

## UTICAJ INOKULACIJE NA KVALITET FERMENTACIJE I HEMIJSKI SASTAV SILAŽE LUCERKE

*Dorđe Lazarević<sup>1</sup>, Vladeta Stevović<sup>2</sup>, Jasmina Radović<sup>1</sup>, Dalibor Tomić<sup>2</sup>,  
Jordan Marković<sup>1</sup>, Mladen Prijović<sup>1</sup>, Vladimir Zornić<sup>1</sup>*

**Izvod:** U cilju procene uticaja inokulanta „BioStabil Plus“ na proces siliranja lucerke, analizirani su parametri kvaliteta fermentacije (pH, sadržaj sirćetne, buterne, mlečne kiseline, amonijačnog i vodorastvorljivog azota u ukupnom azotu) i hemijskog sastava silaže (sirovi proteini, sirova celuloza, sirove masti, bezazotne ekstraktivne materije i pepeo), kao i ocena kvaliteta silaže (DLG i Zelter). Biomasa lucerke u fazi početka cvetanja silirana je bez dodataka i sa dodatkom inokulanta. Dodavanjem inokulanta utvrđeno je sniženje pH vrednosti, povećana proizvodnja mlečne kiseline, smanjena proizvodnja sirćetne kiseline, uz povoljan odnos ovih kiselina (2-3:1). Unošenjem inokulanta ostvaren je poboljšan kvalitet fermentacije, čime je dobijena bolja očuvanost hranljivih materija što se posebno odnosi na sirove proteine, s obzirom da je primenom inokulanta takođe utvrđeno smanjenje sadržaja amonijačnog azota u odnosu na kontrolu (inokulacija - 12,28 %  $\text{NH}_3\text{-N}/\Sigma\text{N}$ , kontrola - 17,42%  $\text{NH}_3\text{-N}/\Sigma\text{N}$ ). Opšti zaključak je da biomasi lucerke treba dodavati inokulante, u svrhu optimalne produkcije mlečne i sirćetne kiseline, kao i dobijanja veće hranljive vrednosti.

**Ključne reči:** fermentacija, inokulant, lucerka, silaža

### Uvod

U Republici Srbiji, najzastupljeniji način konzervisanja lucerke (*Medicago sativa* L.) je sušenjem, tj. proizvodnjom sena. Siliranje se retko primenjuje, odnosno samo pri nepovoljnim vremenskim uslovima koji podrazumevaju nisku temperaturu i visoku vlažnost vazduha u vreme košenja (Đorđević i Dinić, 2003.). Ovo je razumljivo, pošto ova krmna vrsta ima visok sadržaj ukupnih proteina, nizak sadržaj vodorastvorljivih ugljenih hidrata i visok puferni kapacitet, što je čini teškom za siliranje (Dinić i Đorđević, 2005.). Prema Džumanazarovu (1981.) najefikasniji način za očuvanje proteina pri konzervisanju krme je siliranje kroz proizvodnju senaže i silaže. Kao i pri siliranju ostalih leguminoza, pri siliranju lucerke je potrebno uvođenje određenih postupaka ili dodataka koji će stimulisati pravilnu fermentaciju (Đorđević i Dinić, 2003.). Međutim, tokom siliranja, obično se više od pola sirovih proteina u lucerki razgradi do malih peptida i amino-kiselina od strane enzima oslobođenih iz ćelijskih pukotina u lišću (McDonald et al., 1991.). U lucerki se tokom silažne fermentacije 87% proteina razgradi do

<sup>1</sup>Institut za krmno bilje Kruševac, 37251 Globoder, Kruševac, Srbija (djordje.lazarevic@ikbks.com)

<sup>2</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija;

neproteinskog azota (NPN) (Jones et al., 1995.). Visok nivo razgradnje proteina u siliranoj lucerki vodi niskom iskorišćavanju azota iz krme od strane preživara, što za rezultat ima visoke ekonomske gubitke za farmere, kao i štetne uticaje na životnu sredinu (Dong et al., 2019.).

Kako bi se postigao veći uspeh pri siliranju leguminoza, preporučuje se primena inokulacije mase za siliranje tokom samog procesa siliranja, sa ciljem da se dodavanjem odabranih sojeva homofermentativnih mlečno-kiselinskih bakterija intenzivira i usmeri fermentacija (Đorđević i Šestić, 1994.; Koljajić i sar., 1998.). Najveći efekti inokulacije se ispoljavaju kod hraniva koja se sama teško siliraju, pre svega leguminoza, jer se upotrebom homofermentativnih kultura najefikasnije koriste prisutni rastvorljivi ugljeni hidrati, koji su inače na samoj granici šćernog minimuma (Đorđević i Dinić, 2003.). Sa druge strane, heterofermentativne mlečno-kiselinske bakterije mogu imati pozitivan značaj za aerobnu stabilnost silaža, usled proizvodnje odgovarajuće količine organskih kiselina kratkog lanca. Merry et al. (1997.) navode da sirćetna, buterna, a naročito propionska kiselina imaju veće fungicidno dejstvo u odnosu na mlečnu, te su u određenoj količini poželjne u silažama. Visoka proizvodnja mlečne kiseline snižava pH vrednost do blizu 4,0 i ograničava proteolitičku aktivnost (Muck and Pitt, 1993.). Dodatak inokulanata koji sadrži mlečno-kiselinske bakterije može povećati proizvodnju mlečne kiseline i stopu pada pH vrednosti (Bolsen et al., 1992.; Jones et al., 1992.). Bakterijski inokulanti su osnovni aditivi koji se koriste za silaže leguminoza u SAD, jer obično imaju pozitivan efekat na silažu. Oni se primenjuju češće nego enzimski aditivi i mnogo su bezbedniji za upotrebu od kiselinskih i formaldehidnih aditiva (Muck and Bolsen, 1991.).

Cilj rada je bio da se analizira uticaj inokulacije svežeg biljnog materijala lucerke u toku procesa siliranja na osobine kvaliteta fermentacije i hemijskog sastava silaže lucerke.

### Materijal i metode rada

Biomasa lucerke (sorta „K-42”) je pokošena 14.05.2019. g. u stadijumu ranog cvetanja, na visini od 5 cm iznad površine zemljišta i silirana je bez prethodnog provenjavanja. Sadržaj suve materije sveže mase lucerke bio je 246 g kg<sup>-1</sup>. Eksperiment je postavljen u tri ponavljanja.

Tretman je podrazumevao dodavanje inokulanta „BioStabil Plus“ koji sadrži kombinaciju homofermentativnih bakterija *Lactobacillus plantarum* i *Enterococcus faecium* i heterofermentativne bakterije *Lactobacillus brevis* u koncentraciji 5x10<sup>10</sup> cfu po gramu inokulanta. Tretman je upoređen sa kontrolom koja je bila bez inokulacije. Tretmani silaža su ručno sabijeni u laboratorijske PVC silose zapremine 5 dm<sup>3</sup>. Nakon 56 dana silosi su otvoreni, uzeti su uzorci i izvršene su hemijske analize.

U laboratoriji Instituta za krmno bilje u Kruševcu, prema standardnim metodama (AOAC, 1990.) u silaži su određeni: sirovi proteini, sirova celuloza, sirove masti, bezazotne ekstraktivne materije (BEM) i pepeo. U silaži je takođe

određena pH vrednost, sadržaj sirćetne, buterne i mlečne kiseline, kao i sadržaj amonijačnog (NH<sub>3</sub>-N) i vodorastvorljivog (H<sub>2</sub>O-N) azota u ukupnom azotu. Za ocenu kvaliteta silaže, primenjene su dve metode: DLG i Zelter (Đorđević i Dinić, 2003). Obrada rezultata hemijskih analiza je obavljena metodom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), primenom softvera StatSoft STATISTICA 8.0, a statistička značajnost razlika između sredina je testirana na osnovu Fisher-ovog LSD-testa.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Na osnovu rezultata u tabeli 1, može se zaključiti da je proces fermentacije primenom inokulanta usmeren u poželjnom pravcu. Za oba tretmana, pH vrednosti su značajno ispod kritične pH vrednosti od pH=5,0 i nešto iznad granica optimalnih vrednosti. Optimalne vrednosti pH silaže se kreću od 3,5 do 4,5 i ukoliko je pH 5,0 i više, radi se o nedovoljno prevreloj silaži, koja je uglavnom sumnjivog kvaliteta (Dinić i Đorđević, 2005).

Tabela 1. Rezultati biohemijskih analiza silaža  
*Table 1. Biochemical parameters of the silages*

Tretmani <i>Treatments</i>	pH	NH <sub>3</sub> -N/ΣN (%)	H <sub>2</sub> O- N/ΣN (%)	Kiseline u silaži, g kg <sup>-1</sup> SM – Acids in silages, g kg <sup>-1</sup> DM					
				Sirćetna-Acetic		Buterna- Butyric		Mlečna-Lactic	
				g kg <sup>-1</sup> SM	%	g kg <sup>-1</sup> SM	%	g kg <sup>-1</sup> SM	%
Bez inokulanta	4.60 a	17.42 a	28.69	67.7 a	35,93	0,0	0,00	120.7 b	64,07
Sa inokulantom	4.51 b	12.28 b	27.72	59.0 b	28,47	0,0	0,00	148,2 a	71,53

Vrednosti obeležene različitim slovima po kolonama za primenu inokulanta se značajno razlikuju među sobom (P>0.05) u skladu sa LSD testom. *The values denoted with different small letters within columns for application of inoculants are significantly different (P>0.05) in accordance with LSD test;*

Dodavanje inokulanta je u ovom ogledu uticalo na značajno sniženje pH vrednosti u odnosu na kontrolnu varijantu. Iz navedenih podataka može se zaključiti da među organskim kiselinama dominiraju mlečna i sirćetna kiselina. Pri tretmanu inokulantom došlo je do pojave značajne razlike između tretmana, u smislu povećanja sadržaja mlečne kiseline u suvoj materiji. Uprkos činjenici da kod oba tretmana količina sirćetne kiseline unekoliko prelazi granice prihvatljivog sadržaja (5,5% u odnosu na suhu materiju), primena inokulanta je uticala na njegovo značajno smanjenje u odnosu na kontrolni tretman. Rezultati ukazuju da je inokulacija usmerila proces fermentacije u povoljnom pravcu, s obzirom na povećanje sadržaja mlečne i smanjenje sadržaja sirćetne kiseline, kao i ostvarenje njihovog povoljnog odnosa (2-3:1).

Tabela 2. Ocena kvaliteta silaže lucerke različitim metodama  
*Table 2. Quality evaluation of lucerne silage using different methods*

Tretmani <i>Treatments</i>	DLG		Zelter	
	poena-points	klasa-class	poena-points	klasa-class
Bez inokulanta	46	I	17	II
Sa inokulantom	48	I	18,5	I

Na bazi metode DLG, oba tretmana su imala I klasu kvaliteta, dok je prema metodi Zelter-a pod uticajem inokulacije došlo do poboljšanja kvaliteta silaže za jednu klasu (kontrola – II klasa, inokulacija – I klasa) (Tabela 2). Koncentracije buterne kiseline su bile ispod nivoa detekcije. Međutim, prisustvo aktivnosti bakterija iz roda *Clostridium* se ne može isključiti usled visokih koncentracija amonijačnog azota. Proteolitičke vrste iz roda *Clostridium* mogu fermentisati amino-kiseline do amonijaka, uz proizvodnju neznatnih količina buterne kiseline (McDonald, Henderson i Heron, 1991). Procenat amonijačnog azota u odnosu na ukupni azot je pokazatelj degradacije proteina u procesu siliranja. Primenom inokulanata u ovom eksperimentu je došlo do značajnog smanjenja sadržaja amonijačnog azota u ukupnom azotu (NH<sub>3</sub>-N/ΣN %) (Tabela 1). Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjem Kung et al. (1984), koji ukazuju da se pri upotrebi mlečnokiselinskih inokulanata intenzivira i usmerava fermentacija, što zaustavlja proteolitičke sojeve buternih klostridijuma. Primena inokulanta, sa druge strane, nije značajno uticala na sadržaj vodorastvorljivog azota, kao ni na osnovne parametre hemijskog sastava kao što su sadržaj: sirovih proteina, sirove celuloze, sirovih masti, bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM-a) i pepela (Tabela 3).

Tabela 3. Hemijski sastav silaže  
*Table 3. Chemical composition of the silage*

Hemijski sastav <i>Chemical composition</i>	Sirovi proteini % SM <i>Crude proteins</i> % DM	Sirova celuloza % SM <i>Crude cellulose</i> % DM	Lipidi % SM <i>Lipids</i> % DM	BEM % SM <i>NFE</i> % DM	Pepeo % SM <i>Ash</i> % DM
Bez inokulanta	21.31	31.67	3.97	32.88	10.94
Sa inokulantom	19.96	32.98	4.23	34.31	10.50

### Zaključak

Primena inokulanta pri siliranju lucerke imala je značajan uticaj na većinu od parametara kvaliteta fermentacije. Ostvareno je značajno sniženje pH vrednosti, sadržaja sirćetne kiseline u SM i amonijačnog azota u odnosu na ukupni azot, kao i povećanje sadržaja mlečne kiseline. Na drugoj strani, inokulacija nije značajno uticala na sadržaj amonijačnog azota u odnosu na ukupni azot, kao ni na osnovne osobine vezane za hemijski sastav, kao što su sadržaj: sirovih proteina, sirove

celuloze, sirovih masti, BEM-a i pepela. Primenom inokulanata pri siliranju lucerke mogu se ostvariti značajna poboljšanja u pogledu parametara kvaliteta fermentacije, što je preduslov za dobijanje kvalitetnije i zdravstveno bezbednije silaže.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su Projekta br.: 451-03-68/2022-14/200217 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

### Literatura

- AOAC (1990). Official method 984.13 Crude protein in animal feed, forage, grain, and oil seeds. Official methods of analysis of AOAC International, 15th edition.
- Bolsen K. K., Lin C., Brent B. E., Feyerherm A. M., Urban J. E., Aimutis W. R. (1992). Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *Journal of Dairy Sciences*. 75: 3066-3083.
- Dong, Z., Chen L., Li J., Yuan X., Shao T. (2019). Characterization of nitrogen transformation dynamics in alfalfa and red clover and their mixture silages. *Grassland Science*. 65: 109-115.
- Džumanazarov B.N. (1981). Konzerviranje kormov. Ašahabad.
- Đorđević N., Šestić S. (1994). Uticaj dodataka na iskorišćavanje energije iz silaže. *Zbornik sa savetovanja mladih istraživača Srbije (SMIS 94). Proizvodnja hrane i energija*, Zemun, 38-43.
- Đorđević N., Dinić B. (2003). Siliranje leguminoza (monografija). Vizartis – Beograd.
- Dinić B., Đorđević N. (2005). Pripremanje i korišćenje silaže. Institut za istraživanje u poljoprivredi SRBIJA, Beograd.
- Jones, B. A., R. E. Muck, Satter M. D. (1992). Influence of bacterial inoculant and substrate addition to alfalfa ensiled at different dry matter content. *Grass and Forage Science*. 47: 19-27.
- Koljajić V., Đorđević N., Negovanović D. (1998). Korišćenje bakterijskih inokulanata pri spremanju silaže. *Biotehnologija u stočarstvu*, 14, 5-6: 51-63.
- Kung L. RJ., Grieve D. B., Thomas J. W., Huber J. T. (1984). Added ammonia of microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. *Journal of Dairy Science*. 67-2.
- McDonald P., Henderson A. R., Heron S. J. E. (1991). *The Biochemistry of Silage*, Chalcombe Publications, Marlow, UK.
- Merry R. J., Lowes K. F., Winters A. L. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium of Forage Conservation*. Research Institute of Animal Nutrition, Ltd. Pohorelice, 17-27.
- Muck R. E., Pitt R. E. (1993). Ensiling and its effect on crop quality. *Proceedings of the National Silage Production Conference*, Syracuse, NY. NRAES-67. Northeast Regional Agriculture and Engineering Service, Ithaca, NY. 57-66.

Muck, R. E., Bolsen K. K. (1991). Silage preservation and silage additive products. Pages 105-126 in Field Guide for Hay and Silage Management in North America. K. K. Bolsen, ed. National Feed Ingredients Association, Des Moines, IA.

## **INFLUENCE OF INOCULATION ON THE QUALITY OF FERMENTATION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ALFALFA SILAGE**

*Dorđe Lazarević<sup>1</sup>, Vladeta Stevović<sup>2</sup>, Jasmina Radović<sup>1</sup>, Dalibor Tomić<sup>2</sup>, Jordan Marković<sup>1</sup>, Mladen Prijović<sup>1</sup>, Vladimir Zornić<sup>1</sup>*

### **Abstract**

In order to assess the impact of the inoculant "BioStabil Plus" on the ensiling process of alfalfa, the parameters of fermentation quality were analyzed (pH, acetic, butyric, lactic acid, ammonia and water-soluble nitrogen in total nitrogen) and chemical composition of silage (crude protein, crude cellulose, crude fats, nitrogen-free extractives and ash), as well as silage quality assessment (DLG and Zelter). Alfalfa biomass in the beginning of flowering phase was ensiled without additives and with the addition of inoculant. The addition of inoculant showed a decrease in pH, increased production of lactic acid, reduced production of acetic acid, with a favorable ratio of these acids (2-3: 1). The introduction of inoculants resulted in improved fermentation quality, which resulted in better preservation of nutrients, especially for crude proteins, since the use of inoculants also showed a decrease in ammonia nitrogen content compared to control (inoculation - 12.28% NH<sub>3</sub>-N/ΣN, control - 17.42% NH<sub>3</sub>-N/ΣN). The general conclusion is that inoculant should be added to alfalfa biomass, for the purpose of optimal production of lactic and acetic acid, as well as obtaining higher nutritional value.

**Key words:** silage, fermentation, alfalfa, inoculant

---

<sup>1</sup> Institute for Forage Crops Krusevac, 37251 Globoder, Krusevac, Serbia ([djordje.lazarevic@ikbks.com](mailto:djordje.lazarevic@ikbks.com))

<sup>2</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agriculture Cacak, Cara Dusana 34, Cacak.