvavano je u Kjeldhalove tube. Uzorku je zatim dodano 7,5 g katalizatora, smjesa modre galice i kalijevog sulfata i 10 mL koncentrirane sumporne kiseline, nakon čega je uzorak spaljen na 420 °C u bloku za spaljivanje (Foss, Danska). Destiliranje uzorka je izvršeno u automatskom sistemu Kjeltec 8200 (Foss, Danska) uz dodatak 35 %-tne otopine natrijeve lužine. Pri tom procesu dolazi do oslobađanja amonijaka koji je onda skupljen u 4 %-tnu otopinu borne kiseline uz dodatak indikatora brom-krezol-zeleno i metil-crveno. Destilat je potom titriran s 0,1 mol/L otopinom kloridne kiseline te je na temelju utroška kiseline izračunat sadržaj dušika u uzorku, dok je sadržaj sirovih bjelančevina izračunat množenjem sadržaja dušika s faktorom 6,25. Ista metoda se koristila i za određivanje sirovih bjelančevina u uzorcima hrane za životinje, pri tome je masa uzorka silaža bila oko 3 g, a za sijeno i suhi kukuruz 1 g.

3.6.4. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana

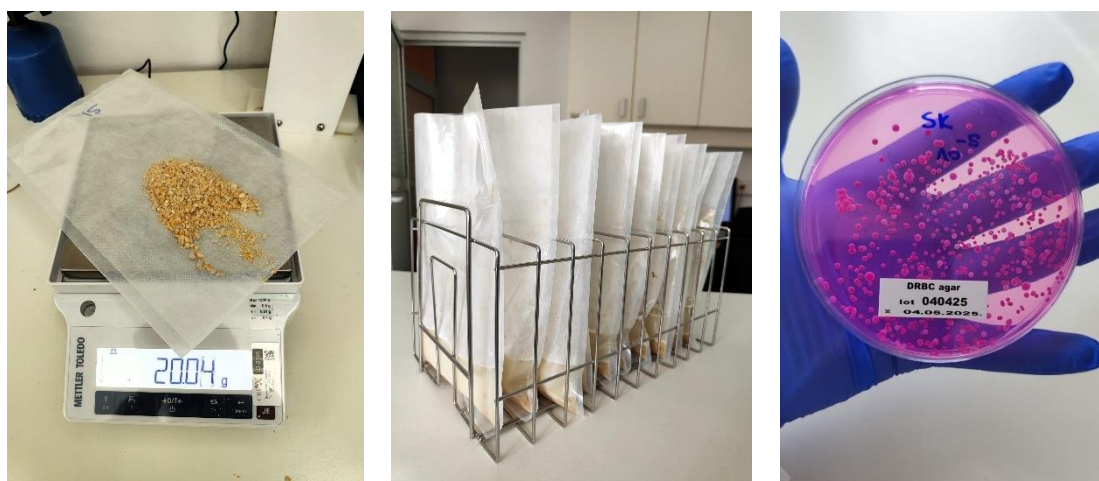
Sadržaj neutralnih detergent vlakana (NDV) u uzorku sijena određen je u skladu s normom HRN EN ISO 16472:2008 (DZNM, 2008) korištenjem Fibertec sustava, aparature za iskuhavanje i hladnu ekstrakciju, Fibertec system 2021 FiberCap (Foss, Švedska). Uzorak od oko 1 g izvagan je u duplikatu u FiberCap kapsule koje su iskuhavane oko 30 min u 1,25 %-tnoj otopini H_2SO_4 , zatim 30 min u 1,25 % NaOH. Nakon čega su kapsule isprane vrućom destiliranom vodom i uronjene u aceton te stavljene na sušenje u sušionik preko noći na 103 °C. Sutradan, kapsule su ohlađene u eksikatoru i izvagane te spaljene na 600 °C kroz četiri sata u mikrovalnoj peći Pyro (Milestone, Italija). Nakon spaljivanja, ostatak je izvagan te je izračunat sadržaj NDV.

3.7. Mikrobiološke analize silaža

Mikrobiološke analize provedene su na Hrvatskom Veterinarskom Institutu u Zagrebu, u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane za životinje.

Pripreme uzoraka provedene su prema standardnim metodama, ISO 21527-1:2012 (DZNM, 2012) za kvasce i plijesni, dok je za određivanje broja LAB korištena HRN ISO 15214:1999 (DZNM, 1999) metoda. Za svaku silažu (kontrolnu i s inokulantom) te za suhi kukuruz uzeto je pet reprezentativnih uzoraka. Od svakog uzorka izvagano je 20 g koji su pomiješani sa 180 mL peptonske vode i homogenizirani s pomoću homogenizatora za mikrobiološke uzorke (Stomacher, Interscience, Francuska) tijekom jedne minute (slika 9). Dobivena suspenzija služila je kao matična otopina iz koje su pripremljena serijska razrjeđenja do 10^{-6} .

Za određivanje LAB korištena je MRS (*eng. De Man–Rogosa–Sharpe*) agar podloga, a za određivanje kvasaca i plijesni korištene su DG18 (*eng. Dichloran Glycerol*) i DRBC (*eng. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*) podloge. Količine od 0,1 mL odgovarajućih razrjeđenja nanieseni su na svaku podlogu i ravnomjerno razmazani sterilnim štapićem. Inokulirane podloge s DG 18 i DRBC medijem inkubirane su na 25 °C / 5 dana u aerobnim uvjetima, dok su MRS podloge inkubirane na 37 °C / 72 sata u mikroaerofilnim uvjetima. Nakon inkubacije, kolonije su prebrojane, a rezultati su izraženi kao logaritam broja kolonija koji formiraju jedinu jedinku po g uzorka (log CFU/g).

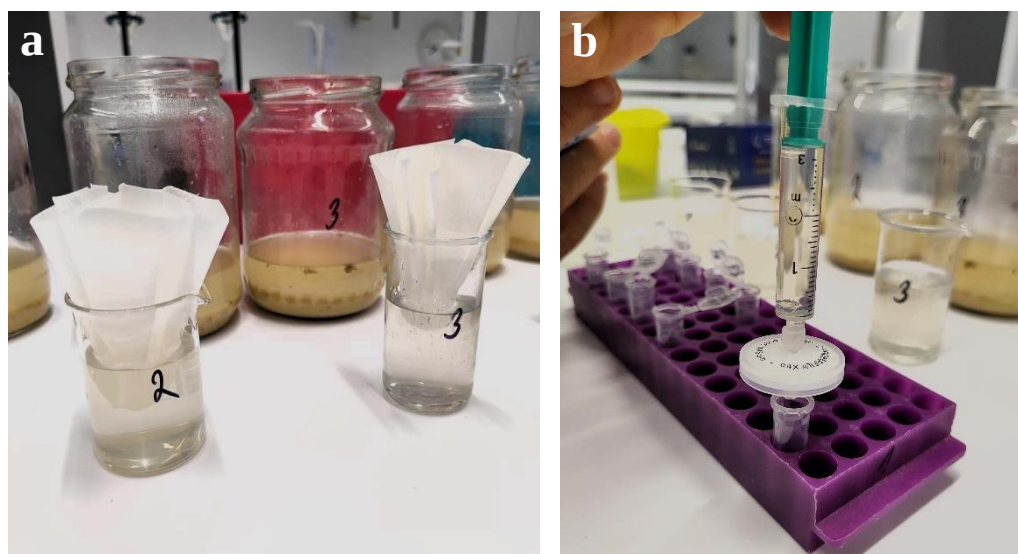


Slika 9. Vaganje uzoraka silaže (a), homogenizirani uzorci (b), brojanje kolonija (c)
(vlastiti izvor)

3.8. Fermentacijski parametri

Za određivanje kemijskih analiza, uzorci kontrolne silaže, silaže s inokulantom i suhog kukuruza uzeti su s pet različitih mjesta unutar bačve i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a prije analiza temperirani su na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dio uzorka korišten je za određivanje suhe tvari prema postupku opisanom ranije, dok je drugi dio služio za pripremu vodenog ekstrakta.

Ekstrakcija je provedena prema modificiranoj metodi za pripremu vodenog ekstrakta u voluminoznim uzorcima (Nishino i Uchida, 1999): 20 g uzorka silaže homogenizirano je u 200 mL destilirane vode i pohranjeno na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 h. Nakon 24 sata, uzorci su filtrirani kroz naborani filter papir te dodatno profiltrirani preko injekcijskog filtera (Chromafil Xtra RC-45/25; Macherey-Nagel, Švicarska) radi uklanjanja proteina i drugih tvari koji bi smetali pri detekciji (slika 10). Dobiveni filtrat spremljen je u Eppendorf epruvete (2 mL) na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize šećera, kiselina i alkohola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).



Slika 10. Filtracija uzoraka silaže kroz naborani (a) i injekcijski filter (b)
(vlastiti izvor)

Za određivanje fermentacijskih produkata u silažama analizirani su jednostavni šećeri (glukoza, fruktoza), kiseline (mliječna, octena, propionska i maslačna kiselina) te alkoholi (metanol, etanol, 1,2-propandiol) za što je korištena modifikacija metode za određivanje fermentacijskih produkata u silažama na HPLC-u (Canale i sur. 1984.). Separacija fermentacijskih produkata provedena je pomoću Aminex HPX-87H kolone pri čemu su kiseline (mliječna, octena, propionska i maslačna) kvantificirane na UV-VIS (210 nm) i RI detektoru, dok su šećeri (glukoza, fruktoza) i alkoholi (metanol, etanol, 1,2-propandiol) kvantificirani samo na RI detektoru. Separacija analiziranih analita provedena je izokratnim eluiranjem na 41 °C uz mobilnu fazu 0,0025 M H₂SO₄, volumenu injektiranja uzoraka bio je 10 µL. Svaki uzorak analiziran je u duplikatu, a kao rezultat koncentracije detektiranih analita, uzeta je srednja vrijednost za svaku vrstu fermentacijskog produkta. Propionska i maslačna kiselina nisu detektirane u uzorcima.

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje svih analita (mliječne, octene, propionske i maslačne kiseline; šećera glukoze i fruktoze; alkohola metanola, etanola i 1,2-propandiola) korištene su standardne otopine poznatih koncentracija (Merck, Njemačka), razrijeđene u definiranim omjerima. Na temelju vrijednosti očitavanja standarda za svaki analit kreiran je baždarni pravac u 7 točaka.

HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD) sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) i RI detektora (RI-150). Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je statističkim paketom SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015). Razlika silaže s inokulantom, kontrolne silaže i suhog kukuruza u sadržajima kiselina (mliječna i octena), šećera (glukoza, fruktoza) i alkohola (metanol, etanol i 1,2-propandiol) ispitana je metodom PROC ANOVA. Za statističku obradu *in vivo* probavljivosti ST i bjelančevina te mase ovaca i konzumacije obroka korištena je PROC MIX metoda pri čemu su fiksni utjecaji bili tretman i period te njihove interakcije. Srednje vrijednosti bile su uspoređene i grupirane pomoću PROC PLM. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Parametri probavljivosti testiranih tretmana u ovaca

U tablici 3 prikazane su vrijednosti probavljivosti suhe tvari (PST), probavljivosti sirovih bjelančevina (PSB), mase i konzumacije ovaca hranjenih različitim tretmanima (silaža rehidriranog zrna kukuruza silirana s dodatkom inokulantom, kontrolna silaža rehidriranog zrna kukuruza silirana bez dodatka inokulanta i suhi kukuruz).

Tablica 3. Parametri probavljivosti testiranih tretmana u ovaca

Tretman	PST (%)	PSB (%)	Masa ovce (kg)	Konzumacija (g/dan)
Silaža s inokulantom	70,83 ^a	44,58 ^a	43,50	821,72 ^a
Kontrolna silaža	67,10 ^b	36,73 ^b	43,89	731,21 ^b
Suhi kukuruz	71,61 ^a	46,52 ^a	43,88	743,30 ^b
P (tretman)	0,034	0,014	0,906	0,001
P (period)	0,144	0,532	0,381	0,708
P (tretman x period)	0,920	0,654	0,986	0,685

*Različita slova (a, b) uz prosjeke označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$).

Prema tablici 3 vidljivo je da je PST značajno bila niža u kontrolnoj silaži (67,10 %) u odnosu na silažu siliranu s inokulantom (70,83 %) i suhi kukuruz (71,61 %) na što ukazuje i statistički značajan utjecaj tretmana na PST ($P = 0,034$). Istovremeno, period u kojem je mjerena probavljivost nije imao značajan utjecaj na PST kao niti interakcija tretmana i perioda (tablica 3).

Usporedivo s PST, i kod PSB kontrolna silaža pokazala je značajno nižu vrijednost (36,73 %) u odnosu na silažu s inokulantom (44,58 %) i suhi kukuruz (46,52 %). Razlika između inokulirane silaže i suhog kukuruza nije bila statistički značajna ($P > 0,05$). Utjecaj perioda te interakcije perioda i tretmana nisu imali statistički značajan utjecaj na PSB (tablica 3).

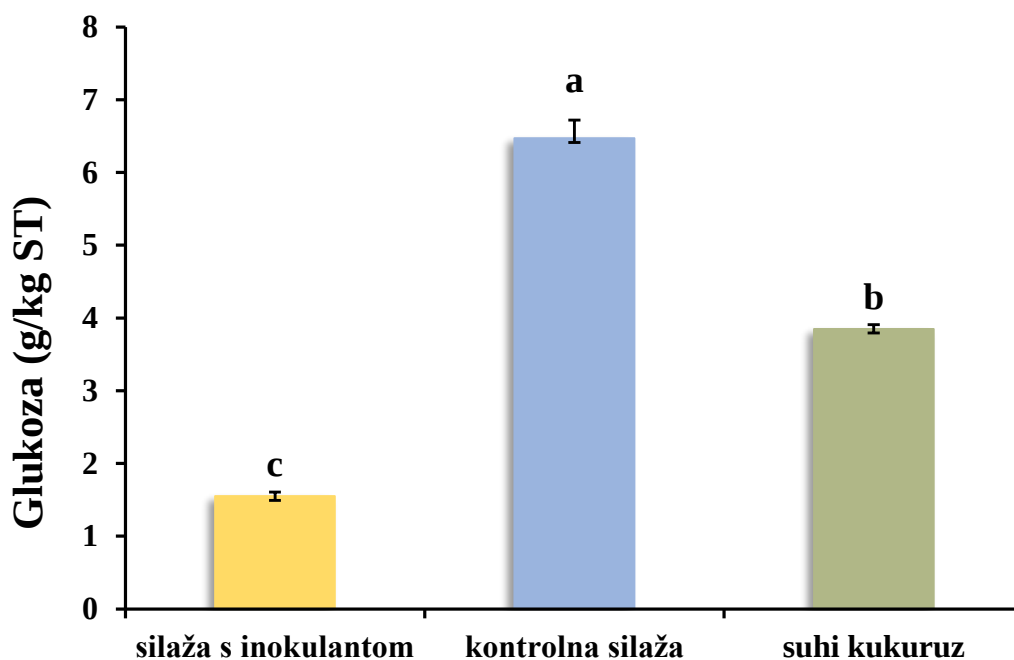
Masa ovaca nije se značajno razlikovala kod ovaca hranjenih silažom s inokulantom (43,59 kg), kontrolnom silažom (43,89 kg) i suhim kukuruzom (43,88 kg), što potvrđuje i statistička analiza ($P = 0,906$). Također, ni period provođenja analize ($P = 0,381$), kao ni interakcija perioda i tretmana ($P = 0,986$), nisu imali statistički značajan utjecaj na masu ovaca tijekom pokusa (tablica 3).

Konzumacija je bila viša kod ovaca hranjenih silažom s inokulantom (821,72 g/dan), u odnosu na kontrolnu silažu (731,21 g/dan) i suhi kukuruz (743,30 g/dan), pri čemu je utvrđen značajan utjecaj tretmana na konzumaciju ($P < 0,001$). Period provođenja pokusa ($P = 0,708$) te interakcija tretmana i perioda ($P = 0,685$) nisu imali značajan utjecaj na konzumaciju (tablica 3).

4.2. Fermentacijski parametri u testiranim tretmanima za probavljivost

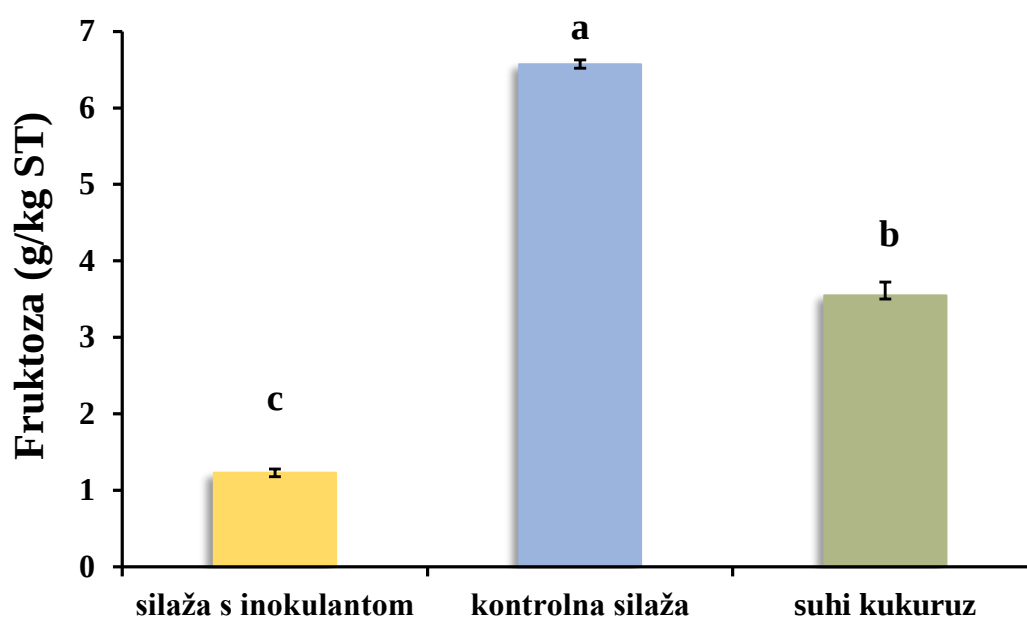
4.2.1. Šećeri

Grafikon 1 prikazuje prosječni sadržaj glukoze (g/kg ST) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Koncentracija glukoze bila je najviša u kontrolnoj silaži (6,47 g/kg ST), zatim u suhom kukuruzu (3,85 g/kg ST) dok je najniža vrijednost zabilježena u silaži s inokulantom (1,55 g/kg ST). Također, statistička analiza je pokazala da se sve tri srednje vrijednosti tretmana međusobno značajno razlikuju ($P < 0,05$).



Grafikon 1. Sadržaj glukoze u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

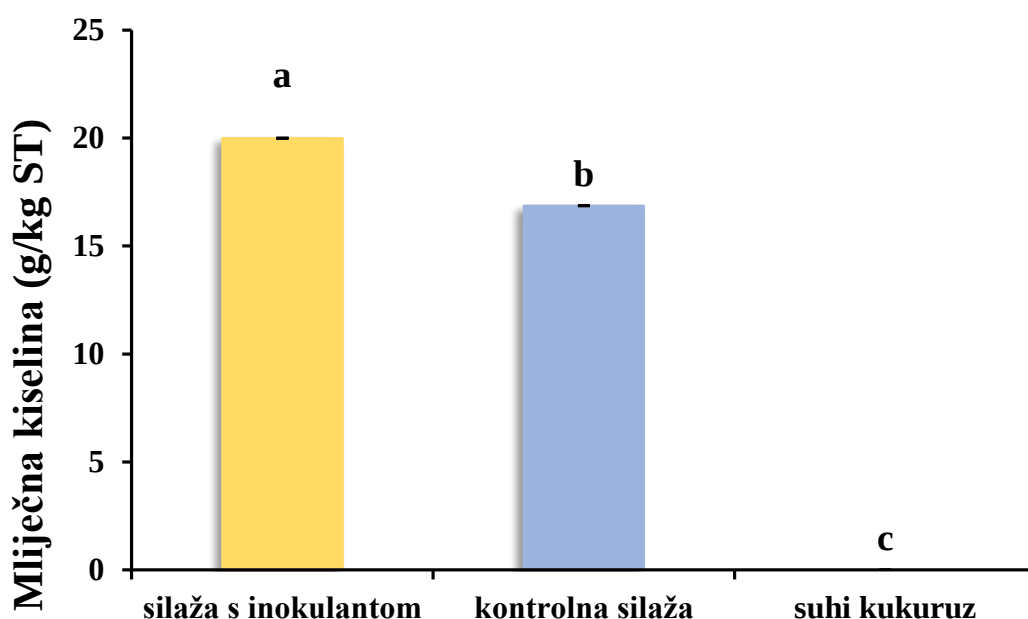
Grafikon 2 prikazuje prosječni sadržaj fruktoze (g/kg ST) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Isto kao i kod glukoze, najviša koncentracija fruktoze je zabilježena u kontrolnoj silaži s koncentracijom od 6,57 g/kg ST dok je taj sadržaj signifikantno niži u suhom kukuruzu (3,55 g/kg ST). Koncentracija fruktoze u silaži s inokulantom bila je značajno niža u odnosu na ostala dva tretmana ($P < 0,05$) i to za 5,34 g/kg ST u odnosu na koncentraciju fruktoze u kontrolnoj silaži, odnosno za 2,33 g/kg ST u odnosu na koncentraciju fruktoze u suhom kukuruzu.



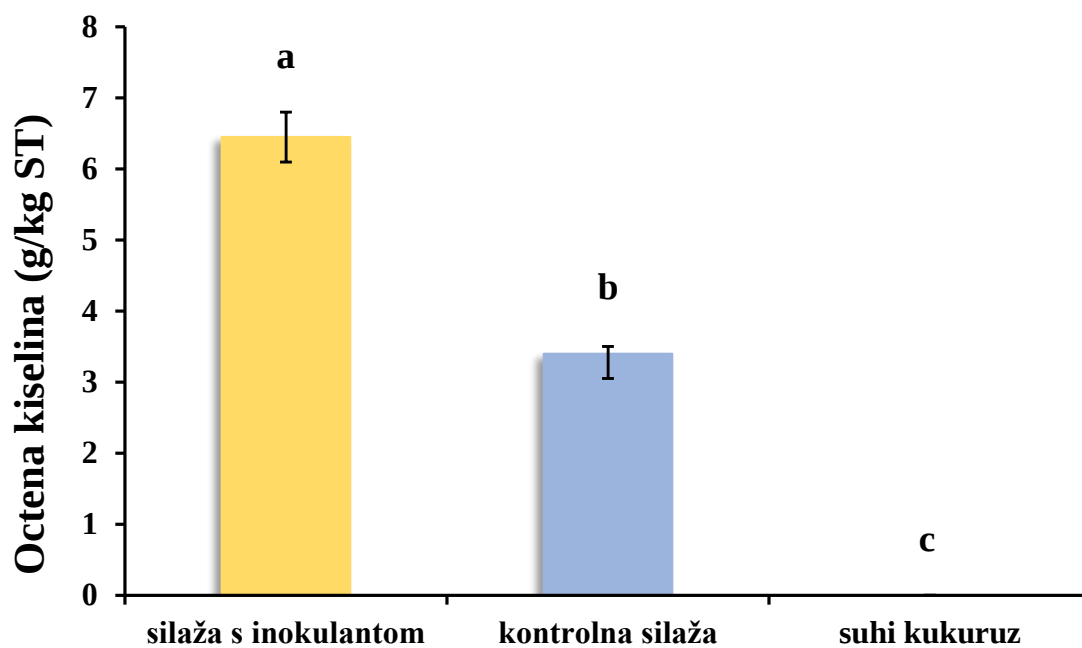
Grafikon 2. Sadržaj fruktoze u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

4.2.2. Kiseline

Grafikon 3 prikazuje prosječni sadržaj mliječne kiseline u testiranim tretmanima, dok grafikon 4 prikazuje sadržaj octene kiseline u testiranim tretmanima. Najviši sadržaj mliječne (20,00 g/kg ST) kao i octene kiseline (6,45 g/kg ST) zabilježen je u silaži s inokulantom ($P < 0,05$), dok sadržaj obiju kiselina proporcionalno pada u kontrolnoj silaži gdje vrijednost mliječne kiseline iznosi 16,87 g/kg ST, a octene kiseline bilježi 3,40 g/kg ST. Sadržaj mliječne i octene kiseline u suhom kukuruzu nisu zabilježeni. Statistička analiza potvrdila je značajan utjecaj tretmana na koncentracije obje kiseline ($P < 0,001$ za mliječnu i $P < 0,001$ za octenu kiselinu).



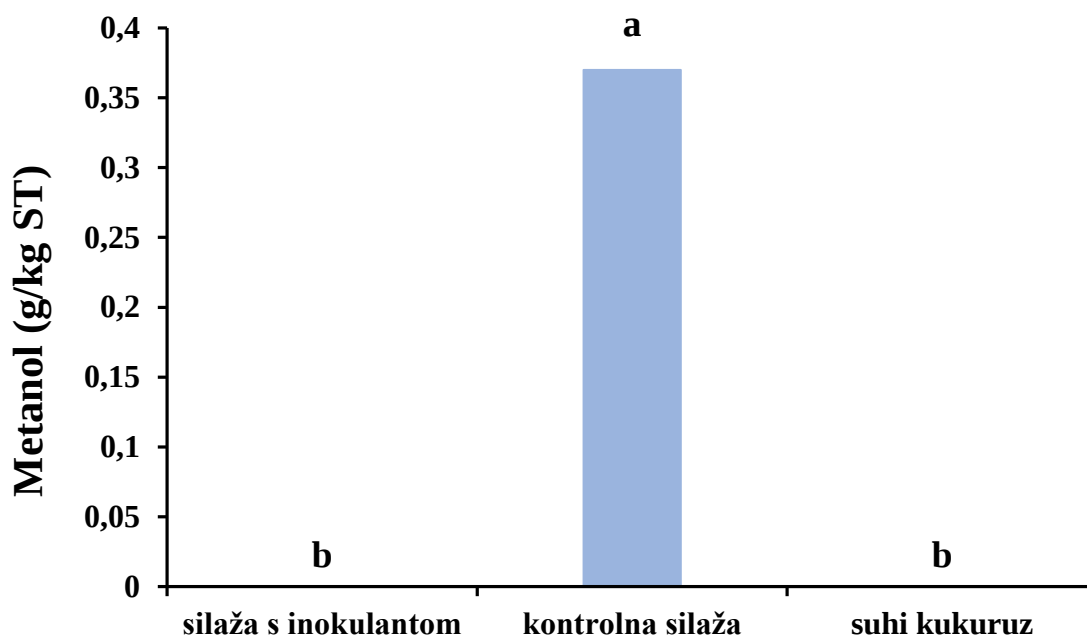
Grafikon 3. Sadržaj mliječne kiseline u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.



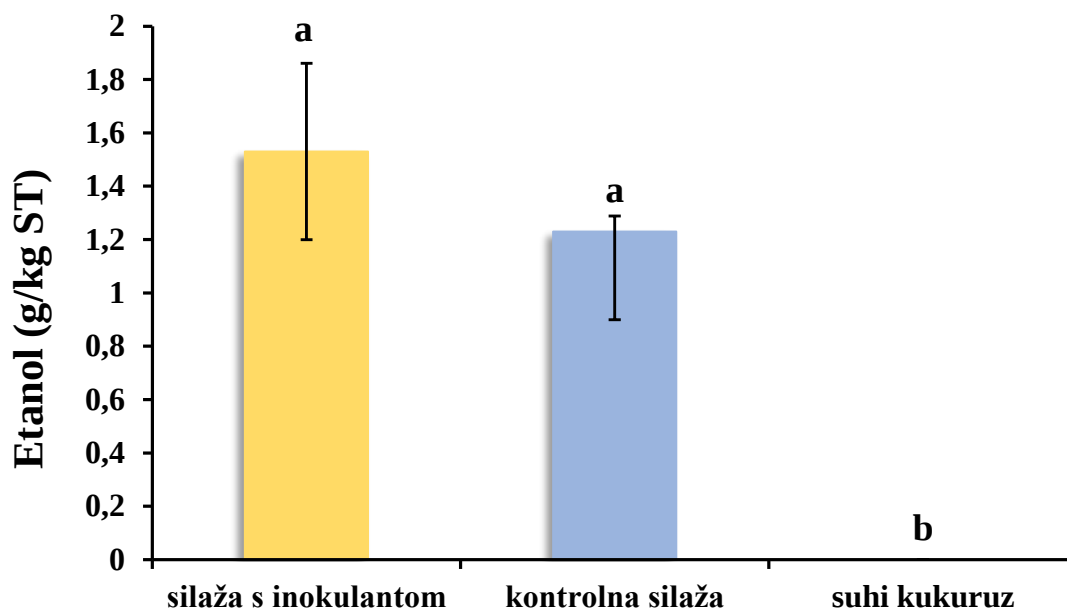
Grafikon 4. Sadržaj octene kiseline u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

4.2.3. Alkoholi

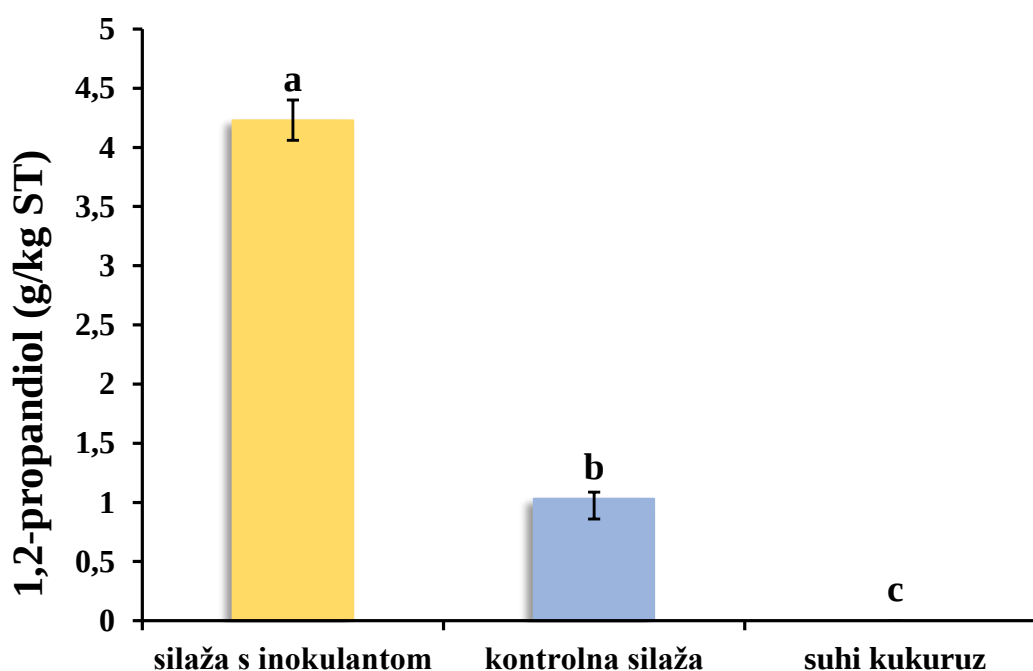
U grafikonu 5 prikazan je prosječni sadržaj metanola (g/kg ST) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu dok je prosječni sadržaj etanola (g/kg ST) tretmana prikazan na grafikonu 6. Metanol u silaži s inokulantom nije detektiran. Sadržaj etanola u silaži s inokulantom iznosio je 1,53 g/kg ST. Za razliku od silaže s inokulantom, u kontrolnoj silaži zabilježen je sadržaj metanola u vrijednosti od 0,37 g/kg ST (grafikon 5) dok je sadržaja etanola u istom tretmanu iznosio 1,23 g/kg ST (grafikon 6). Metanol, kao niti etanol u suhom kukuruzu nisu zabilježeni. Statistička vrijednost ($P = 0,027$) potvrđuje značajni utjecaj tretmana na sadržaj metanola, ali i etanola ($P < 0,001$).



Grafikon 5. Sadržaj metanola u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.



Grafikon 6. Sadržaj etanola u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

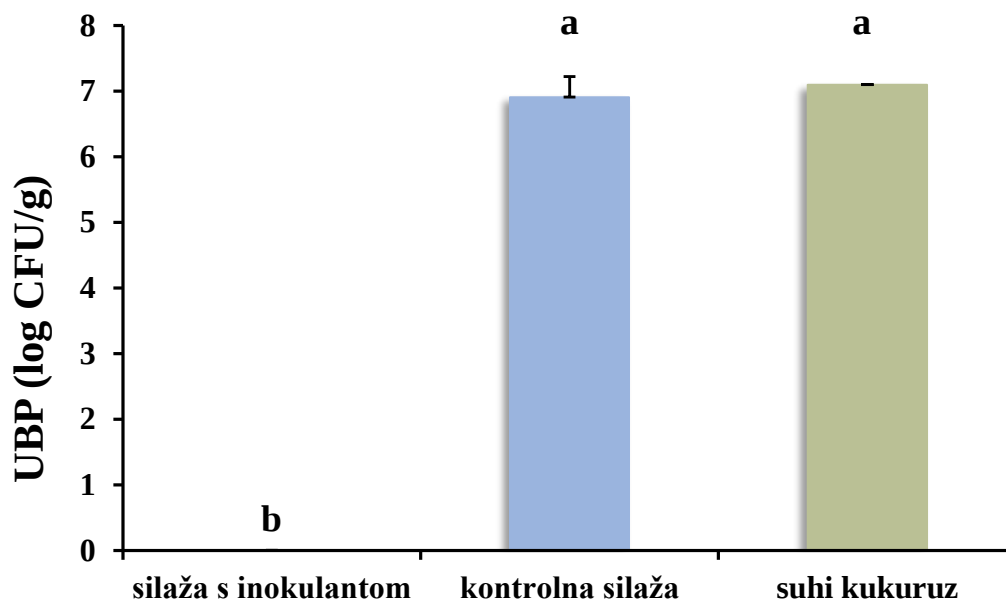


Grafikon 7. Sadržaj 1,2-propandiol-a u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

Grafikon 7 prikazuje sadržaj 1,2-propandiola u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Uspoređujući s prethodna dva grafikona (grafikon 5 i grafikon 6) primjetan je značajno veći sadržaj 1,2-propandiola u silaži s inokulantom za razliku od sadržaja etanola i metanola u istom tretmanu, točnije sadržaj 1,2-propandiola od 4,23 g/kg ST ga čini najzastupljenijim alkoholom u silaži s inokulantom (grafikon 7). Suprotno tome, sadržaj 1,2-propandiola u kontrolnoj silaži iznosi 1,03 g/kg ST pri čemu je za 0,20 g/kg ST niži nego kod etanola, ali i dalje viši nego kod metanola (0,37 g/kg ST). U suhom kukuruzu, baš kao i prethodna dva alkohola, 1,2-propandiol nije zabilježen (grafikon 7). Kao i kod prethodna dva alkohola, statistička analiza je pokazala značajan utjecaj tretmana na sadržaj 1,2-propandiola ($P < 0,001$).

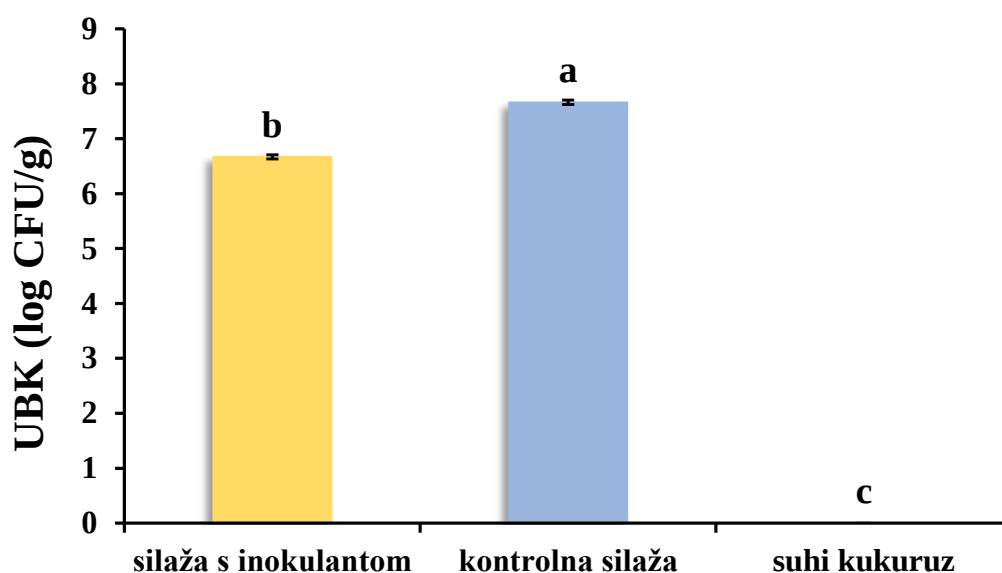
4.3. Mikroorganizmi

Grafikon 8 prikazuje prosječan broj plijesni (log CFU/g) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Upotrijebljeni tretman imao je značajan utjecaj na broj plijesni ($P < 0,001$). Najviši broj plijesni zabilježen je u suhom kukuruzu (7,05 log CFU/g), dok je u kontrolnoj silaži utvrđena nešto niža, ali i dalje visoka vrijednost (6,91 log CFU/g). U silaži s dodatkom inokulanta plijesni nisu detektirane ($P < 0,05$).

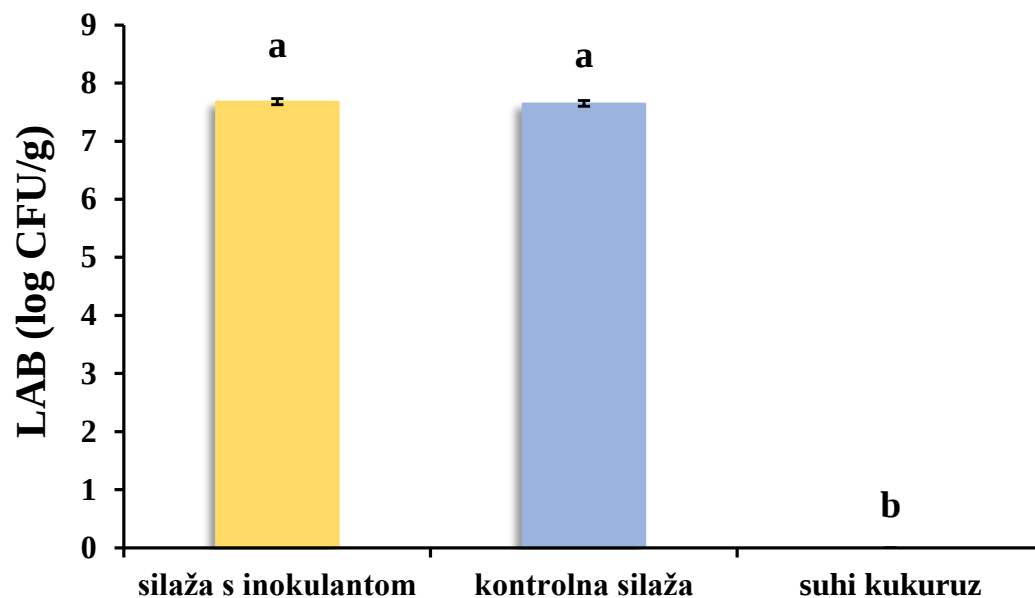


Grafikon 8. Prikaz ukupnog broja plijesni (UBP) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

Grafikon 9 prikazuje prosječan broj kvasaca (log CFU/g), a grafikon 10 prosječan broj LAB (log CFU/g) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Upotrijebljeni tretman imao je signifikantan utjecaj i na broj kvasaca i broj LAB (oba $P < 0,001$). Najveći broj kvasaca utvrđen je u kontrolnoj silaži (7,66 log CFU/g), što je jednako broju LAB u istom tretmanu (7,66 log CFU/g). U silaži s dodatkom inokulanta broj kvasaca bio je niži u odnosu na kontrolu (6,67 log CFU/g), dok je broj LAB u istom tretmanu bio najviši od svih zabilježenih vrijednosti (7,68 log CFU/g) bez signifikantne razlike u odnosu na kontrolnu silažu ($P > 0,05$). U suhom kukuruzu kvasci, kao i LAB, nisu detektirani.



Grafikon 9. Prikaz ukupnog broja kvasaca (UBK) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b, c) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.



Grafikon 10. Prikaz ukupnog broja laktobacila (LAB) u silaži s inokulantom, kontrolnoj silaži i suhom kukuruzu. Različita slova (a, b) označavaju statistički značajne razlike među tretmanima ($P < 0,05$) uz naznačene srednje vrijednosti greške za svaki tretman.

5. Rasprava

Sadržaji fermentacijskih parametara silaža u ovom istraživanju potvrdili su da je fermentacija u silaži s dodanim inokulantom koji je kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih LAB intenzivnija te usmjerena prema sintezi mliječne i octene kiseline. Glavni supstrat LAB za proizvodnju kiselina su vodotopljivi šećeri; primarno heksoza glukoza te drugi jednostavni šećeri, primjerice heksoza fruktoza (McDonald i sur., 1991). Sadržaji glukoze i fruktoze bili su najviši u kontrolnoj silaži, dok su najniži sadržaji zabilježeni u silaži s dodatkom inokulanta (grafikon 1 za glukozu i grafikon 2 za fruktozu). Rezultati su u skladu s očekivanim te pokazuju da je u kontrolnoj silaži fermentacija bila manje intenzivna, što je rezultiralo s višim sadržajima rezidualnih šećera i nižim sadržajima kiselina, dok je u inokuliranoj silaži došlo do učinkovitije razgradnje ugljikohidrata i veće sinteze kiselina. Oprečan rezultat ovome utvrdili su Filya i sur. (2003) gdje su u silaži inokuliranoj s *L. plantarum* zabilježili viši sadržaj rezidualnih šećera (glukoze, fruktoze), pri čemu visoki sadržaji rezidualnih šećera osiguravaju veću dostupnost energije za mikrobe buraga, ali isto tako služe kao supstrat za rast kvasaca koji uzrokuju kvarenje prilikom otvaranja silaža tijekom izuzimanja za hranidbu (Arriola i sur., 2011). Homofermentativna *L. plantarum* brzo proizvodi mliječnu kiselinu te silaže inokulirane s ovom bakterijom rezultiraju s brzim padom pH što dovodi do većeg sadržaja rezidualnih šećera ali su takve silaže istovremeno sklone aerobnom kvarenju kod izuzimanja (Wilkinson i Davies, 2013). Zato se danas češće koriste kombinacije homofermentativnih i heterofermentativnih LAB koji osiguravaju intenzivnu proizvodnju, ne samo mliječne već i octene kiseline (Muck i sur., 2018). Navedeni tip inokulanta upotrijebljen je i u ovom istraživanju.

Srednje vrijednost sadržaja mliječne i octene kiseline u silažama rehidriranog zrna kukuruza su oko 15,54 g/kg ST i 4,47 g/kg ST za silaže s dodatkom inokulanta, odnosno 15,5 g/kg ST i 2,27 g/kg ST za kontrolne silaže (Diogénes i sur., 2023). U ovom istraživanju sadržaji mliječne i octene kiseline u kontrolnoj silaži bili su značajno niži u odnosu na sadržaje mliječne i octene kiseline u silaži s inokulantom dok, očekivano, kiseline nisu detektirane u suhom kukuruzu (grafikon 3 za mliječnu kiselinu te grafikon 4 za octenu kiselinu). S obzirom na to da je suhi kukuruz konzerviran sušenjem, a ne fermentacijom, u takvom tipu konzerviranja se ne očekuju kiseline i alkoholi (McDonald i sur., 1991). Kung i sur. (2018) navode 2,5 – 3,0 kao optimalan omjer mliječne i octene kiseline, te je taj omjer u ovom istraživanju u silaži s dodanim inokulantom iznosio 3,1 što upućuje na optimalnu aktivnost LAB. Istraživanje Wu i sur. (2022)

dalo je slične rezultate pri čemu je nakon 56 dana siliranja izmjereni sadržaj mliječne kiseline iznosio 11,5 g/kg ST dok je sadržaj octene kiseline iznosio 4,25 g/kg ST u silaži inokuliranoj s *L. buchneri* i *L. plantarum*. Istovremeno je taj omjer u kontrolnoj silaži u ovom istraživanju bio 4,96 što upućuje na veću sintezu mliječne kiseline odnosno izrazitu homofermentativnu aktivnost što može potencirati aerobnu nestabilnost (Wilkinson i Davies, 2013).

Osim razine šećera i organskih kiselina, važan pokazatelj fermentacijske kvalitete su i alkoholi (McDonald i sur. 1991). Metanol je detektiran samo u kontrolnoj silaži, dok u silaži s inokulantom i suhom kukuruzu nije utvrđena njegova prisutnost (grafikon 5). Takvi rezultati su u skladu s literaturom, gdje se metanol u silažama rijetko navodi ili se bilježi tek u tragovima (Nielsen i sur., 2014). Međutim, iako je metanol toksičan za sisavce, njegova prisutnost u hranidbi preživača nema negativan učinak jer se u buragu brzo pretvara u metan (Kung i sur., 2018). Za razliku od metanola, etanol je učestali alkohol u silažama. Visoke koncentracije etanola (> 30 – 40 g/kg ST) često su povezane s razvojem kvasaca u silažama i gubicima suhe tvari (Wilkinson i Davies, 2013). U ovom istraživanju utvrđene su niske koncentracije etanola u kontrolnoj silaži i silaži s inokulantom (grafikon 6), te se nalaze unutar raspona utvrđenog za etanol u silažama rehidriranog zrna kukuruza koji je od 0,3 do 12,5 g/kg ST (Diogénes i sur., 2023). Niže koncentracije proizvedenog etanola najčešće ukazuju na to da je proizveden djelovanjem raznih mikroorganizama, kao što su enterobakterije, LAB, klostridije i kvasci a ne samo negativnom aktivnošću kvasaca (Bueno i sur., 2020). Visoke koncentracije etanola u silažama ukazuju na nekontroliranu aktivnost kvasaca i potencijalno aerobno kvarenje silaža (Kung i sur., 2018). U radu je detektiran i 1,2- propandiol koji nastaje kao produkt aktivnosti *L.buchneri* tijekom razgradnje mliječne kiseline u octenu (Selwet, 2020). U ovom istraživanju silaža s inokulantom imala je 400 % viši sadržaj 1,2-propandiola u odnosu na kontrolnu silažu (grafikon 7). Veći sadržaj 1,2-propandiola ukazuje na veću aktivnost heterofermentativnih LAB i veću proizvodnju octene kiseline čime je takva silaža stabilnija kod otvaranja (Wilkinson i Davies, 2013; Kung i sur. 2018).

Dobiveni mikrobiološki rezultati u skladu su s utvrđenim fermentacijskim parametrima. Broj plijesni bio je najviši u suhom kukuruzu, dok u inokuliranoj silaži plijesni nisu detektirane (grafikon 8). Kontrolna silaža imala je sličan broj plijesni kao i suhi kukuruz ($P > 0,05$). U suhom kukuruzu, gdje fermentacija nije bila prisutna, takav rezultat je i očekivan. Te također u kontrolnoj silaži gdje uvjeti u siliranoj masi često ne dovode do inhibicije aktivnosti plijesni, tako Diogénes i sur. (2023) u preglednom radu u kojem su koristili podatke iz 15 različitih

publikacija daju podatak da je prosječan broj plijesni u kontrolnim silažama rehidriranog zrna kukuruza oko 3,49 log CFU/g. Visoke razine plijesni povezane su s povećanim gubicima suhe tvari i smanjenom hranidbenom vrijednošću, što dokazuju i Tapia i sur. (2004), koji su pokazali da *Penicilium viridicatum* proizvodi mikotoksin patulin u kukuruznoj silaži čije je prisustvo značajno smanjilo probavljivost vlakana u buragu. Nadalje, najveći broj kvasaca utvrđen je u kontrolnoj silaži (grafikon 9) u kojoj je zabilježen i najviši udio rezidualnih šećera (grafikon 1 i grafikon 2) te najniži sadržaji mliječne i octene kiseline (grafikon 3 i grafikon 4) što potvrđuje da je u tom tipu silaža fermentacija bila nedostatna za inhibiciju nepoželjnih kvasaca. Kvasci su prvi mikroorganizmi aerobnog kvarenja silaža i cilj je svesti njihov broj na minimum (Wilkinson i Davies, 2013). Nasuprot tome, silaža s dodatkom inokulanta imala je signifikantno niži broj kvasaca u usporedbi s kontrolnom silažom ($P < 0,05$) i viši broj LAB, čija je aktivnost rezultirala višom razinom mliječne kiseline te proizvodnjom 1,2-propandiola i octene kiseline, tipičnih metabolita aktivnosti *L.buchneri*. Octena kiselina predstavlja najvažniji faktor za inhibiciju aktivnosti kvasaca u silažama (Wilkinson i Davies, 2013; Kung i sur., 2018).

Probavljivost suhe tvari (PST) testiranih tretmana kod ovaca pokazala je kako nije bilo razlike u probavljivosti između suhog zrna kukuruza i silaže silirane s dodatkom inokulanta. Istovremeno je PST u kontrolnoj silaži bila 6 % niža u odnosu na ostala dva tretmana (tablica 3). Sličan trend zabilježen je i za probavljivost sirovih bjelančevina (PSB) gdje je PSB bila slična u suhom kukuruzu i silaži siliranoj s inokulantom dok je najniža PSB bila u kontrolnoj silaži (tablica 3). Utvrđene razlike među tretmanima bile su statistički značajne ($P = 0,034$ za PST, $P = 0,014$ za PSB), što je potvrdilo pretpostavku da tretman ima utjecaj na iskoristivost hranjivih tvari. Suprotno tome, period hranidbe kao niti interakcije perioda i tretmana nisu imali učinak na PST i PSB ($P > 0,05$) što upućuje na konstantnu kvalitetu tretmana tijekom istraživanja. Međutim, neočekivani rezultat se očitovao u tretmanu sa suhim kukuruzom koji je imao imao višu PST i PSB od kontrolne silaže ($P < 0,05$), iako se u literaturi najčešće navodi suprotan trend. Arcari i sur. (2016) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj zamjene suhog kukuruza rehidriranim kukuruzom u kasnoj laktaciji Holstein krava. Rezultati su pokazali da potpuna zamjena suhog kukuruza rehidriranim rezultira povećanjem probavljivosti suhe tvari, organske tvari, sirovih bjelančevina i škroba za 5,4 – 8 % što potvrđuje pozitivan učinak siliranja na iskoristivost hranjivih tvari i povećanje probavljivosti. Prema tome, za razliku od njihovih rezultata, u ovom istraživanju siliranje nije dovelo do povećanja PST i PSB te zapravo suprotno, kontrolna silaža imala je nižu PST za 4,51 % i nižu PSB za 9,79 % u odnosu na suhi kukuruz. Mogući razlog za ovakav rezultat može biti povezan s kratkim

periodom siliranja (106 dana). Prema Ferrarretto i sur. (2014) te Duvnjak i sur. (2022) dulji period siliranja ima veći učinak na PST jer tijekom skladištenja organske kiseline i proteolitički enzimi djeluju na zeine, proteine koji obavijaju škrobna zrnca u endospermu kukuruza. Njihovom razgradnjom oslobađa se škrob koji postaje dostupniji mikroorganizmima buraga, čime raste i PST. Osim PST, duljim siliranjem raste i PSB. Aloba i sur. (2022) potvrdili su da je PSB bila viša nakon 75 dana siliranja (oko 78 %) što potvrđuje pozitivan učinak duljine siliranja na probavljivost hranjivih tvari, no isto tako predugo siliranje ima negativan učinak na PSB gdje su isti autori utvrdili pad PSB na oko 69 % nakon 180 dana siliranja. Guimarães i sur. (2022) pratili su učinke osam tretmana različitog udjela koncentrata i različitog perioda siliranja rehidriranog zrna kukuruza u hranidbi janjadi. Autori su utvrdili da je rehidrirani kukuruz imao višu PST u odnosu na suhi kukuruz, neovisno o tome je li bio siliran 45 ili 90 dana. Rezultati većine istraživanja potvrđuju da produljeni period siliranja dovodi do povećane PST u silaži. Međutim, noviji rezultati istraživanja Martins i sur. (2025) u kojem su uspoređivali učinke zamjene suhog, sitno mljevenog s rehidriranim sitno mljevenim ili visokovlažnim valjanim zrnom kukuruza na unos hranjivih tvari, probavljivost, fermentaciju u buragu, prinos mlijeka i učinkovitost hrane, pokazali su da je PST u suhom kukuruzu iznosila 59,3 %, u rehidriranom 58,3 %, a u visokovlažnom 59,1 % što ukazuje da PST ne raste uvijek sa siliranjem.

Naši rezultati pokazuju kako se ograničenja kraćeg vremena siliranja i potencijalno negativnog utjecaja siliranja na PST i PSB mogu ublažiti ili nadoknaditi dodatkom inokulanta. Za razliku od kontrolne silaže, u ovom je istraživanju silaža s dodatkom inokulanta pokazala veću PST i PSB i zapravo usporedivu s probavljivošću suhog kukuruza. Pozitivne učinke inokulanta na probavljivost hranjivih tvari već su ranije utvrdili brojni autori. Primjerice, Daniel i sur. (2018) u istraživanju na mliječnim kravama s dodatkom homofermentativnih *L.lactis*, *L. plantarum* te *Enterococcus faecium* utvrdili su veću PST u inokuliranoj silaži za razliku od silaže bez dodatka inokulanta (70,8 % u odnosu na 68,8 %). Slično istraživanje proveli su Monteiro i sur. (2021) u kojem je silaža s dodatkom *L.plantarum* imala višu PST za 4,4 % u odnosu na kontrolnu silažu bez dodatka inokulanta (34,4 % u odnosu na 30,2 %). Nadalje, inokulacija silaže LAB u istraživanju Oliveira i sur. (2017) rezultirala je boljim prinosom mlijeka kod krava u usporedbi s kontrolnom silažom (+0,37 kg/dan), no učinak na PST nije uočen. Usporedno s Oliveirom, rezultati Rossi i sur. (2023) u istraživanju provedenom na janjadi, inokulacija s *L.buchneri* nije pokazala značajan učinak na probavljivost te su oni još jednom potvrdili važnost utjecaja duljeg vremena siliranja na probavljivost.

Utjecaji tretmana na masu ovaca u ovom istraživanju pokazali su da između tretmana nije bilo značajnih razlika u tjelesnoj masi što se može objasniti činjenicom da su energetske vrijednosti hrane davane životinjama bile usklađene s njihovim prethodnim obrokom u prirodnom sustavu držanja, čime je spriječena veća varijacija tjelesne mase između skupina, ali i ujednačenim uvjetima držanja tijekom pokusa. Međutim, rezultati su pokazali da je konzumacija bila pod utjecajem tretmana ($P < 0,05$). Najviša konzumacija zabilježena je kod silaže silirane s inokulantom, dok je kod kontrolne silaže i kod suhog kukuruza konzumacija bila slična i niža. Ovi rezultati ukazuju na veću palatabilnost silaže silirane s inokulantom gdje ovce takvu silažu jedu draže.

6. Zaključak

U skladu s postavljenom hipotezom, silaža s dodatkom inokulanta imala je veću PST i PSB u odnosu na kontrolnu silažu. Neočekivano, probavljivost te silaže bila je usporediva s probavljivošću suhog kukuruza. Iako su fermentacijski parametri u silaži s dodatkom inokulanta bili optimalni, to ipak nije rezultiralo povećanjem PST i PSB u odnosu na suhi kukuruz. Moguće je da je razlog tome relativno kratak period siliranja od tri mjeseca, koji možda nije bio dovoljan da dođe do značajnijeg utjecaja organskih kiselina na otapanje proteina, a time i na povećanje probavljivosti. Važno je naglasiti da je probavljivost bila najniža u kontrolnoj silaži.

Ovi rezultati ukazuju na to da je siliranje rehidriranog zrna kukuruza poželjna alternativna metoda konzerviranja u situacijama kada sušenje nije moguće. Također, u slučaju siliranja preporučuje se uporaba inokulanata bakterija mliječne kiseline, jer se njihovom primjenom optimizira fermentacija i postiže viša probavljivost silaža.

7. Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mariji Duvnjak na pruženoj prilici, uputama, strpljenju i pomoći pri izradi ovoga rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivani Vitasović Kosić na pomoći pri prepoznavanju biljnih vrsta sijena te dr. sc. Manueli Zadavec na pomoći u mikrobiološkim analizama.

Zahvaljujem laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja na pomoći pri izvođenju svih kemijskih analiza.

Zahvaljujem obitelji na podršci i pomoći prilikom studiranja i izrade ovog rada.

8. Literatura

1. Allen M., Roth G., Coors J.G. (2003). Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42. *American Society of Agronomy. Crop Science Society of America. Soil Science Society of America.*
2. Aloba T.A., Dickhoefer U., Castro-Montoya J.C. (2022). In Vitro Rumen Fermentation and Post-Ruminal Digestibility of Sorghum–Soybean Forage as Affected by Ensiling Length, Storage Temperature, and Its Interactions with Crude Protein Levels. *Animals.* 12(23).
3. Arcari M.A., Martins C.M.M.R., Tomazi T., Goncalves J.L., Santos M.V. (2016). Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. *Animal Feed Science and Technology.* 221:167-173.
4. Arriola K.G., Adesogan A.T. (2011). Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. *Journal of Dairy Science.* 94(3):1511-1516.
5. Avila C.L.S., Carvalho B.F. (2019). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal for Applied Microbiology.* 128(4):966-984.
6. Blajman J.E., Paez R.B., Vinderola C.G., Lingua M.S., Signorini M.L. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *Journal of Applied Microbiology.* 125(6).
7. Borreani G., Tobacco E., Schmidt R.J., Holmes B.J. Muck R.E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science.* 101(5):3952-3979.
8. Bueno J.L., Bolson D.C., Jacovaci F.A., Gomes A.L.M., Ribeiro M.G., Bueno A.V.I, Jobim C.C, Daniel J.L.P. (2020). Storage length interacts with maturity to affect nutrient availability in unprocessed flint corn silage. *Brazilian Journal of Animal Science.* 49:e20190247.
9. 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 Science Food and Agriculture .* 35(11):1178-1182.
10. Collins M., Owens V.N. (2003). Preservation of Forage as Hay and Silage. In Barnes R.F., Nelson C.J., Collins M., Moore K.J., editors. *Forages: An Introduction to Grassland Agriculture*, 6th Edition. Iowa State University Press, Ames. 443-471.

11. Comino L., Tabacco E., Righi F., Chion A.R., Quarajntelli A., Borreani G. (2014). Effects of an inoculant containing a *Lactobacillus buchneri* that produces ferulate-esterase on fermentation products, aerobic stability, and fibre digestibility of maize silage harvested at different stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*. 198:94-106.
12. Daniel J.L.P., Queiroz O.C.M., Arriola K.G., Daetz R., Basso F., Romero J.J., Adesogan A.T. (2018). Effects of homolactic bacterial inoculant on the performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 101(6):5145-5152.
13. Diogenes L.V., Filho J.M.P., Edvan R.L., Oliveira J.P.F., Nascimeto R.R., Santos E.M., Alencar E.J.S., Mazza P.H.S., Oliveira R.L., Bezzerá L.R. (2023). Effect of Different Additives on the Quality of Rehydrated Corn Grain Silage: A Systematic Review. *Ruminants*. 3(4):425-444.
14. Duvnjak M., Butorac A., Kljak K., Nišavić M., Cindrić M., Grbeša D. (2022). The Evaluation of γ -Zein Reduction Using Mass Spectrometry—The Influence of Proteolysis Type in Relation to Starch Degradability in Silages. *Fermentation*. 8(10):551.
15. DZNM. (1999). HRN ISO 15214:1999- Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja mezofilnih bakterija mliječne kiseline.
16. DZNM. (2001). HRN ISO 6496:2001. Stočna hrana - Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari.
17. DZNM. (2008). HRN EN ISO 16472:2008. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja amilazom obrađenog neutralnog detergenta vlakana.
18. DZNM. (2010). HRN EN ISO 5983-2:2010. Hrana za životinje - Određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina-2 dio: Razaranje u bloku/metoda destilacije parom.
19. DZNM. (2012). HRN ISO 21527-1:2012. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni.
20. Ferraretto L.F., Taysom K., Shaver R.D., Hoffman P.C. (2014). Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. *Journal of Dairy Science*. 97(5):3221-3227.
21. Filya I. (2003). The Effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the Fermentation, Aerobic Stability, and Ruminant Degradability of Low Dry Matter Corn and Sorghum Silages. *Journal of Dairy Science*. 86(11):3575-3581.

22. Filya I., Muck R.E., Contreras-Govea F.E. (2007). Inoculant effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *Journal of Dairy Science*. 90(11):5108-5114.
23. Fluharty F.L., Zerby H.N., Lowe G.D., Clevenger D.D., Relling A.E. (2016). Effects of feeding corn silage, pelleted, ensiled, or pelleted and ensiled alfalfa on growth and carcass characteristics of lamb. *South African Journal of Animal Science*. 47(5).
24. Gandra J.R., Mattos R.M., Soares T.M.D.M., Pedrini C.A., Martinez A.C., Oliveira E.R., Gandra E.R.S., Vasconcelos W.R.F., Andrade A.C. (2024). Rehydrated Corn Grain Silage and Exogenous Protease: Effects on Dairy Cow Performance, Metabolism, and Starch Digestibility. *Dairy*. 6(1).
25. Goulas C., Zervas G., Papadopoulos G. (2001). The effect of animal fat on sheep's diet digestibility, degradability and rumen fermentation process. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 10(3):447-455.
26. Guan H., Ran Q., Li H., Zhang X. (2021). Succession of Microbial Communities of Corn Silage Inoculated with Heterofermentative Lactic Acid Bacteria from Ensiling to Aerobic Exposure. *Fermentation*. 7(4):258.
27. Guimarães G.S., Azevedo J.A.G., Cairo F.C., Silva C.S., Souza L.L., Nunes F.S., Carvalho G.G.P., Araújo G.G.L., Silva R.R. (2022). Proportions of concentrate and rehydrated ground grain corn silage at different storage times for better use of starch by lambs. *Tropical Animal Health and Production*. 54(297).
28. Han H., Wang C., Huang Z., Zhang Y., Sun L., Xue Y., Guo X. (2022). Effects of Lactic Acid Bacteria-Inoculated Corn Silage on Bacterial Communities and Metabolites of Digestive Tract of Sheep. *Fermentation*. 8(7):320.
29. Johnson L.M., Harrison J.H. (2001). Scientific aspects of silage making. *Proceedings, 31st California Alfalfa & Forage Symposium*. University of California, Davis.
30. Kljak K., Duvnjak M. (2023). Fizikalno-kemijske analize hrane za životinje. *Repozitorij Agronomskog fakulteta u Zagrebu*.
31. Kok I., Copani G., Bryan K.A., Witt K.L.M., Straalen W.M., Amaral R.C., Cappellozza B.I. (2024). Effects of feeding an inoculated corn silage with or without a direct-fed microbial on dry matter intake, milk production, and nutrient digestibility of high-producing lactating Holstein cows. *Translational Animal Science*. 8:txae010.
32. Kung Jr L., Shaver R. D., Grant R. J., Schmidt R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*. 101(5):4020-4033.

33. Ma X., Zhao J., Jv X., Dong J., Yang W., Jiang Y., Li Y., Yang L., Jiang S. (2024). Effects of different dietary inclusions of whole-plant corn silage on growth performance, nutrient availability and jejunal development in growing-finishing pigs. *Czech Journal of Animal Science*. 69(2):48-58.
34. Martins B.M., Silva A.L., Bittencourt C.S., Rodrigues J.V.C., Silva L.H.R., Silva T.A.S., Detmann E., Marcondes M.I., Ferraretto L.F., Rotta P.P. (2025). Effects of reconstituted finely ground corn grain or high moisture rolled corn grain as replacers for finely ground dry corn grain when using a flint corn hybrid for lactating cows. *Jorunal of Dairy Science*.
35. McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J. E. (1991). The Biochemistry of Silage. *Chalcombe publications*.
36. Monteiro H.F., Paula E.M., Muck R.E., Broderick G.A., Faciola A.P. (2021). Effects of lactic acid bacteria in a silage inoculant on ruminal nutrient digestibility, nitrogen metabolism, and lactation performance of high-producing dairy cows. 104(8):8826-8834. *Journal of Dairy Science*. 104:8826-8834.
37. Muck R.E., Nadeau E.M.G., McAllister T.A., Contreras-Govea F.E., Santos M.C., Kung Jr L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*. 101(5):3980-4000.
38. National Health and Medical Research Council (NHMRC). (2004). *Guidelines for the housing of sheep in scientific institutions* (Guide 23).
39. Nishino N., Uchida S. (1999). Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. *Journal of Science Food and Agriculture*. 79(10):1285-1288.
40. Niwinska B. (2012). Digestion in Ruminants. *National Research Institute of Animal Production*. 1(11):245-258.
41. Nkosi B.D., Meeske R., Langa T., Thomas R.S. (2011). Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams. *South African Journal of Animal Science*. 41(4):350-359.
42. Oliveira A., Weinberg Z., Ogunade I.M., Cervantes A.A.P., Arriola K.G., Jiang Y., Kim D., Li X., Gonçalves M.C.M., Vyas D. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100(6):4587-4603.

43. Oliveira M.G., Bueno A.V.I., Leão G.F.M., Neumann M., Jobim C.C. (2018). Nutritional composition and aerobic stability of wheat and corn silages stored under different environmental conditions. *ResearchGate*. 39(1):253.
44. Reich L.J., Kung L. (2010). Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*. 159(3):105-109.
45. Rossi L.G., Rabelo C., Andrade, Siqueira G.R., Vicente E.F., Reis R.A. (2023). The Growth Performance of Lambs is Improved by Increasing the Storage Length of Corn Silage. *SSRN*.
46. Rowghani E., Zamiri M.J. (2008). The effects of a microbial inoculant and formic acid as silage additives on chemical composition, ruminal degradability and nutrient digestibility of corn silage in sheep. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 10(27).
47. Selwet M. (2020). Influence of inoculation with *Lactobacillus* on fermentation, production of 1, 2-propanediol and 1-propanol as well as Maize silage aerobic stability. *Open Life Sciences*. 15(1):373-378.
48. Spanghero M., Braidot M., M. Orioles M., Sarnataro C., Pividori I, Romanzin A. (2024). Dietary inclusion of fibrous corn silages reduces gastric mucosa damage in fattening heavy pigs. *Porcine Health Management*. 10:53.
49. Tabacco E., Piano S., Revello-Chion A., Borreani G. (2011). Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *Journal of Dairy Science*. 94(11):5589-5598.
50. Tapia M.F, Stern M.D., Soraci A.L., Meronuck R., Olson W.G., Gold S., Koski-Hubert, R.L., Murphy M.J. (2005). Patulin-producing molds in corn silage and high moisture corn and effects of patulin on fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 119(3):247-258.
51. Wilkinson J.M., Davies D.R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent development. *Grass and Forage Science*. 68(1):1-19.
52. Wilkinson J.M. (2015). Managing silage making to reduce losses. *Livestock*. 20(5):280-286.
53. Wu B., Hu Z., Wei M., Yong M., Niu H. (2022). Effects of inoculation of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lentilactobacillus buchneri* on fermentation quality, aerobic stability, and microbial community dynamics of wilted *Leymus chinensis* silage. *Frontiers in Microbiology*. 13.

54. Wu P., Fu X., Wang H., Hou M., Shang M. (2021). Effect of Silage Diet (Sweet Sorghum vs. Whole-Crop Corn) and Breed on Growth Performance, Carcass Traits, and Meat Quality of Lambs. *Animals*. 11(11).
55. Yang Q., Wang L., Wang P., Yan Z., Chen Q., Zhang P., Li J., Jia R., Li Y., Yin X., Gun S. (2024). Effect of the diet level of whole-plant corn silage on the colonic microflora of Hezuo pigs. *PeerJ*. 12:e18630.

9. Sažetak

Liza Babić

Primjena inokulanta u cilju poboljšanja probavljivosti silaže rehidriranog zrna kukuruza kod ovaca

Siliranje je jedan od najvažnijih načina konzerviranja voluminozne krme za preživače, pri čemu kvaliteta fermentacije značajno utječe na hranidbenu vrijednost silaže. Kako bi se fermentacija usmjerila u poželjnom smjeru, očuvala hranjiva vrijednost i poboljšala probavljivost hranjivih tvari u buragu, u postupak siliranja često se dodaju inokulanti, najčešće bakterije mliječne kiseline (LAB). Cilj ovog istraživanja bio je usporediti probavljivost suhe tvari (PST) i sirovih bjelančevina (PSB) te fermentacijske i mikrobiološke parametre kod ovaca hranjenih obrocima koji su se razlikovali u vrsti kukuruzne komponente: (1) silaža rehidriranog zrna kukuruza s dodatkom komercijalnog inokulanta, (2) kontrolna silaža rehidriranog zrna kukuruza bez dodatka inokulanta i (3) suho kukuruzno zrno. U pokusu je sudjelovalo devet ovaca u crossover dizajnu 3×3 tijekom tri eksperimentalna perioda. Praćeni su PST, PSB, tjelesna masa i konzumacija obroka, a uz to su analizirani i pokazatelji fermentacijske kvalitete: sadržaj šećera (glukoza, fruktoza), organskih kiselina (mliječna, octena, propionska i maslačna), alkohola (metanol, etanol, 1,2-propandiol) te mikrobiološki profil (kvasci, plijesni, LAB). Propionska i maslačna kiselina nisu bile detektirane ni u jednom tretmanu. Rezultati su pokazali da su vrijednosti PST bile slične u suhom kukuruzu i silaži s inokulantom (71,61 % i 70,83 %), dok je značajno najniža vrijednost zabilježena u kontrolnoj silaži (67,10 %; $P < 0,05$). Sličan trend uočen je i kod PSB, gdje je silaža s dodatkom inokulanta pokazala višu probavljivost u odnosu na kontrolnu silažu ($P < 0,05$). U inokuliranoj silaži zabilježen je veći broj LAB te niži broj kvasaca a plijesni nisu detektirane, dok je u suhom kukuruzu utvrđen najveći broj plijesni. Kao što se očekivalo, koncentracije mliječne i octene kiseline bile su značajno više u inokuliranoj silaži u usporedbi s kontrolnom ($P < 0,05$). Dobiveni rezultati potvrđuju pozitivan učinak primjene inokulanta pri siliranju, s obzirom na optimiziranu fermentaciju i poboljšanu probavljivost hranjivih tvari.

Ključne riječi: ovce, inokulanti, kvaliteta silaža, probavljivost silaža

10. Summary

Liza Babić

Application of Inoculant to Improve the Digestibility of Rehydrated Corn Grain Silage in Ewes

Silage is one of the most important methods for preserving forage for ruminants, with the quality of fermentation significantly influencing the nutritional value of the silage. To direct the fermentation process, preserve nutrients, and improve ruminal digestibility, silage inoculants—most commonly lactic acid bacteria (LAB)—are often added during ensiling. The aim of this study was to compare the digestibility of dry matter (DMD) and crude protein (CPD), as well as fermentation and microbiological parameters in ewes fed diets differing in the type of corn component: (1) silage of rehydrated corn grain with a commercial inoculant, (2) control silage of rehydrated grain without inoculant, and (3) dry corn grain. Nine ewes were used in a 3×3 crossover design over three experimental periods. DMD, CPD, body weight, and feed intake were monitored, along with fermentation quality indicators including sugar content (glucose, fructose), organic acids (lactic, acetic, propionic, and butyric), alcohols (methanol, ethanol, 1,2-propanediol), and microbiological profiles (yeasts, molds, LAB). Propionic and butyric acids were not detected in any of the treatments. The results showed that DMD values were similar in dry corn and silage with inoculant (71.61% and 70.83%, respectively), while the lowest value was recorded in the control silage (67.10%; $P < 0.05$). A similar trend was observed for CPD, with the inoculated silage showing higher digestibility compared to the control ($P < 0.05$). The inoculated silage also had a higher LAB count and lower counts of yeasts and no mold detection, while the highest mold count was found in dry corn. As expected, lactic and acetic acid concentrations were significantly higher in the inoculated silage compared to the control ($P < 0.05$). These results confirm the positive effect of inoculant application during ensiling, as it optimizes fermentation and improves nutrient digestibility in silages.

Keywords: sheep, inoculants, silage quality, silage digestibility

11. Životopis

Liza Babić rođena je 20.04.2001. u Slavonskom Brodu. Osnovnu školu „Mijat Stojanović" završava u Babinoj Gredi 2016. godine te upisuje Srednju školu „Matija Antun Reljković" u Slavonskom Brodu, smjer veterinarski tehničar. Nakon četiri godine, srednju školu završava obranom Završnog rada pod nazivom „Indigestije u preživača". U rujnu 2020. godine upisuje preddiplomski studij na Agronomskom fakultetu i na temelju uspješnosti ocjena ostvaruje prava za dobivanje državne STEM stipendije. Godine 2023. obranom završnog rada pod nazivom „Važnost igre u odrastanju konja" pod mentorstvom prof. dr. sc. Jelene Ramljak stječe naziv univ.bacc.ing.agr. animalnih znanosti. Iste godine upisuje diplomski studij na Agronomskom fakultetu, smjer Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Kao članica grupe za inovacije i transfer znanja u održivom gospodarenju vodama i tlom, 12. veljače 2025. sudjeluje u promociji Agronomskog fakulteta, predstavljajući ga učenicima svoje srednje škole u Slavonskom Brodu gdje je podijelila iskustva studiranja iz perspektive studenta. U proljeće 2025. godine obavlja stručnu praksu na Hrvatskom veterinarskom institutu, na Zavodu za mikrobiologiju hrane za životinje pod mentorstvom dr. sc. Manuela Zadravec, dr. med. vet. i stječe nova iskustva u svojem području zanimanja.