

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav výživy zvířat a pícninářství



**Vliv biologického a chemického ošetření na výskyt
biogenních aminů u vojtěškových siláží**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
doc. Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Pavla Remerová

Brno 2017



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce: Bc. Pavla Remerová
Studijní program: Zemědělská specializace
Obor: Zemědělské inženýrství

Vedoucí práce: Ing. Pavel Horký, Ph.D.
Konzultant: Ing. Veronika Mlejnková

Název práce: **Vliv biologického a chemického ošetření na výskyt biogenních aminů u vojtěškových siláží**

Jazyková varianta: Čeština

Zásady pro vypracování:

1. Prostudovat dostupnou odbornou literaturu zabývající se významem biogenních aminů
2. Prostudovat dostupnou odbornou literaturu zabývající mechanismem působení biogenních aminů
3. Dle pokynů vedoucího založit experimentální sledování na porostech *Medicago sativa* s aplikací chemického a biologického inokulantu
4. Ve vzorcích siláží analyzovat vybrané biogenní aminy
5. Vypracovat diplomovou práci na základě získaných dat a na základě zpracovaných údajů biometrickým postupem
6. Výsledky popsat v diskuzi a vyvodit z nich správné závěry
7. Předat diplomovou práci vedoucímu diplomové práce do poloviny dubna 2017

Rozsah práce: 50 - 60 stran

Literatura:

1. HODULÍKOVÁ, L. -- MIKYSKA, F. -- SKLÁDANKA, J. -- ADAM, V. -- KLUSOŇOVÁ, I. -- KVASNOVSKÝ, M. Hodnocení obsahu biogenních aminů v silážích. *Úroda*. 2014. sv. 62, č. 12, s. 135--142. ISSN 0139-6013.
2. SKLÁDANKA, J. -- BALABÁNOVÁ, M. -- JAMBOR, V. -- ADAM, V. -- KOMÍNKOVÁ, M. Vliv ošetření na obsah biogenních aminů v silážích vojtěšky. *Úroda*. 2014. sv. 62, č. 12, s. 149--155. ISSN 0139-6013.
3. SMĚLÁ, D. -- KOMPRDA, T. -- KLEJDUS, B. -- KUBÁŇ, V. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in a Meat Product During Fermentation and Longterm Storage. *Czech journal of food sciences*. 2003.

sv. 21, č. 3, s. 167--175. ISSN 1212-1800.

4. BALABÁNOVÁ, M. -- HORKÝ, P. -- HOŠKOVÁ, Š. *Přirozené škodlivé látky v krmivech*. Šumperk: Mendelova univerzita v Brně, 2013. 72 s. ISBN 978-80-7375-886-8.
5. MORET, S. -- SMĚLÁ, D. -- POPULIN, T. -- CONTE, L S. A Survey on Free Biogenic Amine Content of Fresh and Preserved Vegetables. *Food Chemistry*. 2005. sv. 90, č. 1, s. 355--361. ISSN 0308-8146.
6. DOLEŽAL, P. -- POŠTULKA, R. -- DVOŘÁČKOVÁ, J. -- SZWEDZIAK, K. -- VYSKOČIL, I. -- TUKIENDORF, M. -- ZEMAN, L. The Effect of a biological Additive on Alfalfa Silage Fermentation and in Vitro OMD. In *14th International Symposium forage conservation*. 1. vyd. Brno: Mendel University Brno, 2010, s. 164--166. ISBN 978-80-7375-386-3.

Datum zadání: říjen 2015

Datum odevzdání: duben 2017

Bc. Pavla Remerová
Autorka práce

Ing. Pavel Horký, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D.
Vedoucí ústavu

doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

.....
vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Pavlu Horkému, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, praktických připomínek, odborné vedení a trpělivost.

Děkuji také svým rodičům a blízkým přátelům za podporu během svého celého studia.

ABSTRAKT

V experimentu byl sledován vliv dvou různých silážních aditiv biologického (*Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22502/NCIMB 11181), enzym xylanáza EC 3.2.1.8.) a chemického (43 % kyseliny mravenčí, 30 % mravenčanu amonného, 10 % kyseliny propionové a 2 % kyseliny benzoové) na koncentraci biogenních aminů, obsah živin, zhodnocení kvality fermentačního procesu a mikrobiologických ukazatelů u vojtěškových siláží (*Medicago sativa*). Doba fermentace siláží byla 90 dní. Biologické silážní aditivum průkazně zvýšilo výskyt putrescinu (o 51 %; $P < 0,05$), kyseliny mléčné (o 11 %; $P < 0,05$), proteinu (o 11 %; $P < 0,05$). Naopak došlo k signifikantnímu snížení kadaverinu (o 29 %; $P < 0,05$), histaminu (o 57 %; $P < 0,05$), spermidinu (o 15 %; $P < 0,05$), sperminu (o 55 %; $P < 0,05$), kyseliny octové (o 40 %; $P < 0,05$), ethanolu (o 55 %; $P < 0,05$), amoniaku (o 25 %; $P < 0,05$) a popelovin (o 9 %; $P < 0,05$).

U skupiny ošetřené chemickým silážním aditivem se statisticky průkazně zvýšil obsah histaminu (o 63 %; $P < 0,05$) a tyraminu (o 34 %; $P < 0,05$). Snížila se koncentrace putrescinu (o 18 %; $P < 0,05$), kadaverinu (o 55 %; $P < 0,05$), spermidinu (o 47 %; $P < 0,05$), sperminu (o 45 %; $P < 0,05$), kyseliny mléčné (o 16 %; $P < 0,05$) kyseliny octové (o 46 %; $P < 0,05$), amoniaku (o 59 %; $P < 0,05$), popelovin (o 13 %; $P < 0,05$) a tuku (o 24 %; $P < 0,05$).

Z mikrobiologického hlediska byly ovlivněny bakterie mléčného kvašení, plísňe, kvasinky, enterobakterie a celkový počet mikroorganismů.

Z výsledků je patrné, že pro udržení hygienické a zdravotně nezávadné siláže je výhodné používat biologické i chemické silážní aditiva. U vojtěškových siláží má chemický inokulant vyšší účinnost na zachování zdravotní bezpečnosti siláže v porovnání s biologickým inokulantem.

Klíčová slova: vojtěška, siláž, klostridie, bakterie mléčného kvašení, biologické aditivum, chemické aditivum

ABSTRACT

In the experiment, the influence of two different biological silage additives (*Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22 502 / NCIMB 11181), the enzyme xylanase EC 3.2.1.8.) And chemical (43% formic acid 30% ammonium formate and 10% propionic acid and 2% benzoic acid) at a concentration of biogenic amines, nutrient content, evaluation of the quality of the fermentation process and microbiological parameters for alfalfa silage (*Medicago sativa*). Silage fermentation time was 90 days. Biological silage additive significantly increased incidence of putrescine (51%; $P < 0.05$), lactic acid (11%; $P < 0.05$), protein (11%; $P < 0.05$). Conversely, there was a significant reduction cadaverine (29%; $P < 0.05$), histamine (57%; $P < 0.05$), spermidine (15%; $P < 0.05$), spermine (55%; $P < 0.05$), acetic acid (40%; $P < 0.05$), ethanol (55%; $P < 0.05$) ammonia (25%; $P < 0.05$), and ash (9%; $P < 0.05$).

In the group treated by chemical silage additive is statistically significantly increased histamine content (63%; $P < 0.05$) and tyramine (34%; $P < 0.05$). Decreases in the concentration of putrescine (18%; $P < 0.05$), cadaverine (55%; $P < 0.05$), spermidine (47%, $P < 0.05$), spermine (45%; $P < 0.05$), lactic acid (16%; $P < 0.05$), acetic acid (46%; $P < 0.05$) ammonia (59%, $P < 0.05$), ash (13%, $P < 0.05$) and fat (24%, $P < 0.05$).

From a microbiological point of view have been affected by the lactic acid bacteria, molds, yeasts, enterobacteria and total number of microorganisms.

The results show that to maintain hygiene and healthy silage is preferable to use biological and chemical silage additives. For alfalfa silage inoculant chemical has higher efficiency in maintaining health security silage compared with biological inoculant

Keywords: alfalfa, silage, clostridia, lactic acid bacteria, biological additive, chemical additive

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL PRÁCE.....	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	BIOGENNÍ AMINY	12
3.1.1	<i>Rozdělení biogenních aminů.....</i>	<i>13</i>
3.1.2	<i>Metabolismus biogenních aminů v organismu</i>	<i>16</i>
3.1.3	<i>Proteolýza</i>	<i>18</i>
3.2	VOJTĚŠKOVÉ SILÁŽE.....	19
3.2.1	<i>Silážování vojtěšky.....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Specifika silážování vojtěšky.....</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>Nutriční hodnota siláže.....</i>	<i>20</i>
3.3	KLOSTRIDIE	23
3.3.1	<i>Histotoxické klostridie</i>	<i>24</i>
3.3.2	<i>Enteropatogenní a enterotoxemické klostridie</i>	<i>24</i>
3.3.3	<i>Neurotoxické klostridie</i>	<i>25</i>
3.3.4	<i>Klostridie ve vztahu k biogenním aminům.....</i>	<i>26</i>
3.4	BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	27
3.5	KVASINKY	27
3.6	PLÍSNĚ	28
3.7	ELIMINACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	29
3.7.1	<i>Bakteriální inokulanty.....</i>	<i>30</i>
3.7.2	<i>Bakteriálně-enzymatická aditiva.....</i>	<i>31</i>
3.7.3	<i>Chemické konzervanty</i>	<i>31</i>
3.7.4	<i>Možnosti ošetření vojtěškové siláže na výskyt biogenních aminů.....</i>	<i>32</i>
4	MATERIÁL A METODIKA	33
4.1	POKUSNÉ PARCELY	33
4.2	MIKROBIOLOGIE	34
4.3	PŘÍPRAVA VODNÍHO VÝLUHU PRO STANOVENÍ UKAZATELŮ FERMENTACE:.....	34
4.4	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	35

4.5	STATISTIKA.....	36
5	VÝSLEDKY	37
6	DISKUZE	40
7	ZÁVĚR	42
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	43
9	SEZNAM ZKRATEK	48
10	SEZNAM TABULEK.....	49
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
12	PŘÍLOHY	51

1 ÚVOD

Vojtěška setá je jedna z nejdůležitějších bílkovinných plodin z hlediska výživy hospodářských zvířat. Pro uchování kvality vojtěšky slouží její konzervace – vojtěšková siláž. Aby se docílilo opravdu kvalitní vojtěškové siláže, musí být dodržena určitá hygienická kritéria, časové rozestupy navážení, dokonalé udusání a zakrytí siláže.

Pokud nebudou jednotlivé body při silážování vojtěšky dodrženy, hrozí rozvoj nežádoucí mikroflóry a proces druhotné fermentace. Při tomto procesu je přeměňována kyselina mléčná na kyselinu máselnou, amoniak a biogenní aminy, a to díky proteolytické aktivitě klostridií.

Biogenní aminy jsou látky nacházející se ve všech živých buňkách a potravinách. Z chemického hlediska se rozdělují do čtyř skupin. Alifatický amin kadaverin, aromatické aminy tyramin a fenylethylamin, heterocyklické aminy histamin a tryptamin a poslední skupinu tvoří polyaminy putrescin, spermin a spermidin.

Aby se zamezilo aktivitě klostridií a jiné nežádoucí mikroflóry, přidávají se do vojtěškových siláží aditiva, která napomáhají bránit rozvoji nežádoucí mikroflóry. Aditiva mohou být chemické či biologické povahy.

Jako chemické aditivum se nejčastěji používá kyselina propionová, mravenčí a soli těchto kyselin. Cílem chemické konzervace je rychlé okyselení hmoty, čímž se potlačí růst nevyhovující mikroflóry.

Biologická aditiva jsou složena z bakterií napomáhajících fermentačnímu procesu. Jako hlavní složka se téměř ve všech biologických aditivech vyskytuje kmen *Lactobacillus a Enterococcus*. Hlavním důvodem dodání mikroorganismů do silážované hmoty je posílení požadované mikroflóry.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je zhodnotit vliv biologického a chemického ošetření na výskyt biogenních aminů a živinových parametrů v modelových silážích vojtěšky.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Biogenní aminy

Před více než sto lety se nazývaly prokainy – látky jedovaté povahy. Dnes se označují jako biogenní aminy – nízkomolekulární bazické dusíkaté látky. Jejich původ pochází z aminokyselin. Nalezneme je v buňkách rostlin i živočichů, kde zajišťují důležité funkce organismu. Jejich koncentrace však nesmí překročit kritickou mez. Poté mohou vyvolávat nežádoucí účinky a v některých případech mohou být toxické (Janoušková, 2010).

Jejich vznik je podmíněn kofaktorem pyridoxal-5-fosfátem. Také mohou vznikat aminací a transaminací ketonů a aldehydů a působením nativních enzymů (Zorníková, 2012).

Biogenní aminy se vyskytují ve všech krmivech, která obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny, bývají ve vyšším množství obsaženy ve fermentovaných krmivech, kde vznikají činností mikroorganismů (Halász a kol., 1994).

Biogenní aminy jsou skupinou alifatických, heterocyklických nebo aromatických bází odvozených od aminokyselin. Některé biogenní aminy mají samy významné biologické vlastnosti, protože jsou např. tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavebními látkami, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenylethylamin), fytohormonů auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin (Silla Santos, 1996). U histaminu, tyraminu a 2 - fenyletylaminu jsou zjišťovány nepříznivé účinky, ovlivňují nervový systém, působí na krevní tlak, vyvolávají kožní projevy.

Polyaminy (spermidin, putrescin, kadaverin) jsou nezbytné pro dělení a růst buněk, pro udržení vysoké metabolické aktivity, pro funkci imunitního systému, atd. Podporují zároveň i růst nádorů, i když samy nejsou karcinogenní (Ardóz, 1995).

Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn aktivitou těchto enzymů, která může být u jednotlivých jedinců různá a závislá na řadě faktorů, např. na přítomnosti inhibitorů (některá léčiva, alkohol). Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního biogenního aminu, ale i ostatních faktorů, jakými jsou

množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod., proto je velmi obtížné stanovit hranici jejich toxicity (Suzzi a kol., 2003).

3.1.1 Rozdělení biogenních aminů

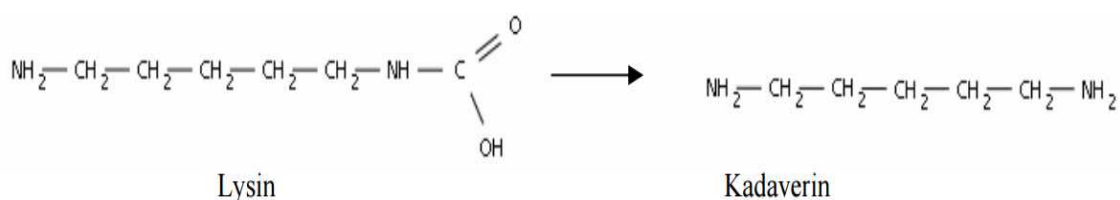
Podle chemické struktury můžeme biogenní aminy rozdělit do čtyř skupin:

- I. alifatické
- II. aromatické
- III. heterocyklické
- IV. polyaminy

Mezi alifatické biogenní aminy patří kadaverin. Mezi aromatické řadíme 2-fenyletylamin a tyramin. Heterocyklické jsou histamin a tryptamin. Putrescin, spermin, spermidin a agmatin patří do skupiny polyaminů (Brázdová, 2011).

Kadaverin – alifatický amin

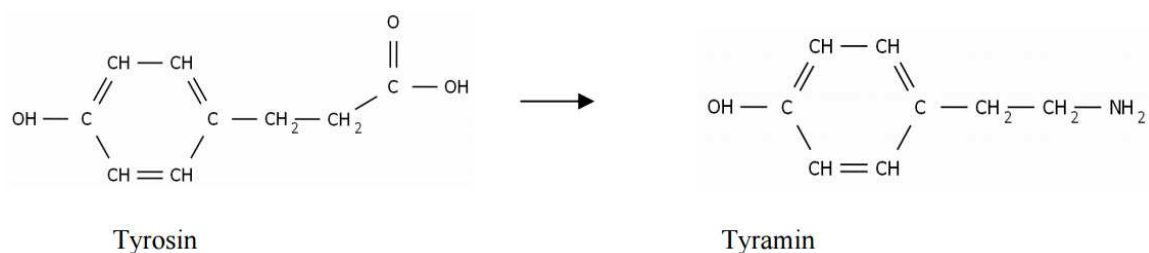
Kadaverin, po chemické stránce též pentamethylendiamin nebo pentan-1,5,-diamin, vzniká dekarboxylací aminokyseliny ornithinu a lysinu. Kadaverin není příliš toxický, ale dokáže zvyšovat toxicitu dalších biogenních aminů, jako jsou histamin a tyramin (Buňková a kol., 2012).



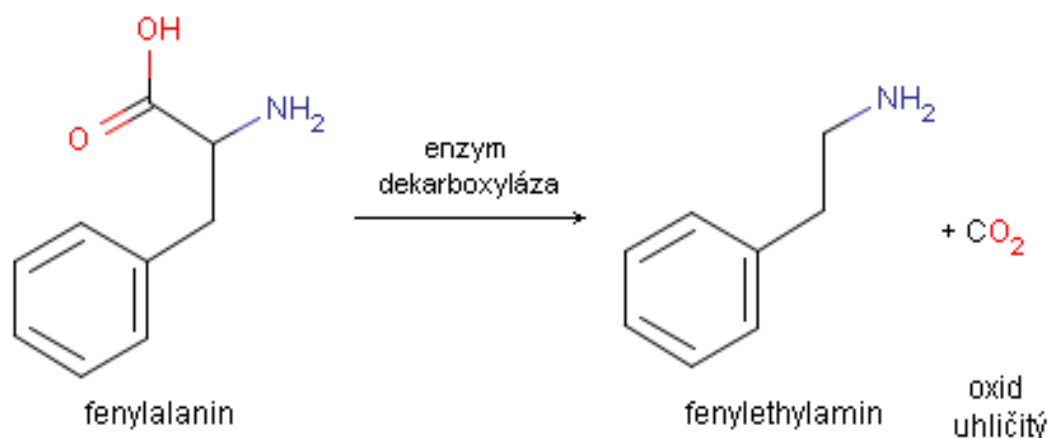
Obrázek 1: Vznik kadaverinu z lysinu (Brázdová, 2011)

Aromatické aminy

Aromatické aminy se v okolním prostředí nacházejí jako součást průmyslových odpadů nebo jako degradační produkty pesticidů a vznikají bakteriální přeměnou azolátek na jejich prekursory. Mnoho těchto látek je vysoce toxických nebo mutagenních a nalezneme je v atmosféře, v biologických materiálech i ve vodách (Štulík a Pacáková, 1989).



Obrázek 2: Vznik tyraminu z tyrosinu (Brázdová, 2011)

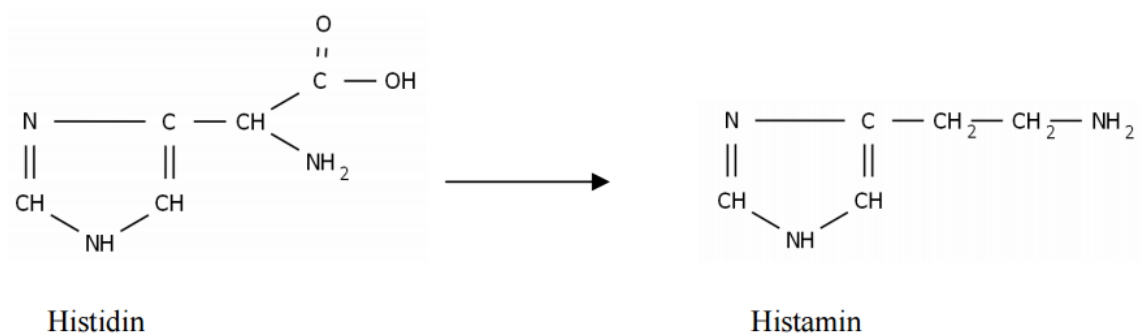


Obrázek 3: Vznik fenylethylaminu z fenylalaninu (Brázdová, 2011)

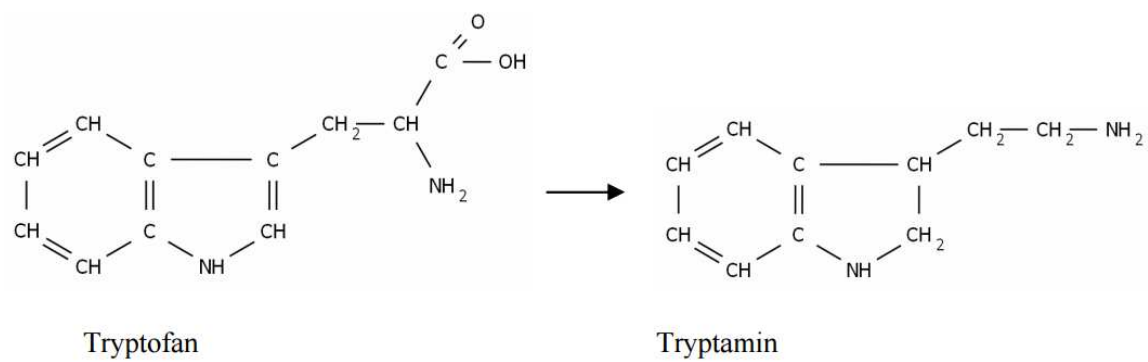
Heterocyklické aminy

Histamin je neurotransmitter. Histamin hraje důležitou roli u chronických onemocnění zažívacího ústrojí. Histamin je aktivován díky aktivaci žírných buněk (mastocytů) a svůj účinek vykonává vazbou na čtyři různé receptory histaminu – H1, H2, H3 a H4. Tyto receptory se nachází po celém těle a každý receptor zprostředkovává jedinečnou odpověď (Sullivant a kol., 2016).

Tryptamin patří do skupiny alkaloidů vyskytující se v rostlinách, houbách a živočiších. Po chemické stránce je příbuzný tryptofanu, ale je odvozen od indolu. V mozku savců má úkol neurotransmiteru, čímž vytváří základ pro ostatní neurotransmitery, halucinogeny a psychoaktivní látky (Abramovitch a Shapiro, 1956).



Obrázek 4: Vznik histaminu z histidinu (Brázdová, 2011)



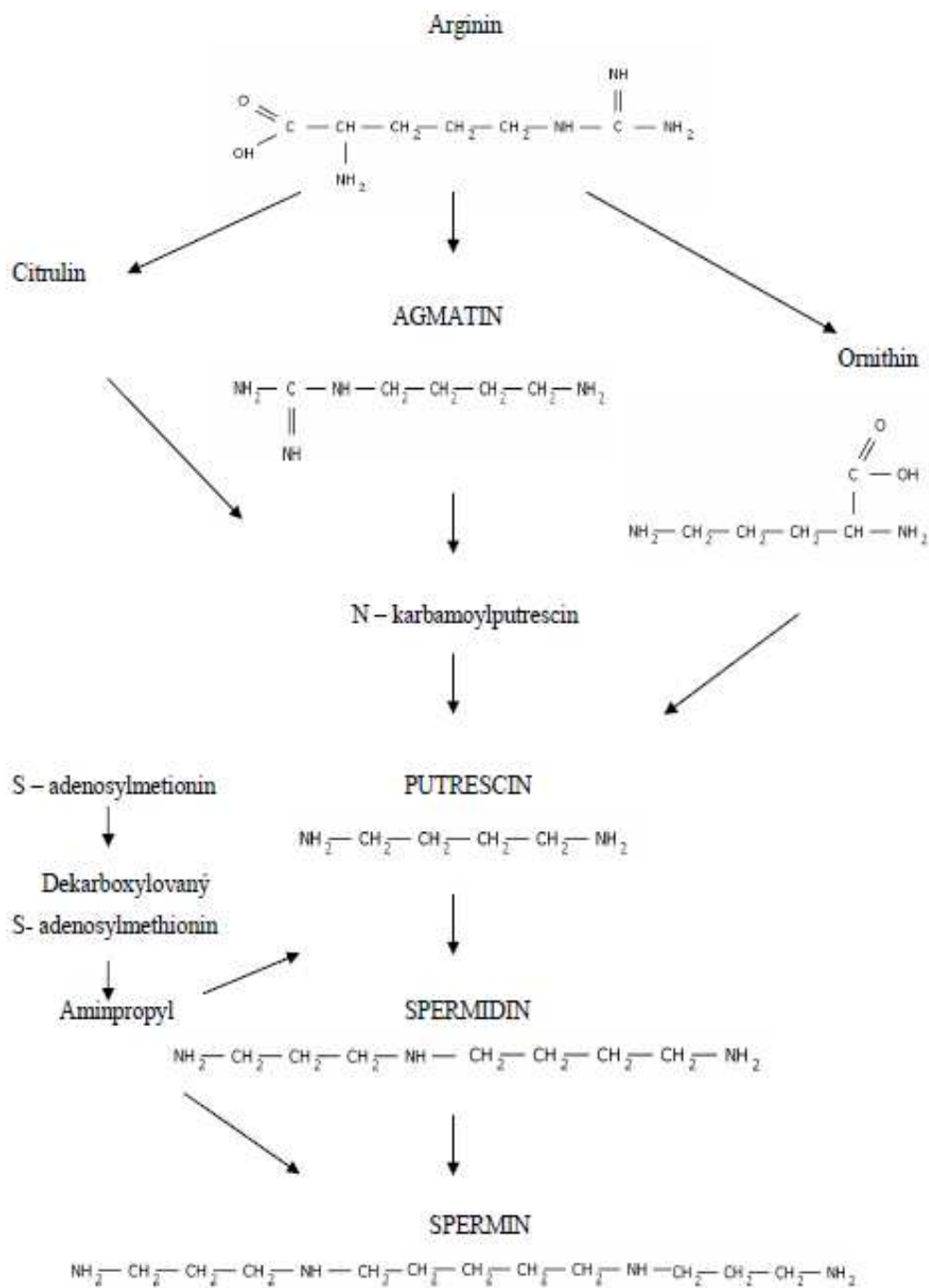
Obrázek 5: Vznik tryptaminu z tryptofanu (Brázdová, 2011)

Polyaminy

Putrescin, spermin a spermidin, patřící do skupiny polyaminů, označujeme jako fyziologické aminy. Na základě jejich biologického účinku v buňkách eukaryotických organismů a také na jejich odlišných patofyziologických projevech jsou řazeny jako samostatná skupina od roku 1990. Putrescin, jakožto diamin, je řazen do této skupiny, protože působí jako prekurzor pro vznik sperminu a spermidinu (Janoušková, 2010).

Polyaminy mají největší význam při proliferaci a buněčném růstu. V živém organismu se vyskytuje zdroj polyaminů vznikajících endogenní biosyntézou. (Brázdová, 2011).

V minulých letech se začal mezi polyaminy řadit i agmatin, vzniklý z argininu (Larqué, Sabater-Molina a Zamora, 2007).

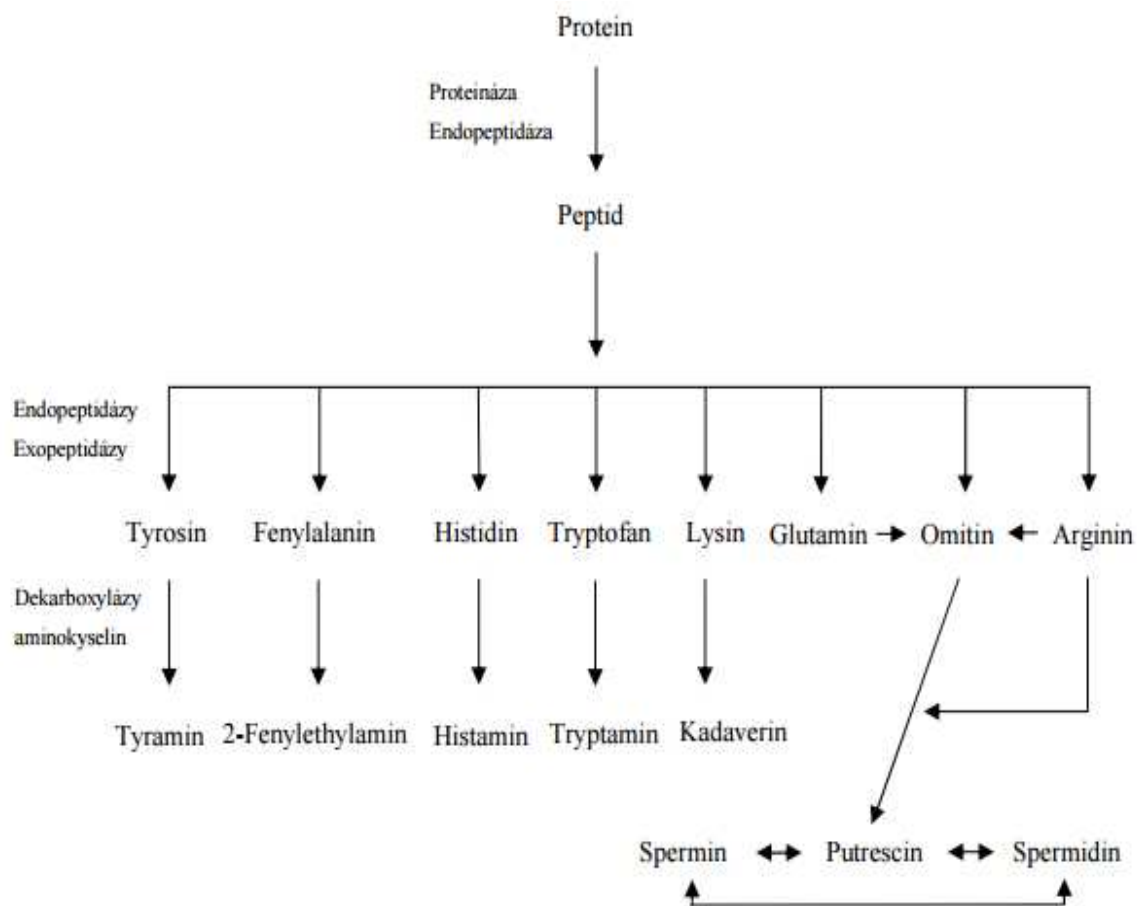


Obrázek 6: Vznik polyaminů (Brázdová, 2011)

3.1.2 Metabolismus biogenních aminů v organismu

Biogenní aminy vznikají enzymatickou dekarboxylací volných aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Nachází se v potravinách, obsahujících proteiny nebo

volné aminokyseliny, kde mají vhodné podmínky pro mikrobiální a biochemické aktivity. Také vznikají působením nativních enzymů potravin a činností určitých mikrobiálních dekarboxyláz.



Obrázek 7: Vznik biogenních aminů (Matějková, 2013)

Biogenní aminy mohou způsobovat bolesti hlavy, výkyvy krevního tlaku, horečku, nevolnost, vyrážku na kůži, dýchací potíže, nával krve do obličeje, žaludeční a střevní vředy. Detoxikační systém, fungující ve střevním traktu, dokáže odbourávat obvyklé množství biogenních aminů přijímaných v potravinách, díky enzymům monoaminoxidáze a diaminoxidáze, které působí ve střevním epitelu. Tyto enzymy však nezvládnou odbourat nadměrný příjem biogenních aminů. Inhibitorem těchto enzymů je např. alkohol, psychofarmaka, antidepresiva a broncholytika.

Toxická dávka biogenních aminů závisí na funkci detoxikačních mechanismů. Tato schopnost je u každého jedince osobitá. Proto nelze jednoznačně určit práh toxicity biogenních aminů (Matějková, 2013).

3.1.3 Proteolýza

Proteolýza je řazena mezi jedny z nejvýznamnějších biochemických dějů. Ty zahrnují na straně jedné nespecifickou degradaci proteinů při procesech trávení a na straně druhé vysoce specifickou úpravu struktury proteinů a regulaci jejich funkce (Srp, Mareš, 2016). Tvůrcem proteolýzy bývá metabolická činnost klostridií (Poštulka, 2011).

Hodnocení stupně proteolýzy se provádí u bílkovinných a polobílkovinných siláží. Vypočítáme ho jako podíl dusíku amoniakálního z obsahu dusíku celkového. Vzhledem k tomu, že proteolýza má negativní dopad na hospodářská zvířata, byl vytvořen systém penalizace snižující fermentační třídu. Nejvyšší počet bodů, které lze za stupeň proteolýzy v siláži dostat, je 13. Tento systém je klasifikován samostatně pro vojtěšku a pro ostatní bílkovinné siláže. Také má dopad na celkovou třídu a slovní ohodnocení siláže (Pozdíšek, 2008)

Tabulka 1: Hodnocení proteolýzy u vojtěškových siláží (Převzato z: Pozdíšek, 2008)

% proteolýzy	Body	Penalizace za proteolýzu
Do 8,00	13	-
8,01 – 9,00	11	-
9,01 – 10,00	9	-
10,01 – 11,00	6	-
11,01 – 12,00	3	-5
12,01 – 13,00	0	-5
13,01 – 15,00	0	-10
15,01 – 20,00	0	-15
Nad 20,01	0	-20

Během hodnocení kvality fermentačního procesu je jako jeden z parametrů hodnocen obsah kyseliny máselné, dle které jsou siláži přidělovány body nebo penalizace. Množství kyseliny máselné v siláži nemusí vždy souviset se stupněm proteolýzy. U vojtěškových siláží by měl být stupeň proteolýzy pod hranicí 8,00 %. Pokud je v siláži stupeň proteolýzy nad 20 %, musíme takovou siláž označit za zdravotně závadné krmivo (Poštulka, 2011).

3.2 Vojtěškové siláže

Vojtěška setá – *Medicago sativa L.* – je významnou píceňnou s vysokým podílem bílkovin, dusíkatých látek, vápníku, hořčíku, β -karotenu a vitamínů B1, B2, D, E, C a K. Vojtěška shromažďuje nejvíce rezervních látek ve fázi kvetení. Kvalitu vojtěšky určujeme podle podílu listů a lodyh (Hrabě, 2004).

Vojtěška, jako hlavní zdroj rostlinných bílkovin u všech býložravců, obsahuje antinutriční látky (např. kumestrol, lucernol, estradiol), které představují určitý problém při jejím zkrmování. Dalším problémem jsou klostridie, plísně, způsob skladování a počasím ovlivněný průběh sklizně (Doležal a kol., 2012).

3.2.1 Silážování vojtěšky

Vojtěška je jedna z pícnin charakteristická velmi těžkou silážovatelností. Špatná silážovatelnost je ovlivněna vysokým obsahem látek s pufrací schopností a nízkým obsahem zkvasitelných sacharidů (Doležal a kol., 2012).

Doležal a kol. (2012) uvádí: „Při nízké koncentraci vodorozpustných sacharidů a nedostatečném obsahu sušiny nelze počítat s úspěšnou konzervací.“ Konzervace vojtěšky probíhá po jejím zavaznutí na sušinu 40 – 45%. (Dvořáčková, 2011).

Siláž z vojtěšky je nejčastěji podávána zvířatům v dávce 2–3 kg/100 g živé hmotnosti. Otázkou zůstává vyšší obsah fytoestrogenů. Ty mohou mít záporný vliv na plodnost užitkových zvířat. Aktivita estrogenů se při silážování píce v čerstvém stavu, málo zavazlé nebo konzervované pomocí biologických aditiv může zvyšovat. Při chemické konzervaci píce se estrogení aktivita nemění (Dvořáčková, 2011).

3.2.2 Specifika silážování vojtěšky

Riziko výroby nekvalitní vojtěškové siláže spočívá v nedostatečném prokvašení na potřebné pH. Pokud vznikne málo kyseliny mléčné, dochází po určité době ke zvratu a kyselina mléčná se přeměňuje na kyselinu máselnou. Siláž nezůstane stabilní, pokud při sušině 30 % není dosaženo pH 4,6. Při sušině 45 % je hranice minimální kyselosti pro rozvoj klostridií pH 4,85. Druhotná fermentace probíhá i bez přístupu kyslíku.

Fermentační proces mohou negativně ovlivnit staré nebo špatně nastavené obrabeče a shrnovače. Důvodem je velké množství prachu a hlíny v silážované píce, které mohou podpořit vysokou tlumivou kapacitu silážované hmoty.

Pro snadnější konzervaci se do silážované hmoty jetelovin často přidávají biologické či chemické konzervanty. Použití konzervačních přípravků by mělo sloužit k vytvoření dostatečně kyselého prostředí při nízkých ztrátách sušiny, energie a živin. Při použití biologických přípravků je limitem nedostatek vodorozpustných cukrů a vysoká tlumivá kapacita. Řešením může být aplikace melasy.

Pořadí seče do jisté míry ovlivňuje silážování. S každou další sečí je ve vojtěšce příznivější poměr mezi dusíkatými látkami a lehce fermentovatelnými sacharidy, tzn. jsou lépe silážovatelné. Třetí a další seč konaná na podzim, kdy jsou klimatické podmínky pro zavádění méně příznivé, je většinou nepovedená.

V zemědělské praxi může obsah vodorozpustných cukrů v porostu zvýšit přisev některých druhů trav s vysokým obsahem vodorozpustných cukrů, pevným stéblem a dobrou snášenlivostí na zastínění (Pozdíšek, 2008).

3.2.3 Nutriční hodnota siláže

Funkcí výživné hodnoty a dobrovolného příjmu krmiva, je nutriční neboli krmná hodnota. Množstvím stravitelných živin a energie je zastoupena výživná hodnota. Příjem krmiva pak ovlivňuje chutnost a schopnost naplnit zažívací trakt zvířete.

V krmivech zastoupené živiny jsou látky (organického i neorganického původu), které jsou po přijetí a trávení v organismu metabolizovány. Organické látky uvolňují potřebnou energii při štěpení. Jsou schopny zabudovávat se do tvořených tkání nebo jejich produktů. Mezi hlavní energetické živiny patří sacharidy, tuky a dusíkaté látky. Voda a

anorganické látky při svém štěpení energii neuvolňují, ale také mají schopnost se zabudovat do tkání těla.

Pokud chceme vyjádřit výživnou hodnotu krmiva, musíme znát chemické složení, stravitelnost jednotlivých živin a energii pro krmená zvířata. Také ji ovlivňuje obsah biologicky účinných látek – vitamínů, enzymů, hormonu a také antinutričních látek (Pozdíšek, 2008).

Tabulka 2: Obsah živin ve vojtěšce v absolutní sušině (Převzato z: Sommer a kol., 1994)

	NL	NEL	NEV	PDIN	PDIE	Vlák.	Ca	P
	G	MJ	MJ	G	g	g	g	g
Vojtěška setá na zač. butonizace	222,0	5,00	4,67	139,50	92,80	234,00	21,20	3,20
Vojtěška setá na zač. kvetení	190,00	5,61	5,43	121,20	93,30	289,00	21,20	3,00
Vojtěška setá v květu	167,00	5,68	5,52	105,10	88,30	338,00	22,90	3,30
Vojtěška 1.seč na zač. butonizace	206,00	5,51	5,32	129,40	94,20	274,00	16,50	3,00
Vojtěška 2.seč obrůst 5 týdnů	241,00	5,53	5,33	150,90	99,50	261,00	19,00	3,00
Vojtěška 3.seč obrůst 5 týdnů	241,00	5,53	5,33	150,90	99,50	261,00	19,00	3,00
Vojtěška 3.seč obrůst 8 týdnů	203,00	4,95	4,62	127,10	87,50	280,00	18,50	2,50
Vojtěška 4.seč obrůst 5 týdnů	259,00	5,52	5,36	161,70	100,60	207,00	18,50	3,00

Dusíkaté látky

Dusíkaté látky (NL) jsou vyjádřeny jako analyticky stanovený obsah dusíku v krmivu vynásobený přepočítávacím koeficientem 6,25. Dusíkaté látky jsou živiny obsahující dusík ve využitelné formě pro zvířata. Zvířata – obzvláště přežvýkavci – nedokáží využívat všechny zdroje dusíku. NL nebílkovinné povahy (př. močovina) se rozkládají pomocí

mikroorganismů v bacheru. Některé NL (vázané v nerozpustných komplexech, tepelně poškozené NL atd.) nemohou být využity ani s pomocí mikroorganismů (Pozdíšek, 2008).

Dusíkaté látky se stanovují dle Kjeldala a to z vysušeného a pomletého vzorku siláže mineralizací kyselinou sírovou za vysokých teplot s přídavkem katalyzátoru. Další možností jejich stanovení je elementární analýza vysokoteplotním spálením dle Dumase (Doležal a kol., 2012).

Sacharidy

Sušinu krmiv tvoří z 50 – 80 % sacharidy. Pohlížíme na ně jako na hlavní zdroj energie pro přežvýkavce. Rozlišujeme je na dvě skupiny, a to jednoduché sacharidy - cukry a zásobní sacharidy – škrob, jako hlavní složku zrnin a strukturální sacharidy – vlákninový komplex.

Sacharidy obsažené v krmivu jsou rozdílné svoji kvalitou související s chemickou a fyzikální strukturou a primárním složením. To je důležité pro příjem zvířaty, rychlosti rozsahu degradace v bacheru a od těchto faktorů závisí efektivnost využití energie a dusíkatých látek krmiv (Pozdíšek, 2008).

Sacharidy dělíme na strukturální a nestrukturální sacharidy.

A\ Nestrukturální sacharidy

Nestrukturální sacharidy se nacházejí uvnitř buňky. Jsou stravitelnější. Řadíme mezi ně cukry, škroby, organické kyseliny, fruktany a sacharózu. Objemná krmiva obsahují sacharózu, fruktany a jednoduché cukry (Náměstková, 2017).

Je doporučeno, aby denní dávka škrobu a cukrů nepřekročila 250 g v 1 kg sušiny krmné dávky (Pozdíšek, 2008).

Pozdíšek (2008) uvádí: „Využití škrobu je limitované absorpční kapacitou glukózy, enzymatickou aktivitou amylázy a izomaltázy, mikrobiální fermentací glukózy a možnostmi glukoneogeneze. Jestliže 50 až 90 % přijatého škrobu je degradováno v předžaludcích, možnosti zlepšení krytí potřeby glukózy u vysoko-užitkových zvířat jsou v kombinaci nativních, resp. ošetřených krmiv s nízkou degradovatelností škrobu, čímž je možno snížit celkovou denní dávku a zvýšit by-pass škrobu do tenkého střeva.“

B\ Strukturální sacharidy

Mezi strukturální sacharidy řadíme obtížněji stravitelné sacharidy a sacharidy tvořící obal buňky (Náměstková, 2017).

Velký význam ve výživě skotu je přidělován hrubé vláknině, jejíž množství v zelených i konzervovaných objemných krmivech velmi kolísá. Kolísání je způsobeno vývojovým stádiem píce při sklizni – čím je rostlina starší, tím je vyšší podíl vlákniny. Množství hrubé vlákniny v krmné dávce má vliv na její stravitelnost, tučnost mléka a příjem krmiva. Optimální zastoupení hrubé vlákniny v krmné dávce je v rozmezí 15 – 18 % ze sušiny krmné dávky (Boubancová, 2006).

Významná je také acidodetergentní vláknina (ADF). U dojnic hraje důležitou roli pro peristaltiku střev. Tato vláknina má tvořit 17 – 21 % z celkového množství vlákniny. Vyšší obsah ADF může snížit stravitelnost (Pařilová, 2007). ADF udává obsah celulózy, ligninu a lignifikovaných dusíkatých složek rostlin (Pozdíšek, 2008).

Neutrálně detergentní vláknina (NDF) má tvořit největší část z celkové vlákniny, a to 28 – 31 % ze sušiny krmné dávky. Její obsah pod 28 % snižuje tvorbu kyseliny octové. Zápornou vlastností jsou její nadýmavé účinky (Pařilová, 2007). NDF udává obsah ADF a hemicelulózy. Je tak nejpřesnějším ukazatelem celkového obsahu vlákniny, resp. stavebních složek buněčných stěn rostlin (Pozdíšek, 2008).

Tabulka 3: Obsah NL a vlákniny v jetelovinách a TTP (Převzato z: Drevjany, 2004)

	Obsah NL (g/kg sušiny)	Obsah vlákniny (%)
Siláž vojtěšky	193 – 215	26,4 – 29,8
Siláž jetele lučního	165 – 161	22,0 – 26,2
Jetelotrávy	136 – 167	26,6 – 29,8
TTP	126 – 144	26,4 – 28,0

3.3 Klostridie

Klostridie spadají do skupiny fakultativně anaerobních bakterií. Vnějšímu prostředí odolávají přechodem z vegetativní fáze do endospory a zpět. V aerobním prostředí dokáží přežít měsíce až roky. Vyskytují se v půdě, v těle zvířat i člověka a v průběhu sezóny jsou

přítomny také na pastvě. Buňky produkují toxiny různého charakteru (hemolytické, letální, nekrotizující).

Klostridie řadíme do čtyř kategorií:

- I. histotoxické
- II. enteropatogenní
- III. enterotoxemické
- IV. neurotoxické

U zvířat způsobují řadu onemocnění, např. černá noha a maligní edém u skotu a ovcí, myonekrózu, plynovou gangrénu, myositidu a další. Jejich výskyt lze prokázat otiskem střeva na podložní sklíčko, kultivací a pomocí techniky PCR (Sekaninová, 2012).

3.3.1 Histotoxické klostridie

Mezi histotoxické klostridie řadíme druhy *Clostridium perfringens*, *C. chauvoei*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. sordellii* a další. Běžně se vyskytují v půdě s dobrým obsahem humusu, dále také ve střevech zvířat.

Jejich společnými rysy jsou vstup do tkáně následně po traumatu, množení v místě s produkcí toxinů a výskyt extenzivního poškození tkáně.

Mohou u skotu vyvolat maligní edém a plynovou gangrénu. Tyto exogenní infekce vznikají zanesením klostridiálních spor do rány.

Endogenní infekce jako jsou černá noha, infekční nekrotická hepatitida a bacilární hemoglobinurie vznikají aktivací dormantních spor ve svalech nebo játrech.

Histotoxické klostridie můžeme diagnostikovat pomocí odběru materiálu z poškozené tkáně, anaerobní kultivací a detekcí PCR (Smola, 2011).

3.3.2 Enteropatogenní a enterotoxemické klostridie

Enteropatogenní a enterotoxemické klostridie se dělí ve střevech a produkují toxiny zasahující jak celkově, tak lokálně. Do těchto skupin patří *C. perfringens* typ A, B, C a D (Smola, 2011).

Tabulka 4: Přehled onemocnění způsobující jednotlivé typy *C. perfringens*

Typ	Toxin	Onemocnění
A	Alfa	Enteritida selat Enterotoxémie skotu a ovcí Nekrotická enteritida drůbeže Alimentární intoxikace
B	Alfa Beta Epsilon	Enterotoxémie ovcí Hemoragická enteritida hřbat Hemoragická enteritida, dyzentérie jehňat
C	Alfa Beta	Humánní nekrotická enteritida Nekrotická enteritida a enterotoxémie selat Akutní enterotoxémie dospělých ovcí Nekrotická enteritida jehňat, kůzlat a hřbat
D	Alfa Epsilon	Enterotoxémie jehňat Enterokolitida koz, skotu
E	Alfa Iota	Enteritida skotu Enteritida psů

(Převzato z: Smola, 2011)

3.3.3 Neurotoxické klostridie

Mezi neurotoxické klostridie patří *C. botulinum* a *C. tetani*.

Clostridium botulinum

Produkuje botulotoxin, který je řazen mezi neurotoxiny. Při rozpadu buněk jej uvolňují do prostředí. Jeho tvorba je zastavena pod pH 5,5.

Vyvolává botulismus – alimentární intoxikaci toxinem vytvořeným v potravě. Toxin – botulotoxin – prostupuje k motorickým nervům, což způsobuje obrny svalů a poruchy funkce parasymptiku (Rottenbornová, 2017).

Clostridium tetani

Vyskytuje se v normální mikroflóře ve střevech savců. Způsobuje onemocnění zvané tetanus. Produkuje tetanotoxin, který má tři složky – 1. neurotoxin tetanospasmin, 2. tetralyzin a 3. enzym reninového účinku tetanospasmin.

Tetanotoxin proudí z rány do krve až do CNS, kde zabraňuje motorickým neuronům uvolňovat inhibiční mediátory. Následkem jsou klonické a tonické křeče (Rottenbornová, 2017).

3.3.4 Klostridie ve vztahu k biogenním aminům

Klostridie nebo také bakterie máselného kvašení jsou největšími producenty kyseliny máselné a oxidu uhličitého v silážích. Spory jsou odolné vůči relativnímu pH, teplotě, záření, dezinfekci, kyslíku a trávicím šťávám. Výskyt klostridií v siláži způsobuje zhoršení kvality siláže. Proteolytickou aktivitou klostridií dochází k degradaci rostlinných bílkovin na toxické produkty – kyselinu máselnou, amoniak a biogenní aminy. Klostridiální činnost vede ke vzniku biogenních aminů. Výskytem desetin procenta obsahu biogenních aminů v siláži dochází ke zhoršenému příjmu krmiva a zdravotním problémům (Doležal, 2012).

Vznik aminů dekarboxylací aminokyselin:

Monoaminy:

Tyroxin → Tyramin + CO₂

Fenylalanin → 2-fenylethylamin + CO₂

Tryptofan → Tryptamin + CO₂

Histidin → Histamin + CO₂

Diaminy:

Lyzin → Putrescin + CO₂

Ornitin → Kadaverin + CO₂

(Doležal, 2012)

3.4 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení mohou fermentovat živiny za vzniku kyseliny mléčné. Jsou heterogenní skupinou mikroorganismů. Řadí se do skupiny grampozitivních, aerotolerantních nebo anaerobních bakterií, acidotolerantních a nesporulujících (Klaenhammer a kol., 2005).

V současnosti jsou řazeny do skupiny bakterií mléčného kvašení rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Rod *Bifidobacterium*, který patří do vývojové větve aktinomycet je řazen mezi bakterie mléčného kvašení díky fenotypické podobnosti (Stiles a Holzapfel 1997).

Z biochemického hlediska se do skupiny bakterií mléčného kvašení řadí homofermentativní (např. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé laktobacily) i heterofermentativní druhy (např. *Leuconostoc*, *Weissella* a některé laktobacily).

Homofermentativní druhy tvoří primárně kyselinu mléčnou. Heterofermentativní druhy tvoří určité množství kyseliny mléčné, oxidu uhličitého a etanolu.

Bakterie mléčného kvašení se řadí mezi mezofilní organismy. Avšak mohou prosperovat při teplotách nižších než 5 °C a vyšších než 45 °C. většina druhů bakterií mléčného kvašení roste při pH 4,0 – 4,5. Některým však vyhovuje pH 9,6, jiným zase pH 3,2 (Caplice a Fitzgerald 1999).

Homofermentativní rody *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Pediococcus* patří mezi žádané mléčné bakterie, účastníci se silážové fermentace. V siláži jsou tyto bakterie přítomny především na začátku fermentačního procesu, protože v siláži není příliš vysoká koncentrace kyseliny mléčné. Druhy *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus brevis* mohou nahradit homofermentativní rody v pozdních stádiích fermentace, protože tolerují nízké pH (Kotrsová, 2016).

3.5 Kvasinky

Kvasinky řadíme mezi vřecovýtrusé houby (Kocková-Kratochvílová, 1982). Jedná se o eukaryotní, fakultativně anaerobní, chemoheterotrofní mikroorganismy získávající energii oxidací organických sloučenin. V silážích se nachází především rody *Candida*, *Hansenula*,

Sacharomyces a Torulopsis. V anaerobních podmínkách způsobují alkoholové kvašení (Vaculíková, 2012).

Kvasinky se přímo nepodílejí na přeměnách nutričně a hygienicky významných látek. Zvýšená činnost kvasinek je vždy spojena s aerobní nestabilitou siláží po otevření sila a také s vysokými ztrátami živin. Kvasinky rodů *Candia a Hasnula*, využívají a metabolizují vytvořenou mléčnou a octovou kyselinu, ale i některé zbytkové cukry – rod *Torulopsis*.

Silné pomnožení kvasinek podněcuje samozáhřev a odkyselení již hotových siláží. Takováto siláž může u skotu vyvolat výrazné, mnohdy až krvavé průjmy.

Siláže bez obsahu kyseliny máselné jsou stabilní a rezistentní ke kvasinkám, jestliže obsahují víc jak 0,5 % kyseliny octové z hmotnosti siláže (Dvořáčková, 2010).

3.6 Plísně

Plísně (mikromycety) řadíme do skupiny obligátně aerobních eukaryotních organismů (Rada, 2009). V silážích a krmivech představují závažný nutričně-zdravotní problém (Vaculíková, 2012). Jejich růst je tedy silně omezený na povrchovou vrstvu, zvláště pokud je siláž nedokonale přikryta fólií. Množí se také během aerobního kažení. Mezi hlavní rody se řadí *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia*, *Artrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis a Trichoderma* (Rada, 2009).

Plísně přeměňují cukry a kyselinu mléčnou na oxid uhličitý a vodu čímž způsobují v siláži ztráty živin, zhoršují chutnost a produkují mykotoxiny (Rada, 2009). Podílí se na aerobní degradaci siláže. Mimo ztrát živin jsou plísně nebezpečné tvorbou spor, především pak tvorbou mykotoxinů (Vaculíková, 2012).

Pokud se uváží požadavky plísni na kyslík, je všeobecně známo, že podmínkou prevence je důkladné udusání a rychlé anaerobní uzavření sila (Vaculíková, 2012).

Doležal a kol (2009) uvádí: „Je potvrzeno, že při viditelném zaplesnivění krmiv skladovými plísněmi (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*), dochází k výrazné kontaminaci krmiva s vysokou produkcí spor pohybující se řádově v milionech v 1 g krmiva. Taková krmiva nelze zkrmovat zvířatům. Diagnostika plísňových spor v krmivech v množství statisíce (10⁵ na 1 g) představuje nejen zhoršení organoleptických vlastností, ale také

snížení výživné hodnoty krmiv. Je třeba zdůraznit, že nebyla prokázána souvislost mezi produkcí spor plísní a potenciální produkcí mykotoxinů, i když Winther et al. (1981) předpokládá, že při vyšším výskytu plísní lze očekávat také nález toxinogenních druhů hub.“

Na přítomnost mykotoxinů v krmné dávce jsou nejvímavější prasata. U skotu se s intoxikací mykotoxiny téměř nesetkáváme, protože pufrční schopnost a bachorová aktivita mikroflóry má schopnost redukovat a tolerovat i vyšší hladiny mykotoxinů, zejména zearalenonu a ochratoxinu. I tak se uvádí, že aflatoxiny snižují u přežvýkavců v bachoru produkci těkavých mastných kyselin, což má negativní vliv na produkci mléka a využití krmiva. To je zapříčiněno poruchou metabolismu lipidů, inhibicí proteosyntézy. Zvyšují aborty, výhřezy rekta, u telat vedou k anorexii, zpomalení růstu a průjmům (Vaculíková, 2012).

3.7 Eliminace biogenních aminů

Vysoce kvalitní siláž je závislá na vývoji příznivé mikroflóry za anaerobních podmínek. Mikroorganismy v siláži jsou v širším slova smyslu nežádoucí patogenní mikroorganismy (bakterie, paraziti), mikroorganismy působící sekundární kvašení (klostridie, koliformní bakterie), mikroorganismy odpovědné za aerobní kažení (kvasinky, plísně, bacily), producenti toxinů (plísně, bakterie) a organismy působící potíže při zpracování mléka (klostridie).

Vysoce kvalitní krmivo a správná výživa jsou důležité pro všechny kategorie hospodářských zvířat. Vysoké hladiny biogenních aminů jsou často pozorovány v silážích připravených z vysoce proteinových krmiv (vojtěška, jetel, určité druhy trav), (Mlejnková a kol., 2016).

Do silážované suroviny je vhodné vložit specifické přísady, které vyrovnávají chybějící faktory pro silážování (BMK, zkvasitelné cukry), nebo zabraňují zkažení siláže (konzervační látky), (Tyrolová, Výborná, 2010).

3.7.1 Bakteriální inokulanty

Obsahují bakterie mléčného kvašení. K řízenému posílení žádoucí mikroflóry slouží bakterie mléčného kvašení dodané do silážované hmoty. Fermentační proces se zrychlí a zachová se více živin. Dříve se používaly silážní inokulanty, které obsahovaly jen bakterie s homofermentativním kvašením, které jako hlavní produkt vytvářejí kyselinu mléčnou. Bakterie s heterofermentativním kvašením, které vytváří, kromě kyseliny mléčné také kyselinu octovou se začaly používat před několika lety. Kyselina octová má pozitivní vliv na zvýšení aerobní stability siláží po jejím provzdušnění.

Biologické přípravky se používají jako tekuté nebo granulované. Pozitivem tekutých přípravků je převážně rovnoměrná aplikace na silážovanou hmotu. Jako negativum lze uvést omezenou dobu skladovatelnosti. Roztok se musí spotřebovat do určité doby, jinak dochází ke snížení až ztrátě aktivity bakterií. Přípravky granulované se nedoporučuje aplikovat při silážování do obalovaných balíků a při sušině vyšší než 45 %, kdy hrozí vysoké ztráty aditiva. Inokulanty, obsahující jen bakterie mléčného kvašení, jsou určeny především pro píce s dostatečným obsahem cukrů – snadno silážovatelné. U pícnin s nízkým obsahem cukrů je nutné použít aditiva obsahující také enzymy. Většina bakteriálních a bakteriálně-enzymatických aditiv obsahuje několik druhů a kmenů bakterií. Některé prokvašují cukry na kyselinu mléčnou od prvních chvíle po naplnění silážního prostoru – jejich aktivita je možná od pH 6. Odlišným druhům bakterií vyhovuje lépe kyselejší prostředí, přičemž jejich aktivita roste postupně se snižující se hodnotou pH. Bakterie mléčného kvašení v silážních aditivech se navzájem doplňují (Tyrolová a Výborná, 2010).

Přídavek heterofermentativních bakterií mléčného kvašení nemá významný vliv na živinové ukazatele siláží (McEniry a kol., 2014). Heterofermentativní kmeny laktobacilů jsou charakteristické svými antimikrobiálními účinky. Konkrétně bakterie *Lactobacillus plantarum* vykazují značně fungicidní aktivitu. Toto zjištění zvyšuje možnost, že vyšší hustota heterofermentativních kmenů LAB s potenciálními probiotickými vlastnostmi by mohla mít pozitivní vliv na výslednou kvalitu konzervovaných krmiv (Arasu a kol., 2014). Při ošetření homofermentativními a heterofermentativními laktobacily je dosahováno výrazně lepší aerobní stability. Aditivní aplikace kmenů laktobacilů snižuje pH, obsah kyseliny máselné, alkoholu a amoniaku (Jatkauskas a kol., 2013).

3.7.2 Bakteriálně-enzymatická aditiva

Mikrobiálně – enzymatická aditiva používaná v zemědělství se jeví jako perspektivní (Doležal a kol., 2010). Mezi jejich důležité vlastnosti patří aktivita a stabilita (Loučka a kol., 1997). Enzymy štěpí buněčné stěny, celulózu a hemicelulózu, a tím napomáhají fermentaci, mají vliv na kvalitu siláže a obsah energie. Uvolňují lehce rozpustné sacharidy pro činnost mléčných bakterií a účastní se snižování hodnoty pH (Doležal a kol., 2010).

Mezi enzymy obsahující mikrobiálně – enzymatická aditiva řadíme např. celulózy, hemicelulózy, glukoso-oxidázy, pektinázy, amylázy a další. Všechny uvedené enzymy musí dokázat hydrolyzovat sacharidy v rozmezí hodnot pH od 4,3 do 6. Pro správnou funkci enzymů je nutné také zabezpečit dostatečnou vlhkost prostředí, a proto se uplatňují zejména při silážování pícnin s obsahem sušiny pod 40 % (Doležal a kol., 2010).

3.7.3 Chemické konzervanty

Chemické konzervanty slouží k okamžitému okyselení hmoty a potlačení nežádoucích mikroorganismů. Největší uplatnění našly při silážování plodin o nízké sušině (do 28 %). Vhodné jsou pro středně a obtížně silážovatelné pícniny, u kterých nebyla možnost zavadnutí z důvodu nepříznivých podmínek.

Tlumí růst nežádoucích bakterií, kvasinek a plísní. Zabezpečují větší aerobní stabilitu siláže. Nachází významné uplatnění i při ošetřování povrchu silážované hmoty. Pokud nastane přerušení silážování, pak je dobré poslední vrstvu ošetřit chemickým konzervantem. Chemické konzervanty jsou také vhodné při zkrmování siláže v teplém letním období, kdy jsou siláže aerobně nestálé (Tyrolová a Výborná, 2010).

Tyrolová a Výborná (2010) uvádí: „Chemické přípravky obsahují hlavně kyselinu mravenčí, propionovou a jejich soli. Největší antimykotickou aktivitu vykazuje kyselina propionová. Kyselina mravenčí konzervuje hmotu tím, že ji okyselí a potlačí nežádoucí skupiny bakterií. Při manipulaci s touto kyselinou je třeba dbát bezpečnostních předpisů, protože leptá kůži, pronikavě čpí. Kvasinky a plísně však nepotlačuje. Kyselina mravenčí se užívá především pro silážování objemných krmiv a kyselina propionová na krmiva jadrná (konzervace vlhkého zrna). Dále kyselina propionová zabraňuje rozvoji plísní a kvasinek při vybírání otevřené siláže.“

Použití chemických přípravků na bázi organických kyselin, zejména těch, které mají větší množství kyseliny mravenčí, pozitivně ovlivňuje obsah dusíkatých látek ve vojtěškových silážích. Kyselina mravenčí napomáhá lepší konzervaci a zachování obsahu peptidů, zejména těch s více aminokyselinovými zbytky (Ding a kol., 2013).

3.7.4 Možnosti ošetření vojtěškové siláže na výskyt biogenních aminů

Komerčně dostupné silážní inokulanty pro konzervaci vojtěšky obsahují širší spektrum homofermentativních i heterofermentativních bakterií mléčného kvašení.

Obsahují jeden nebo více kmenů laktobacilů. Ty jsou často kombinovány s mléčnými koky. Nejčastěji obsaženým je jednoznačně *L. plantarum*. Dále jsou aplikované druhy *L. casei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, a *L. rhamnosus*, výjimečně jsou používány *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. collinoides* nebo *L. cellosbiousus*. Laktobacily jsou nejčastěji kombinovány s *E. faecium* nebo *P. pentosaceus*, méně často s *L. lactis* a *P. acidilactici*, mimořádně s *P. freudenreichii*. Mimo bakterií obsahují přípravky pro konzervaci vojtěšky obvykle také enzymy, štěpící rostlinné polysacharidy a zpřístupňující cukry pro bakteriální kultury. Jde převážně o celulázy, pektinázy, hemicelulázy a xylanázy (Rada, Vlková, 2010).

4 MATERIÁL A METODIKA

Pokusný materiál byl získán z Výzkumného ústavu pícninářského v Troubsku. V modelovém pokusu byla použita vojtěška setá (*Medicago sativa*, var. *Pálava*), která byla získána z první seče z pokusných parcel.

Vojtěška setá byla sklizena ve fázi butonizace a krátce zavadnuta (6 hodin) na výslednou sušinu 35 %. Následně byl založen modelový pokus, kde sledovaným faktorem byl přídavek biologického i chemického silážního aditiva a jejich vliv na mikroflóru siláží. V pokusu byla použita kontrolní varianta – skupina K (s přídavkem ekvivalentního množství pitné vody pro zachování stejné sušiny), biologické silážní aditivum – skupina B (v dávce 20 g/t) a chemický konzervační prostředek – skupina CH (2 l/t).

Biologické silážní aditivum obsahovalo bakterie mléčného kvašení *Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22502/NCIMB 11181) a enzym xylanáza EC 3.2.1.8.

Složení chemického silážního aditiva bylo v poměru 43 % kyseliny mravenčí, 30 % mravenčanu amonného, 10 % kyseliny propionové a 2 % kyseliny benzoové. Každá varianta (K, B, CH) byla vyhotovena ve třech opakováních. Celkem bylo připraveno 9 variant siláží.

Takto ošetřená hmota o hmotnosti 8 kg byla udusána, zatížena závažím a anaerobně uzavřena víkem. Modelové siláže byly po dobu 3 měsíců uskladněny v laboratoři o průměrné laboratorní teplotě 20 – 25 °C. Po otevření silážních nádob byly nádoby zváženy a z každé varianty byl odebrán reprezentativní vzorek pro stanovení obsahu sušiny, fermentačního procesu, obsahu živin, biogenních aminů a mikrobiologickou analýzu.

4.1 Pokusné parcely

Všechny pokusné parcely se nacházely v Troubsku. Vojtěška setá byla vypěstována v řepářské výrobní oblasti v nadmořské výšce 270 m n. m. Převažujícím půdním typem je

zde degradovaná hnědozem. Se zrnitostním složením jsou hlinité až jílovitě hlinité. Pokusné parcely byly průběžně přihnojovány jemně mletým vápencem ($0 - 20 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$).

4.2 Mikrobiologie

Navážka dvacet gramů vzorku byla 15 minut třepána na třepačce (Heidolph Promax 1020, Německo) společně se 180 ml fyziologického roztoku. Následně byla připravena řada desetinného ředění a 1 ml z příslušného ředění byl inokulován do Petriho misky a zalit živným médiem.

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) byl použit jako kultivační médium PCA agar (Biokar Diagnostics, Francie), inkubace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin. Pro počet bakterií mléčného kvašení (BMK) byl použit MRS agar (Biokar Diagnostics, Francie), inkubace probíhala 72 h při 30 °C. Pro stanovení kvasinek a plísní byl použit Chloramphenicol Glucose Agar (Biokar Diagnostics, Francie), inkubace probíhala 120 h při 25 °C.

Ke stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byl použit VRBG agar (Biokar Diagnostics, Francie), inkubace probíhala 24 h při 37 °C. Po inkubaci z Petriho misek byly odečteny narostlé kolonie a výsledky analýz byly vyjádřeny v CFU na gram siláže.

4.3 Příprava vodního výluhu pro stanovení ukazatelů fermentace:

Vzorek siláží o hmotnosti 50 g byl zalit 450 ml destilované vody. Po 24 hodinách byl výluh zfiltrován přes filtrační papír (FILTRAK 388) a podroben analýze.

Analýza živin

Stanovení obsahu popelovin bylo stanoveno vážkově jako zbytek hmoty vzorku po jeho zpopelnění do konstantní hmotnosti při 550 °C za předepsaných podmínek.

Tuk se stanovoval vážkově přímou extrakcí vzorku petroléterem na extrakčním přístroji podle Soxhleta.

Stanovení dusíkatých látek probíhalo metodou dle Kjeldala (N*6,25), měření probíhalo na přístroji Kjeltec 2300, Švédsko. Při přepočtu bylo použito koeficientu 6,25.

Stanovení ADF, NDF a vlákniny proběhlo na přístroji Fiber Analyzer (ANKOM 220, USA).

Při analýze obsahu vlákniny ve vzorcích byla použita dvoustupňová hydrolyza ve vroucím roztoku kyseliny sírové, resp. hydroxidu draselného, včetně odpočtu obsahu popelovin ve zbytku vzorku. Obsah NDF a ADF byl zjištěn pomocí detergentů, v případě NDF bylo jako detergentu použito laurylsulfátu sodného, v případě ADF cetyltrimethylamonium bromidu (AOAC, 1990).

4.4 Stanovení biogenních aminů

Příprava vzorků pro stanovení biogenních aminů

Ze vzorků siláží z vojtěšky seté (*Medicago sativa*) bylo naváženo 300 mg. Navážené vzorky byly přesunuty do třecí misky, kde došlo k rozrušení působením tekutého dusíku (tekutý dusík byl přilít k vojtěšce seté v třecí misce a roztírán tloučkem po dobu přibližně 2 minut) a následné homogenizaci s 2 ml deionizované miliQ vody. Následovala inkubace vzorku při 25 °C, 300 rpm, po dobu 60 minut na termomixu (Termomixer comfort, Eppendorf). Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 4 °C, 25 000 g, po dobu 10 minut (Centrifuga 5417R, Eppendorf). Po vyjmutí z centrifugy bylo provedeno odebrání supernatantu a následovala jeho opětovná centrifugace (4 °C, 25 000 g, 10 minut). Došlo k odebrání supernatantu a takto připravený vzorek byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie.

Stanovení biogenních aminů

Pro stanovení biogenních aminů bylo použito iontoměničové kapalinové chromatografie, AAA 400. Tento systém byl složen ze skleněné chromatografické kolony a ocelové předklony, dvou chromatografických čerpadel pro proudění elučních pufrů a deprivatizačního činidla, chlazeného „kolotoče“ na 25 eppendorfových zkumavek, dávkovacího ventilu, tepelného reaktoru, Vis detektoru a chladicí komory pro deprivatizaci činidla.

Objem vstříkovaného vzorku byl 100 µl, s přesností aplikace RDS 1 %. Použit byl dvoukanálový Vis detektor s 5 µl průtočného množství kvety, pracující při vlnových

délkách 440 a 570 nm. Roztok ninhydrinu byl připraven ze 75 % methylcellosoly (v/v) a 25 % 4 M kyselého pufru (v/v). Jako redukční činidlo byl použit chlorid cínu.

Připravený roztok ninhydrinu byl uložen pod inertní atmosférou (N₂) pro zchlazení na teplotu 4 °C. Průtok byl 0,25 ml.min⁻¹, při tlaku v rozmezí od 4,5 do 6,0 MPa. Teplota v reaktoru byla nastavena na 120 °C.

Pro eluci byly použity dva pufrů – pufr A byl složen z 5,5 mM C₆H₈O₇, 81 mM Na₃C₆H₅O₇, 257 mM NaCl a 10 ml 50% roztoku hydroxidu draselného (w/w) na 1 l MiliQ vody. Konečné pH bylo 5,78. Pufr B sestával z 73 mM C₆H₈O₇, 3 M NaCl a 10 ml 50% roztoku hydroxidu draselného (w/w) a 1 l MiliQ vody. Konečné pH pufru B bylo 3,27.

Pro měření pH byl použit WTW inoLab pH metr.

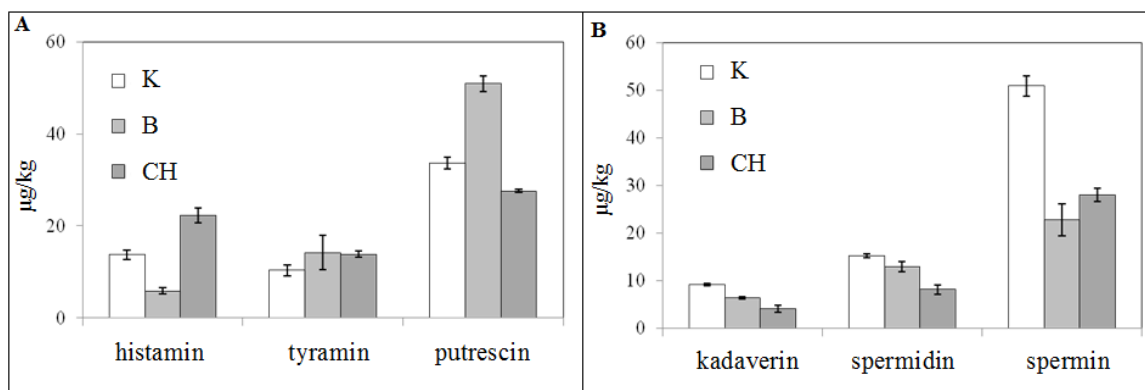
4.5 Statistika

Údaje byly zpracovány statisticky pomocí STATISTICA.CZ, verze 10.0. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní odchylka (SD). Statistická významnost byla stanovena zkoumáním základních rozdílů mezi skupinami pomocí ANOVA a Scheffeho testu (jednofaktorová analýza) pro parametry: histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, kyselina mléčná, kyselina octová, etanol, amoniak, popeloviny, bílkoviny, tuk, vláknina, ADF, NDF, plísně, kvasinky, bakterie mléčného kvašení, celkový počet mikroorganismů. Rozdíly s P < 0,05 byly považovány za významné.

5 VÝSLEDKY

V experimentu byly sledovány hladiny biogenních aminů, kvasných kyselin, živinové složení a mikrobiologické ukazatele u vojtěškové siláže v závislosti na rozdílném ošetření silážní hmoty biologickým nebo chemickým silážním aditivem.

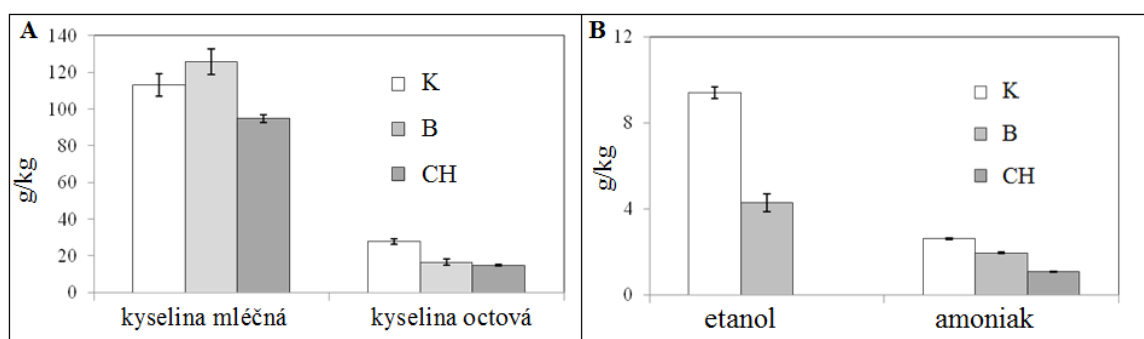
Při hodnocení histaminu byl sledován pokles u skupiny B o 57 % ($P < 0,05$). Skupina vojtěškových siláží CH měla naopak vyšší hladinu histaminu o 63 % ($P < 0,05$). Tyramin byl vyšší u skupin B i CH o 37 resp. 34 %. Biogenní amin putrescin byl v nejvyšší koncentraci sledován u skupiny B. Nárůst v porovnání s kontrolní skupinou činil 51 % ($P < 0,05$). U skupiny CH byl pozorován pokles putrescinu o 18 % ($P < 0,05$). Hodnoty histaminu; tyraminu a putrescinu jsou znázorněny v grafu 1A. Obsah kadaverinu byl nižší u skupiny B i CH o 29 % ($P < 0,05$) resp. 55 % ($P < 0,05$). Obdobný výskyt byl sledován u spermidinu. Skupina B měla koncentraci spermidinu o 15 % nižší ($P < 0,05$). U skupiny CH byl pokles spermidinu ještě výraznější (o 47 %; $P < 0,05$). Spermin byl průkazně snížen u skupiny B i CH o 55 % ($P < 0,05$) resp. o 45 % ($P < 0,05$). Hodnoty kadaverinu; sperminu a spermidinu jsou znázorněny v grafu 1B.



Graf 1: Vliv biologického a chemického ošetření na výskyt histaminu; tyraminu a putrescinu (A); kadaverinu, spermidinu a sperminu (B).

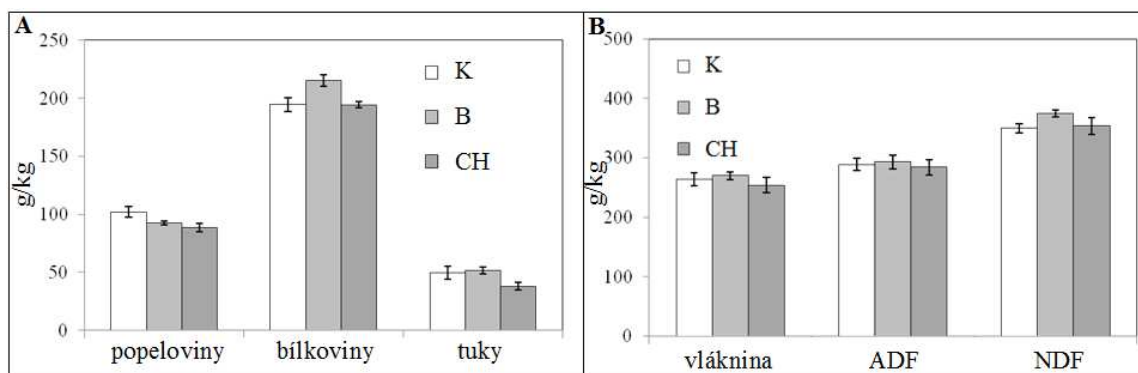
Dalším sledovaným parametrem u modelových siláží vojtěšky seté byly fermentační produkty. Hodnoty pH se pohybovaly od 4,37 – 4,96. S přidavkem silážních aditiv se pH statisticky průkazně snížilo ($P < 0,05$) u B o 11,7 % a CH o 11,9 %. Nejvyšší zastoupení

kyseliny mléčné, která je žádoucí pro úspěšnou fermentaci, bylo u skupiny B o 11 % ($P < 0,05$). Druhá pokusná skupina CH měla hladinu kyseliny mléčné o 16 % nižší ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou. Rovněž i kyselina octová byla nižší u obou experimentálních skupin, u skupiny B o 40 % ($P < 0,05$) a skupiny CH o 46 % ($P < 0,05$). Hodnoty kyseliny mléčné a octové jsou znázorněny v grafu 2A. Etanol byl snížen u skupiny B o 55 % ($P < 0,05$). Koncentrace etanolu byla u skupiny CH pod hranicí detekce. Hodnoty amoniaku byly signifikantně sníženy u skupiny B o 25 % ($P < 0,05$) a u skupiny CH o 59 % ($P < 0,05$). Hodnoty etanolu a amoniaku jsou znázorněny v grafu 2B.



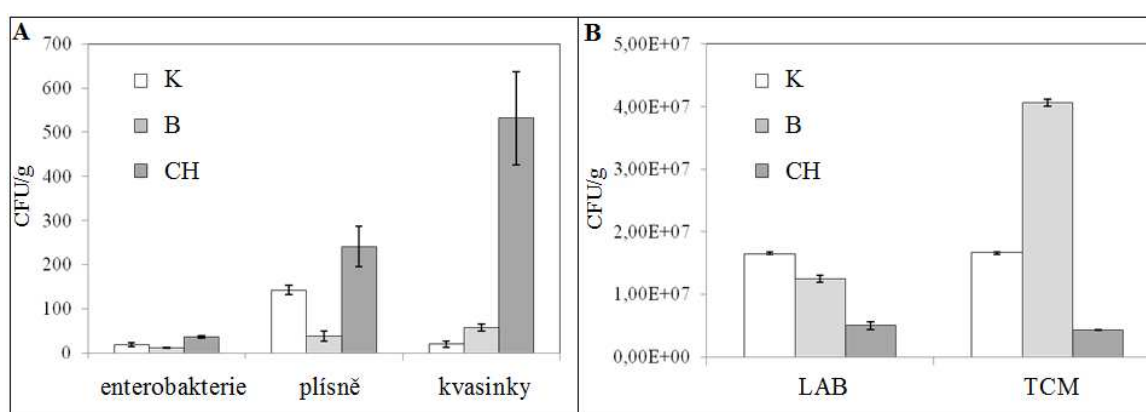
Graf 2: Vliv biologického a chemického ošetření na množství kyseliny mléčné, kyseliny octové (A); ethanolu, amoniaku (B).

Při hodnocení živinového složení v siláži vojtěšky byl pozorován u skupiny B pokles popelovin o 9 % ($P < 0,05$). U druhé pokusné skupiny CH činil pokles popelovin 13 % ($P < 0,05$). Množství proteinu bylo signifikantně zvýšeno u skupiny B o 11% ($P < 0,05$). Skupina CH měla prakticky stejné hodnoty proteinu jako kontrolní skupina bez ošetření. Množství tuku u skupiny B nebylo průkazně ovlivněno. U skupiny CH byl sledován pokles tuku o 24 % ($P < 0,05$). Hodnoty popelovin, proteinu a tuku jsou patrné z grafu 3A. Při hodnocení vlákniny nebyly sledovány u žádné z pokusných skupin průkazné rozdíly v celkové vláknině ani ADF a NDF (graf 3B).



Graf 3: Vliv biologického a chemického ošetření na množství popelovin, bílkovin, tuků (A); vlákniny, ADF, NDF (B).

Dále bylo hodnoceno celkové množství mikroorganismů v silážích vojtěšky. Počty enterobakterií se nepatrně zvýšily po ošetření siláží silážními aditivy. Plísně byly signifikantně sníženy u skupiny B o 73 % ($P < 0,05$). Skupina CH se nepatrně lišila od kontrolní skupiny. Hodnoty enterobakterií, plísni a kvasinek jsou patrné z grafu 4A. Při vyhodnocení počtu bakterií mléčného kvašení bylo zaznamenáno u skupiny CH jejich snížení o 70 % ($P < 0,05$). Nepatrné snížení bakterií mléčného kvašení bylo zaznamenáno u skupiny B. Celkový počet mikroorganismů byl nejvyšší u skupiny B o 143 % ($P < 0,05$). Což je způsobeno tím, že do CPM se promítají nejen nežádoucí mikroorganismy, ale i žádoucí, jako jsou BMK. U skupiny CH došlo ke snížení o 74 % ($P < 0,05$).



Graf 4: Vliv biologického a chemického ošetření na mikrobiologické ukazatele vojtěškových siláží enterobakterie, plísně, kvasinky (A), bakterie mléčného kvašení (LAB), celkový počet mikroorganismů (TCM) – (B)

6 DISKUZE

Biogenní aminy představují jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů ve výživě vysokoužitkových dojnic. Při použití chemického silážního inokulantu Chemisile (2.5 l/tunu) sledoval Selwet a kol. (2013) u vojtěškových siláží snížení biogenních aminů. Histamin byl snížen o 50 %, putrescin o 17 %, kadaverin o 33 %, a tyramin o 21 %. V porovnání s kontrolní skupinou siláží, která byla bez ošetření.

V našem sledování byl pozorován obdobný efekt chemického ošetření. Průkazně došlo ke snížení putrescinu a kadaverinu. Použití dvou biologických silážních inokulantů (*L. casei* – 10^6 CFU/g a *L. buchneri* – 10^6 CFU/g) při silážování kukuřice mělo významný vliv na snížení biogenních aminů v siláži kukuřice. *L. casei* snížil výskyt histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu. *L. buchneri* snížil pouze výskyt putrescinu a histaminu (Nishino et al., 2007). V našem sledování byl naproti těmto výsledkům výskyt histaminu nejvyšší u biologického ošetření. Jako účinnější z hlediska eliminace biogenních aminů se podle našich výsledků zdá být chemické ošetření.

K obdobným závěrům došel i tým autorů Steidlova a kol. (2004). Biologický silážní inokulant (Microsil) signifikantně potlačil výskyt tyraminu a putrescinu. Při použití chemického silážního aditiva na bázi kyseliny mravenčí, mravenčanu amonného, kyseliny propionové a kyseliny benzoové byl výskyt hlavních biogenních aminů pod hranicí detekce.

Holzer, Mayrhuber a kol. (2003) potvrzují důležitost BMK zejména v první fázi fermentace, kdy dochází ke snížení pH a tvorbě kyseliny mléčné, což má za následek konzervační účinky před působením nežádoucích mikroorganismů (kvasinek, plísní, klostridií, enterobakterií). Doležal a kol. (2006) uvádí, že čím vyšší obsah BMK, tím je usnadněn proces primární fermentace. Pang a kol. (2011) se shoduje se stejným množstvím BMK (v řádu 10^7 CFU/g) v silážích vojtěšky seté u varianty B.

V současné době nejsou v České republice zavedeny přípustné limity na množství plísní a kvasinek. Avšak dle Zemana a kol. (2006) by měly maximální počty kvasinek být do 10^4 CFU/g. Se stejnými hodnotami se shoduje i Doležal a kol. (2012). Nejvyšší počty kvasinek i plísní u všech pokusných variant dosahovaly maximálních hodnot 10^2 CFU/g.

Vzorky pokusných siláží nebyly viditelně zaplísněny. Mudřík a kol. (2006) společně se Zemanem a kol. (2006) považují za vyhovující limit pro plísň do 10^5 CFU/g. Počty kvasinek i plísni vyhovují uvedeným limitům.

Wilkinson (2005) uvádí, že při vyšší koncentraci plísni lze očekávat výskyt toxinogenních druhů hub. Z výsledků vyplývá, že počet kvasinek byl v pokusu nejvyšší u modelových silážích ošetřených chemickým silážním aditivem, avšak etanol kvasinky nevytvářely. Důvodem může být, že kvasinky ke svému metabolismu využily organické kyseliny obsažené v chemickém silážním aditivu. Janderová a kol. (1999) uvádí, že kvasinky mohou využívat jako zdroj uhlíku etanol, laktát, glycerol, pyruvát nebo acetát. Lze tedy konstatovat, že vzorky siláží z hlediska výskytu plísni a kvasinek odpovídaly hygienické kvalitě siláží.

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou významné zejména z hygienického hlediska. V pokusných silážích se však vyskytovaly v zanedbatelném množství. Sandle a kol. (2014) konstatuje, že často bývají stanovovány jako hygienický indikátor pro fekální znečištění siláží.

Pozitivní vliv biologického silážního aditiva byl zaznamenán u hodnoty pH, která byla nejnižší ze všech variant a hodnoty kyseliny mléčné, která byla nejvyšší vzhledem ke kontrolní variantě a variantě ošetřené chemickým silážním aditivem.

Whiter a kol. (2001) uvádí, že v siláži vojtěšky seté při 30 % sušiny došlo ke zvýšení kyseliny mléčné a snížení pH vzhledem ke kontrolní variantě již po 2 dnech silážování. Filya a kol. (2007) potvrzuje zvýšení množství kyseliny mléčné oproti kontrolní variantě po aplikaci biologického silážního aditiva. Současně i Kaldmäe a kol. (2007) ve své studii popisuje pozitivní vliv biologického silážního aditiva na fermentační proces. Hassanat a kol. (2014) ve svém pokuse se siláží vojtěšky seté o sušiny 34,7 % se prakticky ztotožňuje s hodnotami ADF, NDF, kyselinou mléčnou, kyselinou octovou, nepřítomností kyseliny propionové a máselné s hodnotami uvedenými v našem pokuse. Podobně Coblenz a kol. (2012) ve svém pokuse uvádí u kontrolní varianty podobné hodnoty sušiny (34,2 %), ADF, NDF, popele, dusíkatých látek.

7 ZÁVĚR

V experimentu byly porovnávány dvě formy ošetření vojtěškové siláže (biologická a chemická). Biologické ošetření snížilo výskyt některých biogenních aminů (kadaverinu, histaminu, spermidinu, sperminu), kvasných produktů (kyseliny octové, ethanolu, amoniaku), popelovin a z hlediska mikrobiologické analýzy se snížil počet plísni a enterobakterií. Dále došlo ke zvýšení obsahu putrescinu a kyseliny mléčné. Chemický přípravek snížil výskyt biogenních aminů (putrescin, kadaverin, spermidin, spermin), kvasných produktů (kyseliny mléčné, kyseliny octové, amoniaku), pH, popelovin, tuku a současně byl snížen i celkový počet mikroorganismů. Naopak došlo ke zvýšení histaminu a tyraminu. Přídavek biologického silážního aditiva podpořil fermentační proces. Siláže z vojtěšky seté odpovídaly hygienické kvalitě.

Z výsledků vyplývá, že lze doporučit biologické i chemické aditivum pro dobrý průběh fermentace a zdravotní nezávadnosti vojtěškových siláží. Chemické aditivum má v porovnání s biologickým silážním aditivem vyšší účinnost.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. ABRAMOVITCH, R. A. a D. SHAPIRO. 880. Tryptamines, carbolines, and related compounds. Part II. A convenient synthesis of tryptamines and β -carbolines. *J. Chem. Soc.* 1956, 4589-4592. DOI: 10.1039/JR9560004589. ISSN 0368-1769. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=JR9560004589>
2. ARASU, MV., MW. JUNG, S. ILAVENIL, DH. KIM, HS. PARK, JW. PARK, NA. AL-DHABI a KCH. CHOI. Characterization, phylogenetic affiliation and probiotic properties of high cell density Lactobacillus strains recovered from silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **12**, 2429-2440.
3. ARDÓZ A. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Science a Technology*, 1995, 6: 346.
4. ARLINGTON, VA. Official Methods of Analysis (15th) AOAC. *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. 1990.
5. ARIAS, C., B. OLIETE, L. JIMÉNEZ, LI. PALOP, MD PÉREZ-GUZMÁN a R. ARIAS. Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting Clostridium spp. spore contamination of total mixed ration of Manchega ewe feeding. Determination of risk factors and characterization of Clostridium population. *Small Ruminant Research*. 2016, (139), 39-45.
6. BRÁZDOVÁ, M., Bc. *Biogenní aminy a polyaminy ve vybraných fermentovaných potravinách*. Brno, 2011. Diplomová práce.
7. BUBANCOVÁ, I. *Porovnání systémů normování potřeby sacharidů pro skot*. Brno, 2006.
8. BUŇKOVÁ, L., K. HUDCOVÁ, P. BUDINSKÝ, F. BUŇKA a H. VELICHOVÁ. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékárenské listy*. 2012, (133).
9. CAPLICE E., FITZGERALD G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Mikrobiology*. 1999, 50: 131-149.

10. COBLENTZ, W. K. a R. E. MUCK. Effects of natural and simulated rainfall on indicators of ensilability and nutritive value for wilting alfalfa forages sampled before preservation as silage. *Journal of Dairy Science*. 2012, **95**(11), 6635 - 6653.
11. DING, W., G. XUSHENG a A. KAZUO. Characterization of peptides in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Science Journal*. 2013, **12**, 774-781.
12. DOLEŽAL P. (2006). *Konzervace, skladování a úpravy objemných krmiv*, Mendelova univerzita v Brně, 247 s.
13. DOLEŽAL P. a kol. (2012). *Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat*. Olomouc: Petr Baštan, 2012. ISBN 978-80-87091-33-3.
14. DOLEŽAL, P. a a kol. Nebezpečí v krmivech má hodně podob. *Zemědělec* [online]. 2009 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/nebezpeci-v-krmivech-ma-hodne-podob/>
15. DVOŘÁČKOVÁ, J. *Krmivo: Vojtěšková siláž* [online]. 2011 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/cvicebnice/krmivo.php?krmivo=4
16. DVOŘÁČKOVÁ, J. Význam zdravotní nezávadnosti siláží. *Zemědělec* [online]. 2010 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/vyznam-zdravotni-nezavadnosti-silazi/>
17. FILYA, I., RE. MUCK, CONTRERAS a FE. GOVEA. Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *J. Dairy Sci*. 2007, **90**, 5108 – 5114.
18. HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, LS. SAKARDI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, **5**, 42 - 49.
19. HASSANAT, F., R. GERVAIS a kol. Methane production, nutrient digestion, ruminal fermentation, N balance, and milk production of cows fed timothy silage- or alfalfa silage-based diets. *Journal of Dairy Science*. 2014, **97**(10), 6463 - 6474.
20. HOLZER, M., E. MAYRHUBER, H. DANNER a R. BRAUN. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*. 2003, **21**(6), 282 - 287.

21. HRABĚ, F. et al. Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi. Olomouc: ing. Petr Baštan, 2004. 121 s.
22. JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
23. JANOŠKOVÁ, M.. *Biogenní aminy* Brno, 2010. Bakalářská práce.
24. JATKAUSKAS, J., V. VROTNIAKIENE, C. OHLSSON a B. LUND. The effects of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silages. *Agricultural and food science*. 2013, **1**, 137-144.
25. KALDMÄE, H., A. OLT, M. OTS, O. KÄRT a E. SONGISEPP. Effect of biological additive on fermentation and nutritive value of red clover-timothy silage. *Agraarteadus*. 2007, **18**(1), 9 - 14.
26. KLAENHAMMER, T. R., BARRANGOU, R., BUCK B. L, AZCARATE-PERIL, M. A., ALTERMANN E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS. Microbiology Reviews*. 2005, 29, 393–409.
27. KOTRSOVÁ, V. *Průmyslové využití mléčných bakterií*. Brno, 2016.
28. LARQUÉ, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* 23, 2007, 87-95.
29. MATĚJKOVÁ, K. *Tvorba biogenních aminů v mase vybraných druhů ryb*. České Budějovice, 2013.
30. MCENIRY, J., C. KING, P. O'KIELY a B. LUND. Silage fermentation characteristics of three common grassland species in response to advancing stage of maturity and additive application. *Grass and Forage Science*. 2014, **3**, 393-404.
31. MLEJNKOVÁ, V., P. HORKÝ, M. KOMINKOVÁ, J. SKLÁDANKA, V. ADAM, T. JURIKOVÁ a J. SOCHOR. Biogenic amines and hygienic quality of lucerne silage. *Open Life Sciences*. 2016, **1**(11), 280 - 286.
32. MUDŘÍK, Z., P. DOLEŽAL a P. KOUKAL. *Základy moderní výživy skotu: vědecká monografie zpracovaná v rámci řešení VZ MSM 6046030901*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006. ISBN 80-213-1559-8
33. NISHINO, N., H. HATTORI, H. WADA a E. TOUNO. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 2007, (2), 325-332.

34. PANG, H., G. QIN a kol. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 2011, **34**(3), 235 - 241.
35. PAŘILOVÁ, M. Vlákna a energie v krmné dávce. *Náš chov* [online]. [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <http://naschov.cz/vlakhna-a-energie-v-krmne-davce/>
36. POŠTULKA, R. Zdravotní nezávadnost objemných krmiv. *Zemědělec* [online]. 2011 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/zdravotni-nezavadnost-objemnych-krmiv-2/>
37. POZDÍŠEK, J. *Metodická příručka pro chovatele k výrobě konzervovaných krmiv (siláží) z víceletých pícnin a trvalých travních porostů: metodika*. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2008. ISBN 978-80-87144-06-0.
38. RADA, V. *Siláž a zdraví zvířat*. Praha, 2009.
39. RADA, V. a E. VLKOVÁ. *Silážní inokulanty*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2010. ISBN 978-807-4030-697.
40. ROTTENBORNOVÁ, D. *Lékařská mikrobiologie: Speciální mikrobiologie*. [online]. [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.wz.cz/OVZ-bakteriologie.pdf>
41. SANDLE, T. Biochemical and modern identification techniques Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia Coli. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* C. A. B. L. Tortorello. Oxford, Academic Press, 2014, **21**(6), 232 - 237.
42. SEKANINOVÁ, I. *Klostridiové infekce skotu* [online]. 2012 [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/klostridiove-infekce-skotu/>
43. SELWET, M., M. GALBAS, F. PORZUCEK, M. KOCZOROWSKI a M. POCIEJOWSKA. Effects of the method of alfalfa ensiling on the content of biogenic amines and numbers of some strains of Lactobacillus spp. *Med. Weter.* 2013, (6), 358-362.
44. SILLA SANTOS, MH. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, **29**.
45. SMOLA, J. Klostridiové infekce u skotu. *Klostridiové infekce skotu*. Střítež u Jihlavy, 2011, s. 39.

46. SRP, J. a M. MAREŠ. Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin. Strukturní a funkční diverzita. *Chemické listy* [online]. 2016, **2016**(110), 761-768 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_11_761-768.pdf
47. STEIDLOVA, S. a P. KALAC. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Arch. für Tierer.* 2004, **3**, 245-254.
48. STILES M. E., HOLZAPFEL W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Mikrobiology*. 1997, **36**: 1–29
49. SULLIVANT, A., A. MACKIN, T. PHARR, J. COOLEY, R. WILLS a T. ARCHER. Identification of histamine receptors in the canine gastrointestinal tract. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016, **2016**(182), 29-36.
50. SUZZI, G. A F. GARDINI. Biogenic amines in dry fermented sausages. *International. Journal of Food Microbiology*. 2003, **88**, 41-54.
51. ŠTULÍK, K. a PACÁKOVÁ V. Elektroanalytická měření v proudících kapalinách, SNTL, Praha 1989, str. 252
52. TYROLOVÁ, Y. a A. VÝBORNÁ. *Konzervanty v silážích: certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2010. ISBN 978-807-4030-710.
53. VACULÍKOVÁ, B. *Vliv činnosti kvasinek v silážích a možnosti jejich eliminace*. Brno, 2012.
54. WHITER, A.G., L. KUNG a . The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*. 2001, **84**(10), 2195 - 2202.
55. WILKINSON J. M. (2005). *Silage*. Chalcombe Publications, *Lincoln*, 254 s.
56. ZEMAN, L. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Praha: Profi Press, c2006. ISBN 80-867-2617-7.
57. ZORNÍKOVÁ, G. *Biogenní aminy v potravinách* [online]. 2012 [cit. 2016-10-31]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>

9 SEZNAM ZKRATEK

ADF – acidodetergentní vláknina

BMK (LAB) – bakterie mléčného kvašení

CNS – centrální nervová soustava

CPM – celkový počet mikroorganismů

NDF – neutrálně detergentní vláknina

NL – dusíkaté látky

SD – standardní odchylka

TTP – trvalé travní porosty

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnocení proteolýzy u vojtěškových siláží (Převzato z: Pozdíšek, 2008).....	18
Tabulka 2: Obsah živin ve vojtěšce v absolutní sušině (Převzato z: Sommer a kol., 1994)	21
Tabulka 3: Obsah NL a vlákniny v jetelovinách a TTP (Převzato z: Drevjany, 2004)	23
Tabulka 4: Přehled onemocnění způsobující jednotlivé typy <i>C. perfringens</i>	25
Tabulka 6: Přehled chemických přípravků firmy AgroKonzulta	52
Tabulka 7: Přehled nejčastěji používaných bakteriálních inokulantů	53
Tabulka 8: Srovnání působení jednotlivých druhů mikroorganismů v siláži (Švehlová, 2012).....	54

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik kadaverinu z lysinu (Brázdová, 2011).....	13
Obrázek 2: Vznik tyraminu z tyrosinu (Brázdová, 2011).....	14
Obrázek 3: Vznik fenylethylaminu z fenylalaninu (Brázdová, 2011).....	14
Obrázek 4: Vznik histaminu z histidinu (Brázdová, 2011)	15
Obrázek 5: Vznik tryptaminu z tryptofanu (Brázdová, 2011)	15
Obrázek 6: Vznik polyaminů (Brázdová, 2011).....	16
Obrázek 7: Vznik biogenních aminů (Matějková, 2013)	17

12 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Tabulka 5: Přehled chemických přípravků firmy AgroKonzulta

Tabulka 6: Přehled nejčastěji používaných bakteriálních inokulantů

Tabulka 7: Srovnání působení jednotlivých druhů mikroorganismů v siláži

Tabulka 5: Přehled chemických přípravků firmy AgroKonzulta

Název	Pro konzervaci:	Složení	Dávkování	Zdroj
SilaFor 2 Plus	Těžce a středně silážovatelná píce	Kyselina mravenčí, mravenčan amonný, karamel E 150d a voda	3 – 6 litrů/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaFor NA Plus	Těžce a středně těžce silážovatelné píce	Kyselina mravenčí, mravenčan sodný a voda	3 – 6 litrů/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaFor 2000 Plus	Mačkaného, drceného nebo šrotovaného vlhkého zrna	Kyselina mravenčí, mravenčan amonný, kyselina propionová, kyselina benzoová, karamel E 150d a voda	3 – 6 litrů/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaFor NA	Zavadlých píce při sušině 28 – 45%	Kyselina mravenčí, kyselina propionová, kyselina benzoová, mravenčan sodný, glycerol, barvivo E 150 a voda	3 – 6 litrů/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaPro Mix NC	Produktů dělené sklizně kukuřice - LKS, mačkaného a šrotovaného zrna obilovin, kukuřice a luštěnin	Kyselina mravenčí, kyselina propionová, mravenčan amonný, propionan amonný	3 – 5 kg/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaPro NC	Vlhkého zrna obilovin, kukuřice	Kyselina propionová, propionan amonný	3 – 5 kg/tunu silážované hmoty	www.agrokonzulta.cz
SilaPro PA-99	Celého vlhkého zrna obilovin, kukuřice	Kyselina propionová, 99,5%	Neuvedeno	www.agrokonzulta.cz

Tabulka 6: Přehled nejčastěji používaných bakteriálních inokulantů

Název	Pro konzervaci:	Složení	Dávkování	Zdroj
LACTISIL	ošetření hmoty z celých rostlin kukuřice a bílkovinných píce	Bakteriální kmeny: <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> . Chemická složka: benzoan sodný.	2 - 4 litry základního roztoku na 10 m ²	www.agrokonzulta.cz
MICROSIL	pro kukuřici, celé rostliny obilnin a trav, snadno až mírně obtížně silážovatelné plodiny	Bakteriální druhy: <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> .	250 000 CFU/g ošetřené píče	www.agrokonzulta.cz
SILA-BAC	univerzální přípravek	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 4784, DSM 4785, DSM 4786, DSM 4787 <i>Enterococcus faecium</i> DSM 4788, DSM 4789		http://www.bartakmf.cz/
BACTOZYM	obtížně silážovatelných plodin	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	250 000 CFU/g ošetřené píče	www.agrokonzulta.cz
SILOSOLVE	vojtěška, jetel a další rostliny s nízkým až středním obsahem sušiny	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	250 000 CFU/g ošetřené píče	www.agrokonzulta.cz

Tabulka 7: Srovnání působení jednotlivých druhů mikroorganismů v siláži (Švehlová, 2012)

Mikroorganismy	Odkud se dostanou do siláže	Čím se v siláži živí	Výsledné produkty	Zdravotní problémy
Klostridie	Společně se zeminou	cukry, kyselina mléčná, bílkoviny, aminokyseliny	kyselina máselná, kyselina octová, CO ₂ , H ₂ , aceton, butandiol, aminy a amoniak	Toxické produkty kvašení: amoniak, aminy (hnilobné produkty rozkladu aminokyselin, například putrescin, kadaverin - tzv. mrtvolný jed); botulotoxin - smrtelný jed
Enterobakterie	Společně se zeminou, splašky nebo chlévskou mrvou	cukry	kyselina octová, etanol, CO ₂ a amoniak	Patogenní <i>Escherichie coli</i> : různé toxiny způsobující především střevní potíže
Kvasinky	Povrch rostlin	bez kyslíku: cukry; s kyslíkem: k. mléčná	Bez kyslíku: etanol a CO ₂ ; s kyslíkem: CO ₂ a voda	
Plísně	Při sklizni píce, pomnožení po otevření siláže	cukry, kyselina mléčná	CO ₂ a voda	alergie, mykotoxiny