



Riziko výskytu klostridií v silážích a ve výkalech dojnic
Disertační práce

Vedoucí práce:
prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.

Vypracovala:
Ing. Veronika Mlejnková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: Riziko výskytu klostridií v silážích a ve výkalech dojnic vypracovala 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 ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, 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

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. MVDr. Ing. Petru Doležalovi, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky během zpracování této disertační práce. Současně bych chtěla poděkovat Ing. Liborovi Kalhotkovi, Ph.D. za umožnění mikrobiologických analýz na Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin a za cenné rady při pokusech. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Ing. Janu Dvořáčkovi z S.O.S. Skalice nad Svitavou za pomoc při odběru vzorků z provozních podmínek a analýzy. Poděkování patří i mým kolegům z Ústavu výživy zvířat a pícninářství za objetavost a výpomoc při realizaci pokusů. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu, trpělivost, pochopení a pomoc během mého studia.

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektu IGA AF č. IP 2/2012 „Riziko výskytu klostridií v silážích“ a IGA AF č. TP 2/2011 „Vliv krmných aditiv na metabolismus hospodářských zvířat, využití absorpčních vlastností jílových substrátů v živočišné a rostlinné výrobě“.

ABSTRAKT

Předkládaná disertační práce se zabývá rizikem výskytu klostridií v krmivech, zejména v silážích, ve výkalech dojníc a v podestýlce (separovaná kejda skotu). Současně byl sledován jejich výskyt v bachorové tekutině a v mléce. Hlavním cílem práce bylo posouzení vlivu přídatku povrchové vrstvy půdy s různou úrovní kontaminace (0, 20, 40 g/kg sušiny hmoty) a silážních aditiv na hygienickou kvalitu siláží, zejména na výskyt klostridií a sporulujících mikroorganismů v pokusných modelových silážích a v provozních podmínkách.

Sporulující mikroorganismy byly analyzovány ve všech vzorcích a s přídatkem povrchové vrstvy půdy se jejich počet zvyšoval. *Clostridium perfringens* bylo pomocí PCR potvrzeno v siláži ze zavadlé píče jetele lučního, v bachorové tekutině z provozu A, ve výkalech v obou provozních podmínkách (A, B) a v podestýlce (separátu kejdy) z provozu B. Současně byl potvrzen pozitivní vliv biologického a chemického silážního aditiva na snížení počtu nežádoucích mikroorganismů v silážích.

Klíčová slova: klostridie, sporulující mikroorganismy, siláž, silážní aditiva, PCR

ABSTRACT

The dissertation deals with the risk of clostridia presence in animal feed, particularly in silages, excrements, and in litter (separate of cattle slurry). At the same time, their presence was observed in the rumen fluid and milk. The main objective of the study was to assess the effect of addition of surface layer of soil in different levels of contamination (0, 20, 40 g/kg of dry matter) and addition of silage additives on hygienic quality of silage, especially on the presence of clostridia and on microorganisms forming spores in the experimental model silages and in operating conditions.

Microorganisms forming spores were assessed in all samples. Their counts increased with the higher addition of topsoil. *Clostridium perfringens* was identified using PCR in silage made of wilted clover, in ruminal fluid (the enterprise A), in excrements coming from both operating conditions (A, B), and separate of cattle slurry coming from the enterprise B. At the same time, positive effect of biological and chemical additives on silage reducing the number of undesirable microorganisms was confirmed.

Key words: clostridia, silage, sporing-forming microorganisms, silage additives, PCR

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADF – acidodetergentní vláknina

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

A_w – vodní aktivita

BE – brutto energie

BMK – bakterie mléčného kvašení

BNLV – bezdusíkaté látky výtažkové

bp – base pair = pár bazí

CCM – siláž kukuřičných palic bez listenů

CPM – celkový počet mikroorganismů

ČSN – česká technická norma

DNA – deoxyribonukleová kyseliny

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

gDNA – genomická deoxyribonukleová kyseliny

KTJ – kolonie tvořící jednotky

KVV – kyselost vodního výluhu

LKS – siláž kukuřičných palic s listeny

MRS agar – de Man, Rogosa and sharp agar

NDF – neutralně detergentní vláknina

NL – dusíkaté látky

OH – organická hmota

PCA – Plate Count Agar

PCR – polymerase chain reaction = polymerázová řetězová reakce

pH – koncentrace vodíkových iontů

PH – původní hmota

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

SP – sporulující mikroorganismy

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TMK – těkavé mastné kyseliny

TMR – total mixed ration = směsná krmná dávka

TSA agar – Tryptone Soya Agar

TSB agar – Tryptone Soya Broth agar

TSN agar – Tryptone Sulfite Neomycin agar

UV – ultrafialové záření

VRBG agar – Violet Red Bile Green agar

°C – stupeň Celsia

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1	Siláž	12
2.2	Silážní aditiva	13
2.2.1	Biologická silážní aditiva.....	14
2.2.2	Chemické silážní přípravky	14
2.3	Krmiva ve výživě skotu a využití separované kejdy jako podestýlky	15
2.3.1	Silážování vybraných píceň.....	15
2.3.1.1	<i>Vojtěška setá</i>	15
2.3.1.2	<i>Jetel luční</i>	15
2.3.1.3	<i>Kukuřice setá</i>	16
2.3.2	Směsná krmná dávka	16
2.3.3	Separovaná kejda	17
2.4	Mikroorganismy v silážích.....	17
2.4.1	Bakterie mléčného kvašení	18
2.4.2	Bakterie čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	21
2.4.3	Mikromycety.....	22
2.4.4	Rod <i>Clostridium</i>	24
2.4.4.1	<i>Clostridium perfringens</i>	25
2.4.4.2	<i>Klostridie v silážích</i>	26
2.4.4.3	<i>Klostridie v syrovém kravském mléce a ve stájovém prostředí</i>	27
2.5	Nemoci způsobené klostridii.....	28
2.5.1	Botulismus	29
2.5.2	Tetanus.....	29
2.5.3	Sněť šelestivá	30
2.5.4	Maligní edém	31
2.5.5	Enterotoxémie.....	32
2.6	Polymerázová řetězová reakce	33
3	CÍL PRÁCE.....	35
4	MATERIÁL A METODIKA	36
4.1	Příprava vzorků pro modelový pokus	36

4.1.1	Charakteristika pokusného stanoviště a materiálu.....	39
4.1.2	Použitá silážní aditiva	39
4.2	Charakteristika sledovaných provozů	40
4.3	Statistické vyhodnocení	41
4.4	Odběr vzorků z provozních podmínek	42
4.5	Mikrobiologická analýza modelových siláží a vzorků z provozních podmínek	43
4.6	Laboratorní metody.....	47
4.7	Izolace mikroorganismů pro další analýzy.....	49
4.8	Identifikace rodu <i>Clostridium</i> pomocí biochemických testů	50
4.9	Izolace DNA pomocí magnetických kuliček	51
4.10	Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	53
4.10.1	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů	54
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
5.1	Modelový pokus v laboratorních podmínkách	59
5.1.1	Modelový pokus I. – jetel luční	59
5.1.2	Modelový pokus II. – vojtěška setá konzervována s rozdílným obsahem sušiny	70
5.1.3	Modelový pokus III. – vojtěška setá v první a druhé seči	80
5.2	Monitoring provozních podmínek.....	89
5.3	Potvrzení přítomnosti <i>Clostridium perfringens</i>	96
6	ZÁVĚR	99
7	SEZNAM LITERATURY	103
8	PŘÍLOHY	132
8.1	Seznam tabulek a obrázku	132
8.1.1	Seznam tabulek v textu	132
8.1.2	Seznam obrázků v textu	133
8.1.3	Seznam tabulek v příloze	133
8.1.4	Seznam obrázků v příloze	135
8.2	Tabulková a obrázková příloha.....	137

1 ÚVOD

Jedním ze základních krmiv pro hospodářská zvířata jsou siláže, které obsahují živiny, vitamíny, minerální látky, mikrobiální metabolity a organické látky. V současné době se zvyšuje podíl siláží v krmné dávce skotu, což je výhodnější z technologického i z ekonomického hlediska. Siláže jsou uchovány pomocí konzervace po celý rok. Podmínkou pro dosažení kvalitní siláže je zachování co největšího množství živin z původní píce, přičemž důležitým prvkem je uchování pozitivních dietetických vlastností, chuti, ale také odolnost vůči sekundární fermentaci, což komplexně ovlivňuje zdravotní stav dojnice, její dlouhověkost, užitkovost a celkový příjem sušiny.

Nebezpečnou bakterií je rod *Clostridium*, který je sporogenní, čímž přežívá nepříznivé podmínky prostředí a v případě příznivých podmínek je schopen opětovného růstu. Je rozšířen v okolí, zejména v půdě, v prachu, ve vodě a běžně se vyskytuje ve střevech zvířat a člověka. Do organismu zvířete se mohou klostridie dostat po příjmu kontaminované vody, krmiva nebo přes poranění. Během sklizně píce se společně s posečenou pící může přenést do siláží i povrchová vrstva půdy a společně s ní i nežádoucí mikroorganismy. Zkrmováním nekvalitních a zdravotně závadných krmiv, současně s výskytem klostridií či jejich spor v prostředí stáje, dochází k přenosu nežádoucích mikroorganismů prostřednictvím mléka a výrobků z nich až na člověka. Současně může vést u zvířat k poruchám příjmu potravy, ke snížení užitkovosti nebo až k jejich úhynu. Nekvalitní, znehodnocené (degradované) siláže nesmí být zkrmovány, což způsobuje ekonomické ztráty pro zemědělce a podniky. U výrobků z mléka výskyt klostridií způsobuje vady chutě, vůně (zapáchají) a při výrobě sýru (typu gouda, ementál) vedou k pozdnímu duření sýrů.

Zdravotní nezávadnost siláží je dnes posuzována hlavně z hlediska smyslového posouzení a fermentačního procesu. Nejsou však v současné době zavedeny žádné přípustné limity pro výskyt mikroorganismů v silážích, povinnost hodnotit siláže a ostatní krmiva z mikrobiologického hlediska a daná problematika není prozkoumána jak v našich, tak i v zahraničních podmínkách. Z těchto důvodů jsem se zabývala výskytem klostridií, hlavně *Clostridium perfringens*, které nejen kontaminuje potraviny a způsobuje jejich vady, ale jsou nebezpečné pro zdraví zvířat i člověka. Disertační

práce byla zaměřena na stanovení klostridií v různých podmínkách, při různé sušině biomasy a ve dvou sečích. Kromě klostridií byly sledovány i ostatní mikroorganismy běžně se vyskytující v silážích. Aby byly výsledky komplexní a bylo možné vyhodnotit zdravotní nezávadnost siláží, byly provedeny současně rozborů siláží na obsah živin a byl zhodnocen fermentační proces. Pro experiment byly vyrobeny pokusné modelové siláže v laboratorních podmínkách a současně odebrány vzorky z provozních podmínek.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Siláž

Siláž je objemné krmivo, které tvoří základ krmné dávky skotu. K přípravě zdravotně nezávadných siláží je nezbytné používat pouze kvalitní čerstvou či zavadlou píci, která je sklizena v optimální sklizňové zralosti a jsou dodrženy všechny technologické postupy a zásady (DOLEŽAL et al., 2012). Principem silážování je rychlá inaktivace enzymových systémů silážovaných píceň při současném přerušení mikrobiální aktivity silážní hmoty (HOFÍREK et al., 2009).

Hlavním účelem silážování je zachovat píci po celý rok jako krmivo pro přežvýkavce s vysokou výživnou hodnotou a zajistit minimální ztráty krmné hodnoty během fermentace. Mezi nejčastěji používané plodiny k silážování patří kukuřice, vojtěška a různé druhy trav (WEINBERG a ASHBELL, 2003).

Silážování je způsob konzervace krmiv za anaerobních podmínek. Pomocí bakterií mléčného kvašení se rostlinné sacharidy přeměňují na organické kyseliny, zejména na kyselinu mléčnou, která zvyšuje chutnost krmiva (GOLLOP et al., 2005). Vlivem tvorby kyseliny mléčné se během fermentace snižuje hodnota pH (VANHATALO et al., 2009; WEINBERG a CHEN, 2013). Čím vyšší je podíl kyseliny mléčné v silážované píci, tím rychleji klesá hodnota pH (KRÁTKÝ, 2006).

Během fermentace dále vzniká kyselina octová. Společně s kyselinou mléčnou zabezpečují konzervační efekt v silážích. Mohou také vznikat i nežádoucí kyselina máselná, propionová, izomáselná, n-máselná, izovalerová, n-valerová, kapronová (JAKOBE a JAKOBE, 1987). Vytvořené anaerobní podmínky působí inhibičně na nežádoucí aerobní mikroorganismy, klostridiím je pak bráněno v růstu především nízkou hodnotou pH (MATHIES, 2002; RICHARD et al., 2007). Důležité je prodloužit dobu skladování, aniž by došlo ke spontánním, nežádoucím mechanickým, biochemickým a mikrobiálním změnám krmiva (HAVLÍČEK et al., 2008). Špatné skladovací podmínky mohou vést k nežádoucí kontaminaci siláží plísněmi, k tvorbě mykotoxinů a následně ke snížení výživné hodnoty siláží (RICHARD et al., 2009). Kontaminované siláže často však představují zdravotní riziko pro zvířata a případně

i pro člověka nebo mají negativní vliv na kvalitu mléka a mléčných produktů (WILKINSON, 2005).

K podpoření probíhajícího fermentačního procesu při silážování napomáhají vhodná silážní aditiva.

2.2 Silážní aditiva

Nezbytnou technologickou součástí při výrobě siláží jsou silážní aditiva, která vedou ke zlepšení primární fermentace. Mají preventivní účinek proti nežádoucím mikroorganismům a snižují jejich růst. Současně zlepšují aerobní stabilitu siláží, garantují menší rozklad bílkovin, snižují ztrátu energie a mají příznivý vliv na celkový obsah i poměr kvasných kyselin (DOLEŽAL et al., 2010; PYROCHTA et al., 2007; PEDROSO et al., 2010).

Použitím vhodných silážních aditiv při výrobě siláží se vytvářejí příznivé podmínky pro množení bakterií mléčného kvašení. Současně přispívají k dosažení dostatečně nízkého pH pro zdárnou konzervaci. Jejich výhodou je rychlejší průběh kvasného procesu, uchování více živin v silážované hmotě, a to i u lehce silážovatelných plodin, kde se zdá být aplikace těchto aditiv zbytečná (LIANHUA et al., 2014; TYROLOVÁ, 2006).

Konzervační aditiva musí být aplikována rovnoměrně, v plné výši dávky dle doporučení od výrobce. Při volbě vhodného silážního přípravku je nutné podřídit se povaze a složení silážované hmoty, obsahu sušiny a koncentraci živin (DOLEŽAL, 2002).

DOLEŽAL et al. (2012) upozorňují, že žádné biologické ani chemické silážní aditivum nemůže nahradit ani odstranit nedostatky v technologickém postupu, hygienické kvalitě silážované píče nebo v nedostatečném udusání a následném zakrytí síla.

Rozlišujeme silážní aditiva biologická a chemická (TYROLOVÁ a VÝBORNÁ 2011; CONTRERAS-GOVEA et al., 2013).

2.2.1 Biologická silážní aditiva

Biologická silážní aditiva obsahují zejména vybrané kmeny bakterií mléčného kvašení (BMK), které umožňují účinnější fermentaci a omezují riziko aerobního rozkladu siláží (ILLEK, 2007).

GOLLOP et al. (2005) uvádějí, že mezi nejčastěji se vyskytující BMK patří homofermentativní druhy, jako jsou například *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* a *Pediococcus* spp. Snižují ztráty živin tím, že produkují kyselinu mléčnou a způsobují rychlý pokles pH (HUISDEN et al., 2009). Současně inhibují růst nežádoucích mikroorganismů (FILYA a SUCU, 2010). Hlavním cílem v použití homofermentativních druhů BMK je snížit riziko klostridiových fermentací a zvýšit výživnou hodnotu (DRIEHUIS et al., 2001). Avšak nevýhodou tohoto typu biologického silážního aditiva je, že nemá dostatek kyseliny octové k ochraně siláží před jejich kažením aerobními mikroorganismy (DANNER et al., 2003).

Heterofermentativní BMK, jako je *Lactobacillus buchneri*, produkuje vyšší koncentrace kyseliny octové v siláži, čímž inhibuje růst plísní a zlepšuje aerobní stabilitu siláže (KLEINSCHMIT a KUNG, 2006).

TABACCO et al. (2009) uvádějí, že pro biologické silážní aditivum je dostačující $10^5 - 10^6$ životaschopných BMK v 1 gramu.

2.2.2 Chemické silážní přípravky

Většina v současné době používaných chemických přípravků je na bázi organických kyselin a jejich směsí. Zejména jsou odvozeny od kyseliny mravenčí, propionové a jejich solí (TYROLOVÁ a VÝBORNÁ, 2011; SEPPÄLÄ et al., 2013). Vyznačují se výraznou antimikrobiální aktivitou a zlepšují kvalitu siláží. Podle KUNG et al. (2003) je konzervace siláží těmito přípravky dosažena přímým okyselením silážované hmoty, čím se snižují ztráty energie, inhibují se další nežádoucí rozkladné produkty bílkovin a uchovává více pohotových sacharidů.

Chemické silážní přípravky obvykle inhibují nebo snižují nežádoucí fermentaci či aerobní kažení siláží (QUEIROZ et al., 2013). Inhibují zejména nežádoucí máselné kvašení, tvorbu alkoholu a amoniaku (HERRMANN et al., 2011).

2.3 Krmiva ve výživě skotu a využití separované kejdy jako podestýlky

2.3.1 Silážování vybraných pícein

2.3.1.1 Vojtěška setá

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.) je krmná plodina s vysokou výživnou hodnotou určená jako hlavní a nejlevnější rostlinný zdroj bílkovin v krmných dávkách skotu (ALBRECHT a BEAUCHEMIN, 2003). Je charakterizována hlubokým kořenovým systémem, který jí umožňuje využívat vodu z půdy do hloubky až 2 metry (POLLOCK et al., 2009). Z víceletých pícein má vysoký výnosový potenciál a krmnou hodnotu. Během silážování je nezbytné nechat pícinu zavadnout (SCHMIDT et al., 2001) a použít silážní aditiva zlepšující fermentační proces (ALBRECHT a BEAUCHEMIN, 2003).

Vojtěška však není vhodná pro pěstování na všech půdách. Jedná se zejména o špatně odvodněné půdy, půdy s nízkým pH a půdy náchylné k vymrznutí (KAMMES et al., 2008).

Vojtěška je klasifikována jako obtížně silážovatelná pícinina. Má vysoký obsah látek s pufrací kapacitou, vysokou koncentraci dusíkatých i minerálních látek a nízký obsah sacharidů (McALLISTER et al., 1998; OLT et al., 2008). Problémovou složkou u vojtěšky je také výskyt antinutričních látek s fytoestrogenní aktivitou, jako jsou kumestany, izoflavony a saponiny (McDONALD et al., 1991). Z uvedeného důvodu není vojtěška setá samostatně běžně používána na pastvinách, protože skot je vystaven riziku nadýmání (KAMMES et al., 2008).

WILKINSON (2005) uvádí, že pokroky v silážování otevřely možnost využití vojtěšky seté a jetele lučního s vysokým obsahem bílkovin k silážování, zejména v zimním období.

2.3.1.2 Jetele luční

Jetele luční (*Trifolium pretense* L.) je vytrvalá víceletá pícinina. Řadí se mezi středně silážovatelnou pícininu s vysokým obsahem antinutričních látek s fytoestrogenní aktivitou (SPAGNUOLO et al., 2014). NJÅSTAD et al. (2014) konstatují, že se jedná zejména o isoflavony a kumestany (kumestrol), které mohou přecházet do mléka. Problémové jsou také kyanogenní glykosidy.

ABBERTON a MARSHALL (2005) popisují, že jetel luční je nejdůležitější píceinou v oblastech mírného pásma. Slouží jako krmivo pro skot ve formě siláží či sena. Vyskytuje se zejména na pastvinách společně s trávou. FIGUEIREDO et al. (2007) uvádějí, že krmivo vyrobené z jetele má vyšší energetickou hodnotu a celkovou stravitelnost živin než vojtěška. Jetel oproti vojtěšce má tedy vyšší obsah vodorozpustných sacharidů, méně dusíkatých látek, méně sirných aminokyselin a nižší koncentraci vlákniny. Významný je také pomalejší průběh vegetačního stárnutí.

MOORBY et al. (2009) ve své studii potvrzují, že nahrazení travní siláže v krmné dávce krav siláží z jetele lučního, zvyšuje koncentraci 18:2 (n-6) a 18:3 (n-3) mastných kyselin v mléce.

2.3.1.3 Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) se řadí mezi objemná sacharidová krmiva a je jednou z nejdůležitějších silážních rostlin na světě. Kukuřičná siláž má důležitou stabilizační úlohu v krmné dávce pro skot a je hlavním zdrojem energie ve výživě dojníc (ČERNÝ et al. 2012; FERREIRA et al., 2014). Obsahuje lehce stravitelné sacharidy, má nízký obsah dusíkatých látek, vápníku, fosforu a vitamínu A i D. Patří mezi lehce silážovatelné plodiny s vysokou stravitelností a s vysokým hektarovým výnosem (PEYRAT et al., 2014; DOLEŽAL et al., 2012). K silážování se používá celá rostlina kukuřice, olistěné palice s větveny (LKS) nebo palice s větveny bez listenů (CCM) a zrno (BELL et al., 2007). S vegetačním vývojem dochází u kukuřice ke zvyšování obsahu energie a ke snižování obsahu vlákniny, v důsledku zvyšování obsahu škrobu. ČERNÝ et al. (2012) uvádějí, že v posledních letech vzrostl význam kukuřičných siláží i s rozvojem bioplynových stanic.

2.3.2 Směsná krmná dávka

Total mixed ration (TMR) je směsná krmná dávka, která obsahuje kombinaci krmiv tak, aby poskytovala vždy rovnováhu v obsahu živin a energie (SOVA et al., 2014). Vzniká smícháním objemného i jadrného krmiva, minerálních a vitamínových doplňků. Míchání se provádí v mobilním krmném voze. Špatné namíchání TMR může mít negativní dopad nejen na užitkovost, ale i zdraví zvířat (OELBERG a STONE, 2014).

KUNG (2010) uvádí, že po namíchání TMR v zemědělských podnicích se může brzy začít zahřívát, a tím docházet ke ztrátám sušiny, sníženému příjmu krmiva a následnému snížení produkce mléka. Uvedené aerobní zhoršení je ovlivněno působením vzduchu v průběhu míchání TMR, obsahem lehce rozložitelných substrátů, které jsou do směsi přidány, nedostatečnou hygienou míchacího vozu, v němž mohou zůstat zbytky obsahující aerobní nežádoucí mikroorganismy.

2.3.3 Separovaná kejda

Klostridie se mohou vyskytovat nejen v krmivech, ale i v podestýlce (separovaná kejda), která se z důvodu nové technologie či z nedostatku jiného steliva (slámy) používá na stlaní pod zvířata.

Separát jako plastické stelivo je jedním z typů podestýlek, které se využívají v provozních podmínkách. Získává se z kejdy, po oddělení pevné složky od tekuté. JELÍNEK et al. (2006) uvádějí, že použitím vhodných separátorů může být oddělena pevná část kejdy od tekuté části až do sušiny separátu 40 %. Vyšší sušina by mohla způsobit namrzání a ojinění lože. Důležitým krokem při výrobě separátu je, aby prošel biotermickým záhřevem, a tím se redukovalo množství nežádoucích mikroorganismů a parazitů. Doporučuje se k separátu přidávat mletý vápenec v poměru 3-4:1. Technologie se dostala do popředí zájmu i díky rozvoji bioplynových stanic (STANĚK a DOLEŽAL, 2012; ZINK, 2012).

2.4 Mikroorganismy v silážích

Množství a složení mikroorganismů v zelené píce závisí na druhu píce, ročním období, klimatických podmínkách a na znečištění píce. Vlhká plodina podporuje růst širokého spektra mikroorganismů, které následně snižují výživnou hodnotu píce. Epifytní mikroflóra píce určená k silážování je důležitá z hlediska celkového množství mikroorganismů, které se mohou s pícínou během silážování dostat do siláží a je tak důležitým faktorem kvality siláží (PAHLOW, 1997; MUCK, 2010).

Z mikrobiologického hlediska můžeme rozdělit mikroflóru v silážích na žádoucí (prospěšnou) a nežádoucí. Do žádoucí mikroflóry zahrnujeme bakterie mléčného kvašení a do nežádoucí mikroflóry bakterie, které se podílejí na kažení siláží. Za

aerobních podmínek působí kvasinky, plísně, listerie a za anaerobních podmínek klostridie a enterobakterie. V silážích se uplatňují při spontánním kvašení mikroorganismy aerobní i fakultativně anaerobní, tzv. epifytní mikroflóra. Její množství závisí na složení epifytní mikroflóry na povrchu rostlin. Je velmi variabilní z hlediska druhového zastoupení počtu mikroorganismů. Složení epifytní mikroflóry závisí na vlivu teploty, vlhkosti i na počasí. Mikroorganismy se podílejí zejména v silážích na oxidačních procesech. Mezi aerobní druhy řadíme zejména plísně. Sporotvorné bakterie (klostridie) a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* mohou kontaminovat siláže z půdy či prachu nebo se vyskytují v silážích, pokud se v počáteční fázi fermentace rychle nesníží pH. Vytvářením anaerobního prostředí, dochází k postupnému zániku aerobních mikroorganismů (DRIEHUIS a ELFERINK, 2000).

Do celkového počtu mikroorganismů (CPM) zahrnujeme aerobní i fakultativně anaerobní mikroorganismy jako jsou bakterie, kvasinky a plísně. Tato skupina mikroorganismů nás informuje o míře kontaminace krmiva či substrátu. U siláží se do CPM promítají nejen nežádoucí mikroorganismy, ale i žádoucí mikroorganismy, jako jsou bakterie mléčného kvašení.

Nežádoucí mikroorganismy v silážích jsou zodpovědné za kazivost siláží a způsobují ekonomické ztráty. Patogenní mikroorganismy vyvolávají u lidí i zvířat onemocnění (DUNIÈRE et al., 2013).

2.4.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) řadíme mezi fakultativně až obligátně anaerobní mikroorganismy. V silážích hrají roli zejména během fermentace v počáteční fázi, kdy se snižuje pH v důsledku tvorby kyseliny mléčné a v menší míře kyseliny octové (DRIEHUIS a ELFERINK, 2000). Kyselina mléčná a snížená hodnota pH mají konzervační účinky, které chrání potraviny a krmiva před působením nežádoucích mikroorganismů, jako jsou kvasinky, plísně, enterobakterie a klostridie (HOLZER et al., 2003).

Jako hlavní zdroj výživy pro svůj růst využívají BMK lehce stravitelné sacharidy, především glukózu, sacharózu, celobiózu, méně pak arabinózu, skupinu fruktanů, popřípadě škrob. Z tohoto důvodu jsou sacharidová krmiva (např. kukuřice) řazena mezi

lehce silážovatelná krmiva. Velmi důležitou vlastností těchto bakterií je jejich schopnost rozvíjet se v aktivně kyselém prostředí (WILKINSON, 2005).

BIANCHINI (2015) potvrzuje antifugální aktivitu BMK. Ve své studii popisuje produkci protiplísňových látek a dalších metabolitů BMK, které ovlivňují produkci mykotoxinů. GOLLOP et al. (2005) se ztotožňují s tvrzením, že BMK mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu, a tím inhibují patogenní mikroorganismy.

Také SCHNÜRER a MAGNUSSON (2005) ve své studii uvádějí, že BMK mohou být použity jako metabolické produkty, protože vykazují antimykotické a antibakteriální vlastnosti.

V závislosti na metabolických drahách a podle tvorby produktů kvasných procesů rozdělujeme BMK do dvou hlavních skupin:

- 1.) *Homofermentativní* – mohou produkovat z hexózy více než 90 % kyseliny mléčné (DRIEHUIS a ELFERINK, 2000), která působí jako silná organická kyselina tlumící rozvoj jiných mikroorganismů, především bakterií máselného kvašení (DUNIÈRE et al., 2013). Nejsou schopny metabolizovat pentózy. Dochází k velmi malým ztrátám sušiny a energie (McDONALD et al., 1991). GOLLOP et al. (2005) i HOLZER et al. (2003) řadí mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Pediococcus*. Některé druhy (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*) mají význam i pro bacherovou fermentaci (McDONALD et al., 1991).
- 2.) *Heterofermentativní* – ze sacharidů produkují kyselinu mléčnou, ale současně i kyselinu octovou, etanol, oxid uhličitý a vodík. HOLZER et al. (2003) a WILKINSON (2005) ve své studii uvádějí jako heterofermentativní BMK *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*.

V některých studiích jsou homofermentativní a heterofermentativní BMK rozděleny ještě do podskupin.

HOLZER et al. (2003) ve své studii uvádějí rozdělení lactobacilů na obligátně homofermentativní i heterofermentativní a fakultativně heterofermentativní, které fermentují hexózy homofermentativně za zvláštních podmínek na kyselinu mléčnou a heterofermentativně nejen na kyselinu mléčnou, ale i na kyselinu octovou, oxid

uhličité a etanol. Tato skupina BMK zahrnuje několik důležitých druhů v silážích, zejména *Lactobacillus plantarum*. Rozdělení a příklady těchto lactobacilů jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Rozdělení lactobacilů dle HOLZERA et al. (2003)

Obligátně homofermentativní	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus farciminis</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus bovis</i>
Fakultativně heterofermentativní	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus sakei</i>
	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus pentosus</i>
Obligátní heterofermentativní	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

BURGAIN et al. (2014) potvrzují, že BMK jsou schopny produkovat kyselinu mléčnou během homofermentativního i heterofermentativního metabolismu.

Bakterie mléčného kvašení můžeme nalézt na sliznici lidí i zvířat, na rostlinách, v krmivech a potravinách (HOLZAPFEL et al., 2001). Přirozeně se vyskytují v gastrointestinálním traktu přežvýkavců. Společně se siláží se dostávají do trávicího

traktu skotu probiotické druhy BMK (HAN et al., 2014). Mezi druhy BMK, které byly detekovány ve střevech, řadíme *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii* a *Lactobacillus murinus* (KRAUSE et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2008; NADER-MACÍAS et al., 2008).

2.4.2 Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou fakultativně anaerobní gramnegativní nesporulující tyčinkovité bakterie. Jsou součástí střevní mikroflóry hospodářských zvířat a lidí. Vyskytují se ve volné přírodě, zejména v půdě, ve vodě, na rostlinných a živočišných materiálech. Pro většinu druhů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* je teplotní optimum 37 °C. Jsou významné zejména z hygienického hlediska. Indikují fekální znečištění siláží. Často bývají stanovovány jako hygienický indikátor (SANDLE, 2014; GREIF et al., 2006). Řadí se mezi nežádoucí mikroorganismy. Příslušníci této čeledi jsou významnými producenty biogenních aminů, které v nadlimitní koncentraci mohou negativně ovlivnit zdraví zvířat. Jakmile snížíme při silážování hodnotu pH pod 4,5 až 5,0, je inhibován jejich růst a množení v silážích (DRIEHUIS a ELFERINK, 2000).

Do čeledi *Enterobacteriaceae* řadíme vedle nepatogenních rodů rod *Enterobacter* a rody, jejichž příslušníci jsou významnými patogeny, jako jsou *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella* a *Escherichia* (PATEL et al., 2014).

Z hygienického hlediska je nejdůležitější rod *Escherichia*. Jednotlivé druhy jsou obyvateli střevního traktu různých živočichů. Nejvýznamnější je *Escherichia coli*, jejichž některé kmeny mohou být patogenní pro zvířata a člověka. *Escherichia coli* zkvašuje sacharidy za současné tvorby organických kyselin (kyselina mléčná, pyrohroznová, octová, mravenčí) a plynů (YANG a WANG, 2014).

DOLEŽAL et al. (2012) uvádějí, že v silážích fermentují mikroorganismy rodu *Enterobacter* sacharidy na kyselinu octovou, plyny, alkohol, což vede k velkým ztrátám. Obecně platí, že počet enterobakterií se odráží od silážovací techniky, dobrých podmínek silážování, přiměřené dostupnosti živin i vody a přeměně těchto živin na kvasné produkty, které snižují pH siláže (PAHLOW et al., 2003).

Podle HERON et al. (1993) je vyšší počet enterobakterií na travách určených k silážování. Pokud je tráva sklizena, zasilážována, dochází za anaerobních podmínek

k pomnožení laktobacilů, které snižují hodnotu pH a současně se snižuje počet nežádoucích enterobakterií. Pokud však podmínky silážování nejsou optimální, mohou enterobakterie růst, využívají dostupné bílkoviny, dochází ke zvýšení koncentrace amoniaku, hodnoty pH a produkují endotoxiny (MACIOROWSKI et al., 2007).

2.4.3 Mikromycety

Mezi mikromycety řadíme plísně a kvasinky. Jsou to eukaryotické mikroskopické organismy s heterotrofní výživou patřící do říše hub – Fungi (OSWEILER, 2000). Houby obecně rostou obvykle při teplotě mezi 10 až 40 °C, při pH 4 – 8 a při a_w nad 0,70 (CHELI et al., 2013).

Plísně

Patří do skupiny aerobních mikroorganismů. Jejich růst a množení je podporováno výskytem vzdušného kyslíku. Řadí se mezi nežádoucí mikroorganismy v silážích. Vyskytují se prakticky všude tam, kde existuje organická hmota. Živiny získávají absorpcí z okolního prostředí (OSWEILER, 2000; MALÍŘ a OSTRÝ, 2003). Plísně jsou přítomny v prostředí a během sklizně, dopravy, skladování nebo při posklizňové manipulaci mohou krmiva znehodnotit (MAGAN a ALDRED, 2007).

Při svém růstu mohou plísně produkovat sekundární metabolity nazývané mykotoxiny. V silážích jsou považovány za nejdůležitější rody plísní *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (FINK-GREMMELS, 2008). STORM et al. (2008) ve své studii uvádějí, že kontaminace trav nebo kukuřice plísněmi *Fusarium*, *Aspergillus* a *Alternaria* před silážováním může vést ke kontaminaci siláží, což má za následek snížení chutnosti a příjmu krmiva. Současně se snižuje výživná hodnota krmiva a vede až ke zdravotním problémům, jako je snížení užitkovosti a plodnosti zvířat, vyšší náchylnost zvířat k onemocněním (FINK-GREMMELS, 2008).

ALONSO et al. (2013) konstatují, že výskyt plísní souvisí s nedostatečnou hygienickou kvalitou siláží, která vede ke ztrátě živin i sušiny. Při špatných skladovacích podmínkách jsou jedním z největších rizik a kontaminace mykotoxiny, které vedou k znehodnocení krmiv a siláží.

DOLEŽAL et al. (2012) uvádějí, že krmiva jsou podmíněně zkrmitelná při koncentraci plísní 10^5 KTJ/g, ale zpravidla jsou považována za zkažená a nekrmitelná při přesáhnutí hranice $10^6 - 10^7$ KTJ/g.

Koncentrace plísní vyšší než 10^4 KTJ/g může vyvolávat u zvířat dýchací problémy, abnormální bachorovou fermentaci, snížení reprodukčních funkcí, poškození ledvin, podráždění kůže a očí (SCUDAMORE a LIVESEY, 1998).

Nízká koncentrace kyslíku a nízká hodnota pH v silážích může inhibovat růst plísní (*Fusarium* spp.), ale některé druhy plísní mohou přežít podmínky silážování (*Aspergillus*, *Penicillium* spp.). Kyselina mléčná a kyselina octová mají omezený účinek na růst plísní. Účinnějšími inhibitory plísní jsou kyselina propionová a kyselina máselná (CHELI et al., 2013).

Důležitou prevencí před výskytem plísní je důkladné udusání a rychlé anaerobní uzavření siláže (DOLEŽAL et al., 2012).

Plísně mají kromě negativního účinku i účinek pozitivní, který spočívá v produkci antibiotik a organických kyselin. Při provádění specifických oxidací se používají vybrané druhy plísní i pro výrobu mikrobiálních insekticidů (ŠILHÁNKOVÁ, 2008).

Kvasinky

Kvasinky jsou aerobní až fakultativně anaerobní mikroorganismy. Považují se za nejdůležitější mikroorganismy zodpovědné za zahájení aerobního kažení siláží (PAHLOW et al., 2003). Pozitivní efekt kvasinek spočívá pouze v počáteční fázi fermentačního procesu, kdy se podílejí na rychlé spotřebě kyslíku v silážované hmotě a vytvoření anaerobního prostředí. Kvasinky vytvářejí etanol, který ve vyšším množství negativně ovlivňuje chuť krmiva. Jsou tedy původci alkoholového kvašení, způsobují mikrobiální záhřev siláží a jsou považovány za konkurenty bakterií mléčného kvašení. Kvasinky zkvašují sacharidy na organické kyseliny, aromatické alkoholy a oxid uhličitý. Při silážování by měla být potlačena jejich činnost, i když napomáhají k vytvoření anaerobního prostředí (JAKOBE a JAKOBE, 1987; DOLEŽAL a DVOŘÁČEK, 2000; PAHLOW et al., 2003).

Kvasinky jsou považovány za hlavní příčinu aerobní nestability siláží. Zvýšené množství (nad 10^5 KTJ/g) lze zaznamenat v silážích smyslově – vizuálně i čichem. Jejich masivní pomnožení (více než $10^5 - 10^8$ KTJ/g) vede k destabilizaci a snížení

výživné hodnoty siláží. Může být také příčinou průjmů u skotu. Jsou indikátorem špatných skladovacích podmínek a nízké hygienické kvality (BOLSEN et al., 1992).

Kvasinky a plísně jsou tedy zodpovědné za degradaci siláží s možnými negativními účinky na zdraví zvířat i lidí (DUNIÈRE et al., 2013).

2.4.4 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* je bohatý a zahrnuje kolem 100 druhů (LEWIS, 2011). Klostridie jsou obligátně anaerobní grampozitivní tyčinkovité bakterie tvořící spory (EL-MOEZ et al., 2013; FELIGINI et al., 2014). Patří mezi ně i několik patogenních druhů (ARONOFF, 2013).

Řadí se mezi nežádoucí a škodlivé mikroorganismy. Jsou označovány jako bakterie máselného kvašení, protože metabolizují sacharidy na kyselinu máselnou (DOLEŽAL et al., 2012). Jsou rozšířeny díky široké škále metabolických aktivit (proteolytická, amylolytická, lipolytická, celulolytická a další). Vyskytují se v anaerobním prostředí, jako je trávicí trakt zvířat i člověka (FELIGINI et al., 2014). Dále je můžeme nalézt v půdě, v silážích, na skládkách při kvašení odpadů, v chlívské mrvě, na dně stojatých vod a ve vyhnívacích komorách čistíren odpadních vod (RADA a VLKOVÁ, 2010).

Mezi druhy klostridií, které mají vliv na hospodářská zvířata, řadíme *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii* a *Clostridium tetani* (BRÜGGEMANN et al., 2009).

Životní cyklus klostridií vede za nepříznivých podmínek k tvorbě spor, které jsou rezistentní vůči teplotě, záření, dezinfekci, trávicím šťávám a relativně nízkému pH (DOLEŽAL et al., 2012; OLGUÍN-ARANEDA et al., 2015).

Spory rodu *Clostridium* jsou usmrceny za 10 – 15 minut až při teplotách 120 °C nebo ještě vyšších. Při teplotě 100 °C by bylo k jejich usmrcení potřeba většinou 4 až 20 hodin (PARKER, 2008; ŠILHÁNKOVÁ, 2008). Vlivem anaerobního kažení se zvyšuje počet spor. Nejprve se zvýší pH. Následně se pomnoží fakultativně anaerobní (kvasinky, koliformní bakterie) a aerobní mikroorganismy (plísně). Opět se vytvoří anaerobní prostředí. Klostridie se uplatňují zejména při sekundárním kvašení (RADA, 2009).

Některé druhy klostridií mohou vykazovat sacharolytické a proteolytické aktivity:

- Sacharolytické klostridie – *Clostridium sacharolyticum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sphenoides*, které způsobují odkyselování hotových siláží tím, že odbourávají sacharidy a současně i kyselinu mléčnou, která se vytvořila.
- Proteolytické klostridie – *Clostridium proteolyticum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, které rozkládají bílkoviny a aminokyseliny. V silážích mohou vznikat činností enzymů těchto klostridií biogenní aminy, které jsou zdravotně závadné. Kromě škodlivých biogenních aminů, jejich činností vzniká i ve větším množství amoniak (McDONALD et al., 1991; DOLEŽAL et al., 2012).

2.4.4.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je anaerobní grampozitivní sporulující bakterie, která je významným patogenem pro člověka i zvířata. Způsobuje řadu onemocnění a je široce distribuována do životního prostředí. Fermentuje sacharidy, kyselinu mléčnou, bílkoviny (aminokyseliny) a současně se tvoří toxiny (GURJAR et al., 2008; REDONDO et al., 2013).

Bakterie je rozšířena zejména v půdě, v prachu, ve vodě a běžně se vyskytuje ve střevech zvířat a člověka (ABU-ELNAGA et al., 2014).

Společně s *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* se řadí mezi patogenní druhy a mohou produkovat až 18 % všech známých bakteriálních toxinů (POPOFF a STILES, 2005).

Celkem je rozlišováno pět typů toxinů *Clostridium perfringens* – A, B, C, D a E, které produkují čtyři hlavní toxiny α , β , ϵ a ι (PETIT et al., 1999; FERRAREZI et al., 2008).

Nesprávně zfermentovaná siláž, krmení kontaminovanými krmivem a léčba zvířat antibiotiky vede ke kolonizaci střev klostridiemi s negativním zdravotním důsledkem.

KAMRA a SRIVASTAVA (1991) zkoumali vliv organických kyselin při různých hodnotách pH na růst *Clostridium perfringens* a zjistili, že největší inhibiční vliv má kyselina propionová, následně kyselina mléčná, kyselina máselná a kyselina octová.

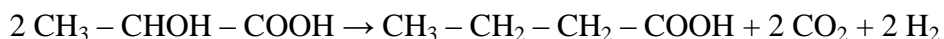
2.4.4.2 Klostridie v silážích

Při sklizni se společně s posečenou pící může dostat do siláží i povrchová vrstva půdy a s ní i nežádoucí mikroorganismy. Kontaminace píce, určených k silážování, povrchovou vrstvou půdy je problematická především z hlediska výskytu spor klostridií. Pokud klostridie naleznou vhodné podmínky, vytvořené vegetativní buňky se začnou množit, způsobí tzv. máselné kvašení (bakterie máselného kvašení). A následně se vytvoří za nepříznivých podmínek opět spory. Zkrmováním kontaminované siláže se spory klostridií, které jsou tak odolné, že procházejí trávicím traktem bez jakékoliv změny, dostávají výkaly a přes znečištěné prostředí do mléka (BÖHNEL et al., 2008).

RADA a VLKOVÁ (2010) uvádějí, že nejčastější výskyt spor klostridií je v anaerobně nestabilních silážích a silážích, zejména vojtěškové a travní.

DRIEHUIS a ELFERINK (2000) uvádějí, že v silážích se nejčastěji vyskytují druhy *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes* a *Clostridium bifermentans*.

Pokud se během sekundárního kvašení v silážích nesníží hodnota pH pod 4,6 a nezačnou se tvořit organické kyseliny, v silážích se začnou uplatňovat klostridie, které využívají jako substrát i kyselinu mléčnou:



Jak vyplývá z rovnice, ze dvou molekul kyseliny mléčné vznikají dvě molekuly CO_2 a jedna molekula kyseliny máselné. Klostridie mohou dále rozkládat i monosacharidy a polysacharidy (DOLEŽAL et al., 2012; WILKINSON, 2005).

Clostridium perfringens fermentuje jak sacharidy, kyselinu mléčnou, tak i bílkoviny. Během fermentace se současně mohou vytvořit toxiny. Produkty fermentačního procesu jsou většinou alkalického charakteru, což způsobuje zpravidla zvýšení hodnoty pH nad 4,8. Takové siláže bývají často označovány jako klostridiální siláže. U citlivých druhů klostridií inhibuje kyslík jejich růst a po 5 až 10 minutách působení usmrcuje vegetativní buňky většiny druhů.

Preventivní opatření proti výskytu klostridií v silážích je čistota sklizené hmoty, optimální obsah sušiny a rychlé okyselení silážované hmoty (DOLEŽAL et al., 2012).

ZEMAN et al. (2006) uvádějí, že činností klostridií dochází i ke vzniku biogenních aminů v důsledku dekarboxylace aminokyselin. Biogenní aminy často vedou ke zhoršení příjmu krmiva a závažným zdravotním problémům.

2.4.4.3 Klostridie v syrovém kravském mléce a ve stájovém prostředí

Spory klostridií se nacházejí ve výkalech dojníc a do kravského mléka se mohou dostat během dojení, zejména při nesprávné hygieně, kdy se nepodaří snížit množství spor klostridií na povrchu kontaminovaných struků před dojením nebo se do mléka mohou dostat ze vzduchu ve stáji. Zdrojem spor klostridií v syrovém kravském mléce mohou být siláže s nedostatečnou mikrobiální kvalitou (VISSERS et al., 2007a; STADHOUDERS a SPOELSTRA, 1990).

Patogenní klostridie v syrovém kravském mléce a následně v mléčných výrobcích jsou zodpovědné za škodlivé účinky na lidské zdraví a způsobují mikrobiologické kažení nebo změnu organoleptických vlastností při klíčení spor a následném množení vegetativních buněk klostridií (AURELI et al., 2011).

Spory klostridií jsou vážným problémem při výrobě tvrdých a polotvrdých sýrů (REINDL et al., 2014), jako jsou gouda, ementál, výjimečně parmezán. U ementálu způsobuje *Clostridium sporogenes* tvorbu bílých skvrn uvnitř sýru (BACHMANN et al., 2011).

Klostridie v sýrech způsobují zhoršování chuti v důsledku fermentace kyseliny mléčné s produkcí kyseliny máselné a vedoucí ke vzniku nepříjemného zápachu (GARDE et al., 2012). Rovněž REINDL et al. (2014), FLODIN (2009), McSWEENEY (2004), FELIGINI et al. (2014) ověřili, že dochází i k výrazné tvorbě plynů (směs CO₂, H₂), a tím k tzv. pozdnímu duření sýrů, které je charakterizováno bublinkami a trhlinami v sýrech. Současně jsou následkem ekonomické ztráty.

Pozdní duření sýrů se vyskytuje, pokud klostridie přesáhnou koncentraci 10 spor/l pasterizovaného mléka (RADA, 2009). Spory klostridií v mléce nejsou schopny vyklíčit již při kyselosti pH 4,3, které lze poměrně rychle dosáhnout činností mléčných bakterií. Proto například při přípravě máslařských kultur stačí používat pasterované mléko.

V Nizozemí bylo zahrnuto sledování spor klostridií jako parciální podklad pro výkupní cenu mléka. Cílem bylo produkovat syrové kravské mléko s méně než 1000 spor klostridií/l (VISSERS et al., 2007b).

Ve Švédsku na Ústavu lékařské biochemie a mikrobiologie zkoumali vliv klostridií v mléčných výrobcích. FLODIN (2009) zjistil, že klostridie se přirozeně vyskytují v půdě a mohou kontaminovat mléko přes kontaminované výkaly.

JULIEN et al. (2008) v Kanadě sledovali zdroje klostridií v syrovém mléce na farmách. Celkem byly sledovány pomocí mikrobiologické analýzy 4 farmy po dobu 2 let. Sledovala se přítomnost klostridií v půdě, píci, kukuřičné siláži, seně a syrovém mléku. Větší obsah klostridií byl zjištěn v kukuřičné siláži než v travní siláži. Druh *Clostridium disporicum* byl identifikován jako důležitý zástupce klostridiové kontaminace mléka. *Clostridium tyrobutyricum* bylo současně nalezeno v mléce a v prostředí stáje.

Preventivním opatřením je používat ke krmení hygienicky nezávadné siláže, zajistit správnou hygienickou praxi v chovu zvířat a během procesu dojení snížit množství spor klostridií v mléce (SHEEHAN, 2011; ILLEK, 1998).

Spory klostridií nacházející se ve výkalech nebo v rozkládající se tkáni mrtvého zvířete mohou kontaminovat životní prostředí, a tím se zvyšuje jejich dostupnost pro člověka (SONGER, 2010). Bylo prokázáno, že nepřímý přenos infekce ze zvířat na člověka je možný přes výkaly (MANTECA et al., 2001).

2.5 Nemoci způsobené klostridiemi

Klostridie jsou zdrojem infekčních onemocnění u skotu, zejména u telat. V důsledku bakteriální infekce mohou vést i k náhlé smrti hospodářských zvířat (EL-MOEZ et al., 2013).

Rod *Clostridium* je součástí střevní mikroflóry skotu. Při poraněních, výskytu parazitů nebo při stresu dochází k produkci silných toxinů (POPOFF a BOUVET, 2009). V některých oblastech jsou klostridie jedním z významných problémů v chovu hospodářských zvířat. Diagnóza klostridiových onemocnění bývá často obtížná a je založena na základě klinických příznaků. Občas může být onemocnění zjištěno až po porážce zvířete.

Způsobují tetanus, botulismus, sněť šelestivou, maligní edém, enterotoxémii a jiná závažná onemocnění, která mohou vést až k úhynu zvířat (ILLEK, 2012).

2.5.1 Botulismus

Jedná se o multifaktoriální klinický syndrom vyvolaný neurotoxinem různých typů a podtypů *Clostridium botulinum* (KRÜGER et al., 2014). Je extrémně odolný v prostředí, vůči varu a dezinfekci s obsahem alkoholu (SYKES, 2014).

Botulismus je akutně probíhající onemocnění. Intoxikace nastává po příjmu botulotoxinu s potravou, krmivem nebo vodou. V žaludku je toxin rychle uvolněn. Na úrovni sliznice žaludku je resorbován a krví transportován do nervových synapsí, kde působí jako typický nervový jed, který inhibuje uvolňování acetylcholinu, což vede k zástavě přenosu nervových vzruchů na nervových drahách. Nervové poškození je ireverzibilní. Má toxický účinek i na centrální nervový systém (HOFÍREK et al., 2009; COFFIELD a WHELCHER 2012; SYKES, 2014).

Doba inkubace a závažnost botulismu je závislá na množství požitého toxinu a citlivosti živočišného druhu. Pohybuje se v rozmezí několika hodin až dnů (MOREIRA et al., 2014). Onemocnění se projevuje únavou, apatií, ztíženým přežvykáváním a polykáním, ochrnutím jazyka, ztrátou stability, ascendentní paralýzou (HOFÍREK et al., 2009; RADOSTITS et al., 2007). První klinické příznaky u skotu jsou obtíže při chůzi a nekoordinovanost. Později se dostaví až nemožnost vstání zvířete. Leží s postranním vytočením hlavy. Výkaly jsou vodnaté, kašovitě. Po paréze dýchacího svalstva dochází k selhání krevního oběhu a následně k úhynu (HOFÍREK et al., 2009; MOREIRA et al., 2014). Léčba u velkých zvířat s pomalejším průběhem onemocnění spočívá v podání antiséra a léčiva s laxativním účinkem. Prevence spočívá v zabezpečení zdravotně nezávadného krmiva (HOFÍREK et al., 2009; ZENG et al., 2011.). CUNHA et al. (2014) uvádějí, že nejúčinnějším preventivním způsobem je očkování skotu.

Během porážky se mohou spory klostridií, obsažených v trávicím traktu zvířat, dostat do potravin živočišného původu. Za anaerobních podmínek, vhodném pH a teplotě mohou spory vyklíčit, začít produkovat toxin a vytvořit tak zdravotní riziko pro spotřebitele (BÖHNEL et al., 2008; MYLLYKOSKI et al., 2011).

2.5.2 Tetanus

Původcem onemocnění je *Clostridium tetani*, které se vyskytuje ve formě spor v půdě, v trávicím ústrojí zvířat a ve výkalech skotu, ale i koní, ovcí, koček, krys,

morčat a kuřat. Spory *Clostridium tetani* jsou velmi odolné vůči teplu a mohou přežít teplotu v autoklávu 121 °C po dobu 10 až 15 minut (ŠILHÁNKOVÁ, 2008).

Onemocnění je spojeno s poraněním a přítomností anaerobního prostředí. Z rány se toxin dostává krví a lymfou k nervovým zakončením a nervovými svazky se šíří do centrální nervové soustavy (MACKAY, 2014). Onemocnění je charakterizováno reflektorickou dráždivostí motorických nervových center a bolestivými svalovými křečemi, které mohou vést k respiračnímu selhání a smrti až ve 40% případech (RYAN et al., 2004; ATKINSON et al., 2008; HALLIT et al., 2013). Inkubační doba je několik dnů až týdnů. Symptomy onemocnění se projevují ve více formách. Při generalizované formě je celková strnulost a tonus svalstva, čelisti, krku a šíří se až ke svalům trupu a končetin. Při lokální formě se příznaky objevují v oblasti poranění a šíří se na další svalové skupiny. Mezi nejčastější příznaky patří potíže s příjmem potravy a pohybem, atonie střev i bachoru a následně tympanie. Jedná se o smrtelné onemocnění, které postihuje zvířata i lidi (HOFÍREK et al., 2009; MESHAD et al., 2013). K úhynu zvířat dochází okolo 3. až 6. dne po objevení prvních příznaků. Léčba spočívá v chirurgickém ošetření místa poranění, aplikaci antibiotik, antitoxického séra a sedativ. Prevencí tetanu je aseptické ošetření poranění, dodržování hygienické úrovně při porodech, ošetření pupku narozených telat, aseptické podmínky při chirurgických zákrocích (VOTAVA, 2003; UZAL et al., 2012).

2.5.3 Sněť šelestivá

Sněť šelestivá je onemocnění vyvolané bakterií *Clostridium chauvei*. Jedná se o závažné onemocnění postihující skot a ovce (VILEI et al., 2011). Onemocnění vyvolané *Clostridium chauvei* vykazuje vysokou úmrtnost infikovaných zvířat a je charakterizováno tvorbou plynaté sněti v postižených svalech (LANGE et al., 2010; FREY a FALQUET, 2015).

K infekci dochází většinou perorálně při pozření kontaminovaného porostu nebo vody při pastvě či napájení. Spory mohou zůstat latentní několik let ve svalech. Snížení hladiny kyslíku jim umožňuje klíčit, množit se a produkovat několik silných toxinů (UZAL et al., 2003). Z trávicího ústrojí se dostávají vyklíčené vegetativní formy do krevního oběhu. Následně do kosterního svalstva, podkoží, pánevních končetin, hřbetu a krku. V těchto místech vznikají zánětlivé nekrotické plynové edémy svaloviny

a podkožní tkáň v důsledku produkce toxinu. Následkem jsou degenerativní změny v parenchymatózních orgánech a v srdeční svalovině (SATHISH a SWAMINATHAN, 2008; GAROFOLO et al., 2011).

Primárním zdroje nákazy jsou vlhké, bažinaté louky, které jsou využívány k pastevnímu odchovu zvířat (HOFÍREK et al., 2009). Nákaza se obvykle vyskytuje u mladého skotu ve věku 2 měsíců až 2 let (UZAL a McCLANE, 2012). Její výskyt bývá dáván do souvislosti s použitím kontaminovaného krmiva či steliva (slámy, sena). Inkubační doba je zpravidla 1 – 5 dnů. Infekce se projevuje horečkou (FREY a FALQUET, 2015). Zvířata se obtížně pohybují v důsledku poškození kosterní svaloviny. Objevují se bolestivé, krepitující otoky svalstva a podkoží na hřbetě, předních i zadních končetinách. Zvíře jeví celkovou skleslost, zrychlenou srdeční činnost a dýchání. Do 1 – 2 dnů po objevení příznaků zvíře hyne. Terapie spočívá ve včasné aplikaci antibiotik ve vysokých dávkách při zjištění prvních příznaků onemocnění. Preventivní vakcinace skotu před vyhnáním na pastvu je účinnou prevencí (HOFÍREK et al., 2009).

2.5.4 Maligní edém

Maligní edém je infekční onemocnění vyvolané mikroorganismem *Clostridium septicum*. Onemocnění se vyskytuje jako důsledek hlubokého poranění tkáň v místě infekce (GAROFOLO et al., 2011; EL-MOEZ et al., 2013). *Clostridium septicum* se běžně vyskytuje v půdě a ve výkalech domácích zvířat i lidí (NEUMANN a REHBERGER, 2009). Predispozičním faktorem je zhmoždění tkáň, hnisavé procesy a výrazně anaerobní prostředí. Zdrojem přenosu je kontaminovaná voda nebo nevhodné prostředí. Po pomnožení mikroba a uvolnění toxinu se dostává krevní cestou do celého organismu a poškozuje zejména parenchymatózní orgány. Rozpadem organických látek v zánětlivém místě dochází k uvolňování plynu do tkání. Při pokročilejším procesu dochází k sepsi. Inkubační doba se uvádí v hodinách, je velmi krátká (HOFÍREK et al., 2009). První příznaky se projevují v místě poranění formou zánětlivého edému a bolesti (KENNEDY et al., 2009). Postižená tkáň je překrvená, teplá na pohmat a bolestivá. U zvířat se vyskytuje souběžně i zvýšená teplota, nechutenství, skleslost, apatie, zvýšený trias, cyanóza sliznic. Postižená zvířata hynou zhruba za 2 – 3 dny. Terapie spočívá v chirurgickém ošetření ran, aseptickém vedení porodů i chirurgických zákroků

a včasném podání antibiotik. Je možné podávat preventivně hyperimunní séra (HOFÍREK et al., 2009).

2.5.5 Enterotoxémie

Původcem infekce je *Clostridium perfringens*, které je běžnou součástí střevní mikroflóry. Do organismu se dostává především z půdy společně s krmivem či vodou. Podle typu lze diagnostikovat enterotoxémii, vyvolanou *Clostridium perfringens* typu C nebo abomasitidu způsobenou *Clostridium perfringens* typ A (ILLEK, 2012).

Enterotoxémie

Enterotoxémie je infekční onemocnění (nekrotická enterotoxémie novorozených telat) vyskytující se zejména u telat konzumujících kravské mléko nebo náhražky obsahující mléčnou bílkovinu (VALGAEREN et al., 2013). Onemocnění způsobuje náhlou smrt telat. Probíhá jako střevní intoxikace. Dochází k poškození intestinální sliznice s krvavými průjmy. Telata trpí nechutenstvím, horečkou, mají zvětšená břicha, kolikové příznaky. V závěrečné fázi ataxii, manéžové pohyby a tonicko-klonické křeče (HOFÍREK et al., 2009; MUYLAERT et al., 2010).

Abomasitida

Jedná se o jejunální hemoragický syndrom, jehož původcem je *Clostridium perfringens* typu A. Nejčastějším příznakem je hemoragická ulcerace slezu, která se projevuje mírným průjmem, tympanií, občas se vyskytuje kolikovitě bolesti, nadýmání a končí úhynem zvířete (MANTECA et al., 2002; IMMERSEEL et al., 2010).

Hemoragická enteritis

Clostridium perfringens typu A společně s typem D způsobují u odstavených telat hemoragickou enteritis. Stěna jejuny je temně rudá s krvavým obsahem „pulpy kidney“. Onemocnění se projevuje kolikovitými bolestmi. Jedná se o smrtelné onemocnění charakterizované náhlým úhynem zvířete po nakrmení. Příčinou onemocnění je nakrmení telat živinově bohatým krmivem (FINNIE, 2004; LAYANA et al., 2006).

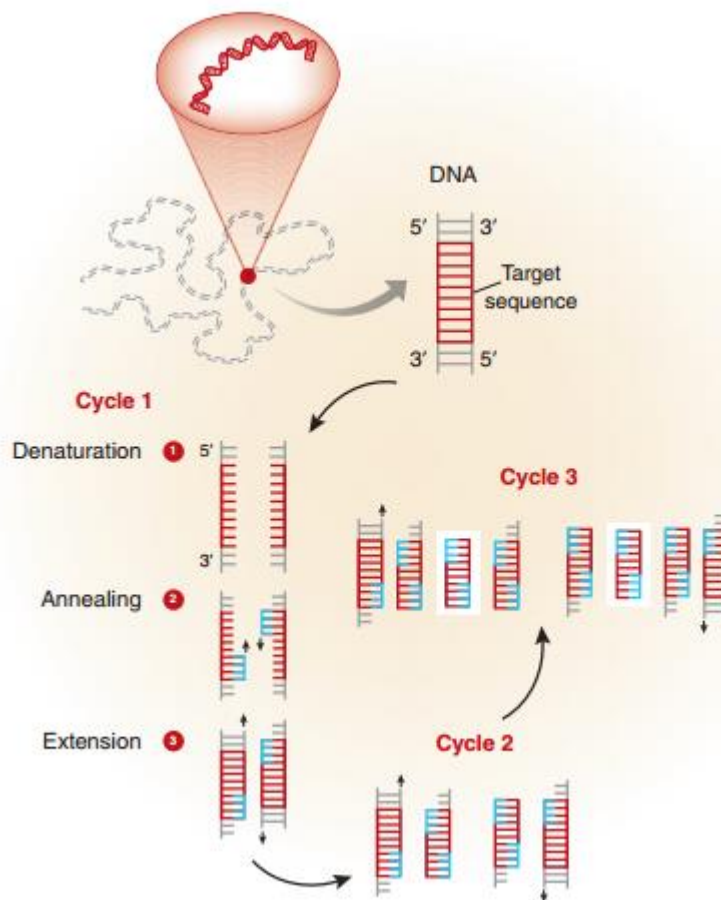
Enterotoxiny *Clostridium perfringens* typu A, C, D jsou rezistentní vůči proteolytickým enzymům a měly by být neutralizovány již ve střevním obsahu. Nejvhodnější formou jsou kolostrální protilátky (KREJČÍ, 2011).

2.6 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction = PCR) se stala standardem pro molekulární diagnostiku mnoha infekčních patogenů (FREULING et al., 2014). Význam metody PCR spočívá ve schopnosti detekovat specifické úseky DNA *in vitro*, což vede k amplifikaci specifické sekvence DNA. Používá se pro zvýšení množství určitého segmentu DNA, který je v malém množství v počátečním vzorku nebo v selektivní amplifikaci jedné sekvence z velkého množství dalších sekvencí DNA. PCR reakční směs obsahuje dvouvláknové DNA, směs nukleotidů, primery a termostabilní DNA polymerázu. Nejčastěji se používá *Taq* polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Primery jsou krátké oligonukleotidové sekvence, které nasedají na cílovou DNA (HADIDI et al., 2003; JULIN, 2014).

Metoda PCR probíhá ve třech základních krocích potřebných pro syntézu DNA. Základní schéma metody PCR je uvedeno na Obr. 1. Nejprve se reakční směs zahřeje na teplotu 94 – 96 °C, aby proběhla denaturace DNA. Dvoušroubovice DNA se rozplétá na dva jednotlivé řetězce. Následuje annealing (hybridizace), kdy se sníží teplota na 50 – 60 °C a dochází k nasedání primeru k denaturované DNA. Vše trvá několik minut. V posledním cyklu extenze (prodlužování) se teplota pohybuje kolem 72 °C (DELIDOW et al., 1993; HADIDI et al., 2003). Dochází k polymeraci hybridizovaných řetězců na základě komplementarity bází (CHEN a JANES, 2002).

Annealing a extenze může záviset na použitém enzymu DNA a na použité specifické sekvenci DNA. Celý proces probíhá ve 30 – 40 cyklech (HADIDI et al., 2003).



Obr. 1: Polymerázová řetězová reakce (GARIBYAN a AVASHIA, 2013)

Nejčastěji používanou metodou pro detekci PCR produktů je agarózová gelová elektroforéza, která odděluje DNA fragmenty na základě jejich velikosti a délky. Během PCR nasedají primery na vybrané sekvenční oblasti a vznikají molekuly stejné sekvenční a délky. Pomocí agarózové gelové elektroforézy putují tyto molekuly stejnou rychlostí. Díky obarvení agarózového gelu je vizualizován jeden specifický fragment. Jeho specifická hmotnost odpovídá předpokládané délce detekované sekvenční oblasti DNA (GARIBYAN a AVASHIA, 2013).

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce „Riziko výskytu klostridií v silážích a ve výkalech dojnic“ bylo zhodnotit vliv rozdílné míry kontaminace rostlinné hmoty povrchovou vrstvou půdy (především bakteriemi rodu *Clostridium* a sporulujícími mikroorganismy) na hygienickou jakost siláží, výživnou hodnotu siláží, kvalitu jejich fermentačního procesu a potvrdit výskyt klostridií v provozních podmínkách.

Prvním cílem práce bylo založit modelový pokus v laboratorních podmínkách a potvrdit či vyvrátit hypotézu, jestli má kontaminace siláží povrchovou vrstvou půdy během sklizně rostlinného materiálu vliv na následný růst klostridií v anaerobních podmínkách siláží. Součástí práce bylo také posouzení vlivu a vhodnosti použití různého typu silážního aditiva při různé míře kontaminace původní hmoty povrchovou vrstvou půdy na růst epifytní mikroflóry, fermentační proces a výživnou hodnotu siláží.

V rámci druhého cíle bylo záměrem potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, zda se klostridie běžně vyskytují v provozních podmínkách, a to v krmivech, zejména v silážích, ve výkalech a v podestýlce (separovaná kejda skotu). Současně byl sledován jejich výskyt v bachorové tekutině, ve stěrech z povrchu struků dojnic a v syrovém mléce.

Třetím cílem práce bylo potvrdit přítomnost bakterie *Clostridium perfringens*, jejichž kolonie byly získány plotnovou metodou selektivním médiem a následně potvrdit detekci druhu bakterie *Clostridium perfringens* metodami molekulární biologie (PCR).

4 MATERIÁL A METODIKA

Pro potvrzení pracovních hypotéz byly v rámci experimentální části disertační práce řešeny tři cíle. Prvním cílem bylo založit modelový pokus, složený ze tří dílčích modelových pokusů (se zavادلou pící jetele lučního a vojtěšky seté o dvou sušinách a ve dvou sečích), s přidavkem povrchové vrstvy půdy a s použitím silážních aditiv pro konzervaci a posílení aerobní stability siláží na výskyt mikroorganismů v modelových silážích.

V rámci druhého cíle byly v praktických podmínkách odebrány vzorky krmiv, bachorové tekutiny, syrového mléka, stěry z povrchu struků dojnic, výkaly a podestýlka (separovaná kejda, dále jen separát) ze dvou podniků pro potvrzení hypotézy možného oběhu klostridií a ostatních nežádoucích mikroorganismů v provozních podmínkách. U prvního i druhého cíle byl vyhodnocen průběh fermentace (obsah sušiny, hodnota pH, KVV, obsah kyseliny mléčné, propionové, máselné, octové, obsah etanolu i amoniaku) a výživná hodnota analyzovaných vzorků (obsah popele, dusíkatých látek, tuku, vlákniny, ADF, NDF a brutto energie).

Součástí třetího cíle bylo detekovat bakterii *Clostridium perfringens* pomocí biochemických testů a metodou molekulární biologie (PCR).

4.1 Příprava vzorků pro modelový pokus

Původní hmota vojtěšky seté (*Medicago sativa*, var. Pálava) a jetele lučního (*Trifolium pratense*, var. Start) byla sklizena v optimální fázi zralosti z pokusných parcel Výzkumného ústavu pícninářského Troubsko (Obr. 2). Odběr pícnin byl proveden vzhledem k aktuálním agronomickým podmínkám. Následně byla hmota ponechána krátce zavadnout. Současně s odběrem zavadlé hmoty pro potřeby homogenizace (teoretická délka řezanky 3 – 4 cm) byl proveden odběr povrchové vrstvy půdy pro potřeby pokusu a mikrobiologický rozbor. Byl založen modelový dvoufaktorový pokus, kde prvním sledovaným faktorem byl přidavek povrchové vrstvy půdy, a druhým sledovaným faktorem bylo ošetření silážními aditivy.



Obr. 2: Sečení vojtěšky seté (zdroj vlastní)

Při přípravě pokusných siláží byla řezanka záměrně kontaminována povrchovou vrstvou půdy, a to v odstupňované dávce 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. Dávky přidávané půdy byly navrženy s ohledem na předpokládaný obsah popelovin v původní hmotě (okolo 8 %/kg sušiny) a na záměr, aby obsah popelovin v kontaminovaných silážích přesahoval 10 %, což je v praxi považováno za hraniční hodnotu obsahu popelovin. Půda ke kontaminaci byla získána z povrchové vrstvy pokusných parcel (maximální hloubka při odběru půdy byla do 1 cm).

Jako druhý pokusný faktor bylo použito biologické silážní aditivum a chemický silážní přípravek. V pokusu bylo použito kromě kontrolní varianty (s přidavkem ekvivalentního množství pitné vody) biologické silážní aditivum (bakteriálně – enzymatický preparát v dávce 20 g/t) a chemický konzervant na bázi organických kyselin v dávce 2 l/t. Schéma pokusu je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2: Schéma pokusu

K0 – kontrola (bez ošetření)	B0 – s přidáním biologického aditiva	CH0 – s přidáním chemického silážního přípravku
K20 – kontrola s přidavkem půdy 20 g/kg sušiny hmoty	B20 – s přidáním biologického aditiva a půdy – 20 g/kg sušiny hmoty	CH20 – s přidáním chemického silážního přípravku a půdy – 20 g/kg sušiny hmoty
K40 – kontrola s přidavkem půdy 40 g/kg sušiny hmoty	B40 – s přidáním biologického aditiva a půdy – 40 g/kg sušiny hmoty	CH40 – s přidáním chemického silážního přípravku a půdy – 40 g/kg sušiny hmoty

Ošetřená hmota (cca 8 kg) byla následně udusána pomocí pneumatického lisu do speciálních silážních nádob (Obr. 3), jejichž konstrukční řešení umožňuje hermetické uzavření a stálé zatížení silážované hmoty.



Obr. 3: Silážní nádoby (zdroj vlastní)

Modelové siláže byly uskladněny v laboratoři o průměrné laboratorní teplotě 24 – 26 °C. Každá varianta pokusné siláže byla vyhotovena ve třech opakováních a vzorky byly analyzovány paralelně. Po uplynutí 3 měsíců po zasilážování byly pokusné nádoby zváženy (z důvodu evidence ztrát hmotnosti během fermentace) a v případě výskytu silážních šťáv evidováno jejich množství. Z každé varianty byl odebrán reprezentativní vzorek pro stanovení obsahu sušiny siláží, mikrobiologickou analýzu, fermentační proces a stanovení obsahu živin. Z každé pokusné silážní nádoby byly vyhotoveny dva výluhy pro hodnocení kvality fermentačního procesu.

4.1.1 Charakteristika pokusného stanoviště a materiálu

Pokusné parcely

Všechny pokusné parcely se nacházely v Troubsku. Vojtěška setá i jetel luční byly pěstovány v teplé mírně suché řepařské výrobní oblasti. Pokusné parcely leží v nadmořské výšce 270 m n. m. Dlouhodobý průměrný roční úhrn srážek je 547 mm, z toho ve vegetačním období 344 mm. Dlouhodobá průměrná roční teplota 8,6 °C, ve vegetačním období 14,8 °C.

Jedná se o půdotvorný substrát zvětralinu hornin mladšího terciéru, převážně luvizemě. Na pokusných pozemcích jsou degradované hnědozemní půdy a zrnitostním složením jsou hlinité až jílovitohlinité s půdní reakcí neutrální, mírně humózní. Pokusné parcely byly průběžně dohnojovány jemně mletým vápencem s dávkou CaO minimálně 0 – 20 t/ha.

Pokusné pícniny

Vojtěška setá byla záměrně zvolená pícnina z důvodu její obtížné silážovatelnosti. Patří mezi pícniny, které jsou často řazeny do krmné dávky dojnic. Z jetelovin má nejvyšší výživnou hodnotu.

Jetel luční patří mezi středně těžce silážovatelnou pícninu, a proto se vyžaduje optimální obsah sušiny. V porovnání s vojtěškou setou má vyšší obsah vodorozpustných sacharidů a méně dusíkatých látek.

Pokud jsou tyto pícniny při procesu silážování nedostatečně udusány nebo nedostatečně zavadnuty, vzniká tak ideální prostředí pro množení nežádoucích mikroorganismů, což vede ke vzniku nežádoucích procesů během vlastní fermentace. Z uvedených důvodů byla po otevření modelových siláží provedena analýza kromě fermentačního procesu a stanovení obsahu živin, také mikrobiologický rozbor.

4.1.2 Použitá silážní aditiva

Biologické silážní aditivum

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

který rozkládá vlákninu. Přípravek je vhodný pro zajištění kvalitního fermentačního procesu obtížně silážovatelných píce a pro zlepšení stravitelnosti silážované hmoty. Dávkování bylo dle doporučení výrobce 20 g/t píce. Biologické silážní aditivum bylo rozpuštěno v odpovídajícím množství destilované vody a aplikováno do zavadlé hmoty rostlinného materiálu. Následně bylo vše před silážováním důkladně homogenně promícháno.

Chemický silážní přípravek

V modelových pokusech byl použit chemický silážní přípravek na bázi organických kyselin a solí pro těžce a středně těžce silážovatelnou píci v dávce 2 l/tunu píce. Účinnými látkami uvedeného chemického silážního přípravku jsou kyselina mravenčí (43 %), mravenčan amonný (30 %), kyselina propionová (10 %) a kyselina benzoová (2 %).

4.2 Charakteristika sledovaných provozů

Výběr obou sledovaných provozů chovu skotu pro sledování byl proveden po odborné konzultaci s veterinárním lékařem, který upozornil na problém výskytu klostridií.

Provoz A

Zemědělský podnik, nacházející se v kraji Vysočina, jehož nosným odvětvím je živočišná a rostlinná výroba. V živočišné výrobě je hlavním zaměřením chov českého strakatého skotu. Celkový počet dojených krav v podniku byl 880 s průměrnou mléčnou užitkovostí 7500 kg na laktaci. Do sledování bylo zahrnuto 8 dojnic na první až třetí laktaci. Ustájení bylo řešeno jako volné boxové s podestýlkou ze separované kejdy skotu a roštovou hnojnou chodbou. Separát byl volně ložený v areálu provozu. Systém krmení byl pomocí směsné krmné dávky (TMR), která byla zakládána ráno a večer.

Provoz B

Zemědělské družstvo v kraji Vysočina, které se zabývá rostlinnou i živočišnou výrobou. Z hlediska živočišné výroby se zaměřují na chov českého strakatého skotu.

Aktuální počet ustájených dojnic byl 186 s průměrnou mléčnou užitkovostí 7700 kg na laktaci. Vzorky byly odebrány od šesti dojnic na první až třetí laktaci. Dojnice byly krmeny směsnou krmnou dávkou (TMR). Stejně jako u provozu A bylo ustájení volné boxové a jako podestýlka byla používána upravená separovaná kejda skotu jako plastické stelivo, které bylo před stláním volně loženo.

4.3 Statistické vyhodnocení

Výsledky analýz byly statisticky zpracovány metodou analýzy variance a rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny Scheffeho testem při hladině významnosti ($P < 0,05$) podle SNEDECOR a COCHRAN (2012). Byly sledovány rozdíly mezi všemi variantami a rozdíly mezi variantami s přidavkem povrchové vrstvy půdy, biologického silážního aditiva a chemického silážního přípravku. Statisticky průkazné rozdíly jsou uvedeny v tabulce pomocí indexů. Varianty se stejnými indexy nejsou statisticky průkazné. Data jsou v textu prezentována jako průměr a směrodatná odchylka.

4.4 Odběr vzorků z provozních podmínek

Odběr krmiv

Vzorky krmiv v provozních podmínkách byly odebrány dle vyhlášky č. 415/2009 Sb., o stanovení požadavků na odběr vzorků a způsobu zveřejnění metod laboratorního zkoušení produktů ke krmení.

Stěry z povrchu struků

Byly provedeny před dojením pomocí sterilního vatového tampónu, který byl zvlhčen sterilním ředícím roztokem. Použitím přiměřeného tlaku a otáčením tampónu byl proveden stěr z povrchu struků. Následně byla sterilně oddělena násada stěrky zlomením o hrdlo zkumavky, ve které byl původně tampón uložen. Po odběru byly vzorky uloženy do chladicího boxu.

Odběr syrového kravského mléka

Po omytí a dezinfekci struků dezinfekčním přípravkem byly první stříky mléka odstraněny a následně odebrán vzorek syrového kravského mléka do 250 ml sterilní plastové zkumavky.

Odběr bachorové tekutiny

Odběr bachorové tekutiny (Obr. P24) byl proveden ve stáji po fixaci dojnice nosním skřípem. Odběr byl uskutečněn metodou popsanou HOFÍRKEM a DVOŘÁKEM (2002) za účasti veterinárního lékaře pomocí jícnové sondy, která byla napojena na podtlakovou ruční pumpu.

Odběr výkalů

Výkaly byly odebrány veterinárním lékařem *per rectum* do sterilní uzavíratelné nádoby o objemu 250 ml.

Odběr podestýlky (separována kejda)

Vzorek byl odebrán z volně loženého separátu (Obr. P22) stejným způsobem jako volně ložená krmiva podle vyhlášky č. 415/2009 Sb., o stanovení požadavků na odběr vzorků a způsobu zveřejnění metod laboratorního zkoušení produktů ke krmení.

4.5 Mikrobiologická analýza modelových siláží a vzorků z provozních podmínek

Pomocí mikrobiologické analýzy byly stanoveny sporulující mikroorganismy, *Clostridium perfringens*, celkový počet mikroorganismů (CPM), bakterie mléčného kvašení (BMK), bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, plísně a kvasinky.

Příprava laboratorních pomůcek

Erlenmeyerovy baňky, uzavřené hliníkovou folií, se 180 ml destilované vody společně se zkumavkami, uzavřeny víčkem, s destilovanou vodou 9 ml byly sterilizovány v parním sterilizátoru Tuttnauer při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Skleněné pipety (1 a 2 ml) byly zabaleny do hliníkové fólie a následně sterilizovány. Ostatní laboratorní sklo bylo sterilizováno pomocí horkovzdušného sterilizátoru při teplotě 165 °C po dobu 60 minut.

Použitá média, jejich příprava a inkubace vzorků

Byly stanovovány skupiny mikroorganismů: klostridie, sporulující mikroorganismy, CPM, BMK, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, plísně a kvasinky.

Bakterie rodu Clostridium

Živná půda – TSN agar = Tryptone Sulfite Neomycin Agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Selektivní médium pro izolaci a předpokládanou identifikaci *Clostridium perfringens*.

- Složení – trypton, kvasničný extrakt, siřičitan sodný, citronan amonno-železitý, neomycin sulfát, polymixin B sulfát, bakteriologický agar.
- Příprava – 40,0 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na $7,2 \pm 0,2$, sterilizace 121 °C po dobu 15 minut.
- Inkubace vzorků probíhala 24 hodin při teplotě 46 °C v anaerobním prostředí.

Počet sporulujících mikroorganismů

Živná půda – PCA agar = Plate Count Agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – trypton, kvasničný extrakt, glukóza, agar.
- Příprava – 21,5 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 7,0, sterilizace 121 °C po dobu 15 minut.
- Inkubace vzorků – na živné půdě za 48 – 72 hodin při teplotě 30 °C v anaerobním prostředí a po pasteraci 85 °C 10 min. Jedná se o termorezistentní fakultativně anaerobní mikroorganismy.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) ČSN ISO 6610

Živná půda – PCA agar = Plate Count Agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – trypton, kvasničný extrakt, glukóza, agar.
- Příprava – 21,5 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 7,0, sterilizace 121 °C po dobu 15 minut.
- Inkubace vzorků probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin.

Počet kvasinek a plísní ČSN ISO 6611

Živná půda – Chloramphenicol glucose agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – kvasničný extrakt, glukóza, chloramfenikol, agar.
- Příprava – 40,1 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 6,6, sterilizace 121 °C po dobu 15 minut.
- Inkubace vzorků – 120 hodin při teplotě 25 °C.

Počet mezofilních bakterií mléčného kvašení (BMK)

Živná půda – MRS agar = de Man, Rogosa and Sharpe (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – polypepton, masový extrakt, glukosa, Tween 80, hydrogenfosforečnan draselný, octan sodný, citronan amonný, síran hořečnatý, síran manganatý.
- Příprava – 55,3 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 6,4 a následná sterilizace (121 °C po dobu 15 minut).
- Inkubace vzorků – při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Počet bakterií čeledi Enterobacteriaceae ČSN ISO 21528

Živná půda – VRBG agar = Violet Red Bile Green Agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – masový extrakt, kvasničný extrakt, glukosa, žlučové soli, chlorid sodný, neutrální červeň, krystalová violet', agar.
- Příprava – 38,5 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 7,4, vaření do úplného vyčiření.
- Inkubace vzorků – při 37 °C po dobu 24 h.

Počet bakterií rodu Enterococcus

Živná půda – Compass Enterococcus agar (Biokar Diagnostics, Francie):

- Složení – pepton, kvasničný extrakt, chlorid sodný, Tween 80, inhibiční látky, x-glukosid, agar.
- Příprava – 52,9 g/l sypké půdy do 1 l sterilované destilované vody, kalibrace pH na 7,5 a následná sterilizace (121 °C po dobu 15 minut).
- Inkubace vzorků – při teplotě 44 °C po dobu 24 hodin.

Tekuté médium pro pomnožení mikroorganismů

Živná půda – TSA = Tryptone-Soya Broth agar (Biokar Diagnostic, Francie):

- Složení – trypton, chlorid sodný, enzymatické stráveniny kaseinu a sojové moučky, glukóza.

- Příprava půdy – 9,5 g/l sypké půdy do 1 l sterilní destilované vody, kalibrace pH na 7,0 a následná sterilizace (121 °C po dobu 15 minut).

Anaerobní prostředí

Anaerobní prostředí bylo vytvořeno pomocí Anaerocultu A, vloženého do anaerobního hrnce obsahujícího složky, které chemicky vážou kyslík a vytváří se prostředí s CO₂.

Do anaerobní hrnce byly vloženy naočkované Petriho misky se vzorky na TSN agaru (pro stanovení *Clostridium perfringens*) a PCA agaru (pro stanovení sporulujících mikroorganismů). Plotna Anaerocultu byla navlhčena 35 ml destilované vody a vložena k miskám do anaerobního hrnce. Hrncel byl hermeticky utěsněn a uložen k inkubaci za příslušné teploty a času.

Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza jednotlivých vzorků, pokusných modelových siláží i vzorků z provozních podmínek, byla provedena podle příslušných norem a doporučení. Při mikrobiologické analýze byly nejprve vzorky naváženy na přesně stanovenou hmotnost (20 g vzorku) a spolu se 180 ml fyziologického roztoku třepány 10 minut na třepáče (Heidolph Promax 1020). Poté bylo připraveno desetinásobné ředění a očkovan vzorek o objemu 1 ml pomocí skleněné či automatické pipety. Byla použita metoda přímého výsevu do kultivačního media (zalití 1 ml příslušeno ředění vzorku danou půdou).

Pro každý vzorek a pro jednotlivý mikroorganismus byla zvolena dvě ředění ve dvou opakováních. Následně byly vzorky inkubovány. Teploty, časy a živné medium pro jednotlivé mikroorganismy se liší.

Po inkubaci v termostatu (Biological Thermostat BT 120) se počet vyrostlých bakterií stanovil odečtením narostlých kolonií z Petriho misek. Výsledky analýz byly vyjádřeny v KTJ (= kolonie tvořící jednotky) na gram siláže. Mikrobiologický rozbor modelových siláží probíhal na Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin Mendelovy univerzity v Brně.

Obrázky jednotlivých agarů s narostlými koloniemi mikroorganismů jsou uvedeny v příloze Obr. P16 až P21.

4.6 Laboratorní metody

Po otevření silážních nádob byl z každé nádoby odebrán homogenní reprezentativní vzorek na stanovení obsahu sušiny, na přípravu výluhů a usušení vzorků pro stanovení obsahu živin. Samostatně byla siláž odebrána pro mikrobiologický rozbor. Základní živiny byly stanovovány podle vyhlášky 415/2009 Sb., o stanovení požadavků na odběr vzorků a způsobu zveřejnění metod laboratorního zkoušení produktů ke krmení.

Odebrané vzorky po vysušení při teplotě 55 °C a pomletí byly připraveny pro laboratorní analýzu na Ústavu výživy zvířat a pícninářství Mendelovy univerzity v Brně. A připravené výluhy podrobeny analýze v S.O.S. Skalice nad Svitavou, s.r.o.

Příprava výluhů

Po otevření siláží byl odebrán vzorek o hmotnosti 50 g a zalit 450 ml destilované vody pro stanovení ukazatelů fermentace. Po 24 hodinách byl výluh zfiltrován přes filtrační papír (FILTRAK 388).

Stanovení obsahu sušiny

Pro stanovení obsahu sušiny byly odebrány z celé silážní nádoby celkem tři dílčí vzorky a vysušením vzorku pokusných modelových siláží vojtěšky seté a jetele lučního do konstantní hmotnosti při teplotě 103 ± 2 °C byl stanoven obsah sušiny.

Stanovení obsahu popelovin

Stanovení obsahu popelovin bylo vážkově po zpopelnění vzorku do konstantní hmotnosti při teplotě 550 °C a zvážením zbytku (AOAC, 1990).

Stanovení dusíkatých látek

Pro stanovení obsahu dusíkatých látek byla použita metoda dle Kjehdala. Stanovení bylo pomocí přístroje Kjeltec 2300 a při výpočtu vynásobeno koeficientem 6,25 (AOAC, 1990).

Stanovení tuku

Pro stanovení obsahu tuku byl použit extrakční přístroj podle Soxhleta. Samotné stanovení probíhalo přímou extrakcí vzorku petroléterem.

Stanovení obsahu vlákniny

Obsah vlákniny byl stanoven na přístroji Fiber Analyzer (ANKOM 220) za použití dvoustupňové hydrolýzy v roztoku kyseliny sírové, separaci pevného zbytku, a hydroxidu sodného, po promytí acetonem a následném odečtením popela tohoto zbytku.

Stanovení vlákninových frakcí ADF, NDF

Frakce ADF i NDF byly stanoveny na přístroji Fiber Analyzer (ANKOM 220) a jejich obsah byl zjištěn pomocí detergentů. Pro ADF byl použit cetyltrimethylamonium bromidu a pro NDF byl použit laurylsulfát sodný (AOAC, 1990).

Stanovení obsahu energie

Spálením vzorků v kyslíkové atmosféře byla zjištěna kalorimetricky brutto energie.

Stanovení hodnoty pH

Pomocí digitálního přístroje pH metru (PRECISION DIGITAL pH METER OP – 208/1) byla elektrometricky stanovena ve vodním výluhu koncentrace vodíkových iontů (pH).

Stanovení kyselosti vodního výluhu (KVV)

Pro výpočet kyselosti vodního výluhu (KVV) byla využita rovnice $KVV \text{ (mg KOH/100g)} = \text{spotřeba NaOH (ml)} \times 56,108 \times f \text{ NaOH}$, kde spotřeba NaOH byla stanovena titrací připraveného výluhu 0,1 N NaOH o známém faktoru až do hodnoty pH 8,5.

Množství kvasných kyselin a alkoholu

Obsah kyseliny mléčné, těkavých mastných kyselin a alkoholu byl analyzován z vodního výluhu na plynovém chromatografu metodou podle HARTMANA (1974).

Stanovení obsahu amoniaku

Amoniak byl stanoven mikrodifúzní metodou při laboratorní teplotě pomocí Conwayových misek po dobu 24 hodin, kdy byl poté přidán Tashir indikátor a vše bylo titrováno 0,05 N kyseliny sírové do slabě růžového zbarvení a následně byl vypočítán procentický obsah amoniaku dle vzorce:

$$\text{NH}_3 (\%) = \text{spotřeba } 0,05 \text{ N H}_2\text{SO}_4 \times 0,0918 \times f \text{ H}_2\text{SO}_4$$

Teplota

Na základě průběhu změny teploty, sledované pomocí teplotních sond umístěných do pokusných vzorků v aerobním prostředí, byl zaznamenán vývoj teplot. Průběh teplot byl sledován po dobu pěti dní v hodinových intervalech.

4.7 Izolace mikroorganismů pro další analýzy

Z bakterií rodu *Clostridium* byly získány izoláty pomocí mikrobiologické analýzy vzorků krmiv, siláží, bachorové tekutiny, výkalů a separátu (separovaná kejda skotu). Z vybraných Petriho misek byly pomocí očkovací kličky vybrány černé kolonie sulfidredukujících klostridií. Následně byly přeočkovány křížovým roztěrem na nové Petriho misky s TSN agarem a kultivovány v anaerobním prostředí. Byl získán přečištěný bakteriální kmen sulfidredukujících klostridií. Vytvořené přečištěné izoláty byly odebrány z Petriho misek a pomnoženy v tekutém médiu TSB agar (Biokar Diagnostic, Francie) s vrstvou parafinového oleje.

Všechny pomnožené izoláty klostridií (Tab. 3) byly uchovány v anaerobním prostředí při teplotě 6 °C. Zbylé Petriho misky byly zabaleny do hliníkové fólie a uloženy do chladničky, aby bylo zabráněno vysychání a kontaminaci vzorků.

Tab. 3: Izoláty klostridií

Číslo izolátu	Vzorek	Provoz
5	Výkaly	A
6	Bachorová tekutina	A
9	Výkaly	A
21	Výkaly	B
22	Separát	B
34	Jetel luční	Modelová siláž

4.8 Identifikace rodu *Clostridium* pomocí biochemických testů

Identifikace izolátů bakterií rodu *Clostridium* byla provedena za pomoci identifikačního kitu ANAEROTest 23 (Erba Lachema, Česká republika). Testy slouží k identifikaci anaerobních bakterií a umožňují provést identifikaci kmenů pomocí 23 biochemických testů. Testy pro identifikaci jednoho kmene jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky, vždy tři řady po osmi jamkách.

Vlastnímu biochemickému testu předcházelo Gramovo barvení.

Gramovo barvení

Gramovo barvení využívá rozdílů v chemickém složení buněčné stěny gram pozitivních a gram negativních bakterií. Nejprve byl připraven fixovaný preparát, následně ponořen do krystalové violeti, Lugolova roztoku, karbolfuchsinu a vždy po obarvení byl preparát opláchnut slabým proudem vody. Po obarvení byl osušen pomocí filtračního papíru. Obarvený preparát byl sledován pod mikroskopem při zvětšení 100×.

Po Gramově barvení byla připravena v suspenzním mediu ANAEROTest 23 suspenze čisté 48 hodinové kultury. Následovala kalibrace na 3. stupeň zákalu McFarlandovy stupnice pomocí densimetru. Další postup byl podle přiloženého návodu komerčního testu.

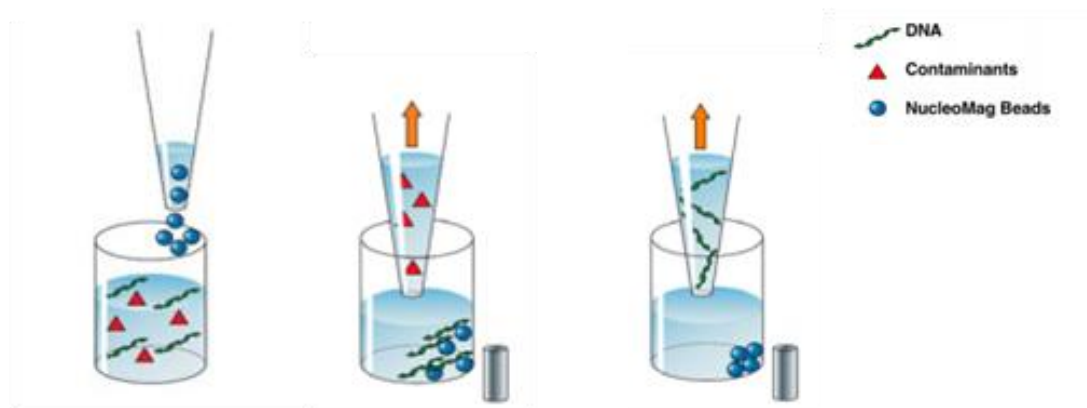
Po inkubaci byly odečteny a vyhodnoceny výsledky barevných reakcí dle přiložené šablony a pomocí programu TNW 7.0 (MikroLaTest, Česká republika) byl určen druh bakterie.

4.9 Izolace DNA pomocí magnetických kuliček

Aby mohl být studován bakteriální genom, musí být nejprve izolována DNA ze zkoumaných mikroorganismů. V první fázi je buněčná stěna bakterie narušena přidávkem lysozymu. V další fázi izolace jsou separovány molekuly DNA od zbytků buněčných struktur pomocí magnetických kuliček (Obr. 4), které jsou schopny na sebe adsorbovat jednotlivé molekuly DNA. Podle hodnoty pH prostředí dochází k navázání pozitivně nabitých magnetických kuliček (při pH pod 6,5) se záporně nabitou DNA. Ostatní látky obsažené v bakteriální buňce se na magnetické kuličky nevážou a jsou následně odplaveny promývacím pufrům. Po neutralizaci povrchu magnetických kuliček pomocí pufru o pH 8,5 dochází k eluci nukleových kyselin, purifikovaná DNA se uvolní a přechází do pufru. Následně byl pro izolaci DNA použit kit chargeSwitch gDNA Mini Bacteria, Invitrogen (USA), složení uvádí výrobce.

0,5 ml 24 hodinové kultury bylo odstředěno při otáčkách 10 000 (Boeco M-24OR, Německo) po dobu 2 minut a následně byl ze zkumavek odsán supernatant. Paleta s mikroorganismy byla homogenizována se 100 μ l roztoku Resuspended Buffer with RNase a bylo přidáno 50 mg/ml (5 μ l) roztoku lysozymu. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 10 minut a dále bylo přidáno 500 μ l Lysis Buffer a 10 μ l proteinasy K. Proběhla druhá inkubace při teplotě 55 °C po dobu 10 minut, kdy došlo k dokonalé lyzi buněk.

Po inkubaci byla zkumavka se zásobním roztokem magnetických kuliček s ChargeSwitch Magnetic Beads, který byl přidán ke každému vzorku (40 μ l), dokonale protřepána a dále bylo přidáno 300 μ l Binding Buffe. Po inkubaci (1 minutu při pokojové teplotě) byl vzorek umístěn na magnet (DynaMAGTM-Spin, Invitrogen, USA). Po vytvoření pevné palety byl vzorek vyčiřen a došlo k odsátí supernatantu pomocí pipety.



Obr. 4: Izolace DNA pomocí magnetických kuliček (MACHEREY-NAGEL, 2003)

Promytí DNA bylo provedeno ihned po přichycení DNA na magnetické kuličky. Následně byla peleta protřepána s 1 ml Wash Bufferu a opětovně umístěna na magnet a supernatant byl odstraněn. Postup promytí byl zopakován několikrát. Následně byl vzorek protřepán a promyt 210 μ l Elution Buffer. Následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě (pro zvýšení výtěžnosti byla využita teplota 55 °C). Po inkubaci byl vzorek umístěn na magnet a ponechán v klidu do doby, než se utvořila pevná peleta. Supernatant byl jímán do nové zkumavky a označen.

Po izolaci bakteriální gDNA čisté kultury byla stanovena výtěžnost pomocí přístroje NanoPhotometerTM Pearl (Implen, Německo). Pracuje na podobném principu jako spektroskopie a detekuje koncentrace vzorku. Pro detekci stačí aplikaci vzorků již od 0,3 μ l (Obr. 5).



Fig. 2. Sample Compression Technology™ used in the NanoPhotometer™ Pearl.



Fig. 3. Handling of NanoPhotometer™ Pearl

Obr. 5: Princip aplikace vzorku na přístroj NanophotometerTM Pearl (RIEPL et al., 2011)

Po rozmíchání vzorku ve zkumavce pomocí vortexu (1 – 2 sekundy) byl odebrán 1 µl vzorku a nanesen na přijímací vlákno optického kabelu. Konec optického kabelu (přijímací vlákno) bylo zakryto víčkem s faktorem 50. Dle pokynů výrobce byl přístroj uveden do provozu. Jako blank byl zvolen eluční pufr, který tvořil základ roztoku.

Výsledkem měření pomocí paprsku procházejícího vzorkem byla koncentrace gDNA v mg/ml. Zjištění výtěžnosti DNA sloužilo k potvrzení přítomnosti gDNA a byla tak vyloučena případná negativní reakce při PCR.

4.10 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Rekonstituce primerů

Zkumavka s lyofylizátem primeru (syntetické oligonukleotidy ohraničující sekvenci zkoumaného úseku DNA) byla doplněna TE pufrem (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Počet µl pufru je uveden v Tab. 4. Roztok byl ponechán v klidu po dobu dvou minut a následně 15 sekund homogenizován na vortexu.

Tab. 4: Primery genu pro 16S rRNA (Wu et al., 2009)

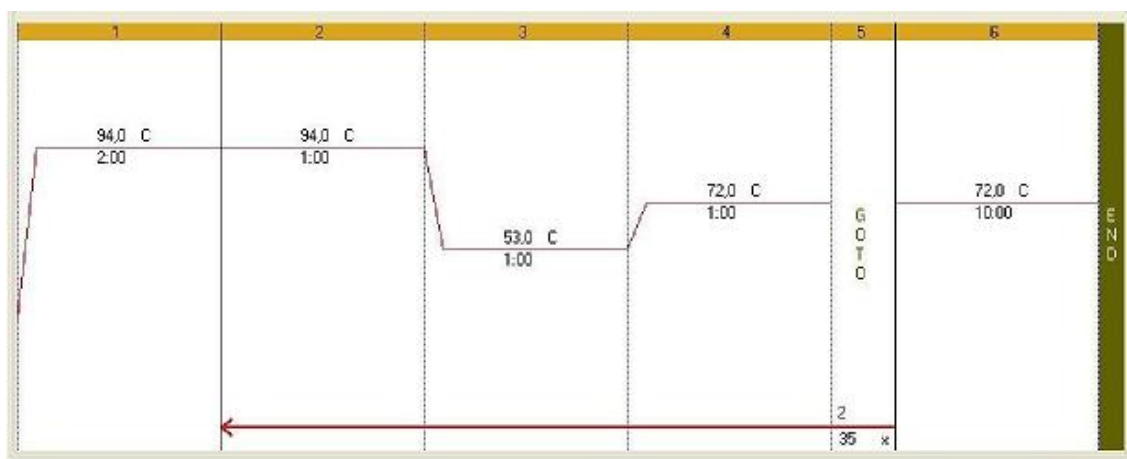
Primer	Sekvence primeru	Množství přidaného TE pufru v µl	Délka sekvence (bp)	Specifikace
16S rRNA gene F	5'– AAGATGGCAT CATCATTCAAC – 3'	281	279	<i>Clostridium perfringens</i>
16S rRNA gene R	5'– TACCGTCATTA TCTTCCCCAAA – 3'	280		

bp – páry bází

Polymerasová řetězová reakce pro identifikaci bakterie *Clostridium perfringens* pomocí genu 16S rRNA

Do sterilních mikrozskumavek bylo napipetováno 20 µl Platinum blue PCR SuperMix (InvitrogenTM, USA), 1,5 µl 16S rRNA gene F, 1,5 µl 16S rRNA gene R primeru a 2 µl templátové DNA (vzorek). Po zapnutí thermocycleru MJMini

Optikon (Bio-Rad, USA) byl nastaven program s teplotním profilem (Obr. 6): 94 °C 2 minuty pro denuraci hot start polymerasy, dále 35 cyklů 94 °C 1 minutu (denaturace), 53 °C 1 minutu (annealing – nasedání primerů), 72 °C 1 minutu (extenze – prodlužování řetězce DNA) a závěrečná extenze při 72 °C 10 minut (WU et al., 2009).



Obr. 6: Teplotní profil PCR reakce (zdroj vlastní)

4.10.1 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů

Pro separaci a rozlišení délky lineárních DNA a RNA fragmentů (ARMSTRONG a SCHULZ, 2008) byla použita agarózová elektroforéza.

Nejprve byl připraven agarózový gel, kde 1,4 g agarózy (Serva Electrophoresis, Německo) bylo smícháno se 140 ml 1× TBE pufru (Amplikon, USA). Po zchládnutí gelu na teplotu 50 – 60 °C byly napipetovány 2 µl barviva Midori Green DNA stain (Nippon Genetics, Německo).

Po nalití gelu do elektroforetické vany Owl EASYCAST™ B2 (Thermo Scientific, USA) byl do ní umístěn speciální hřebínek pro vytvoření jamek. Jamky byly orientovány směrem ke katodě z důvodu, že DNA vykazuje záporný náboj. Jako elektrolyt byl použit TBE pufr, kterým byl gel zalit.

Do první vytvořené jamky byl napipetován standard, který vytvořil srovnávací žebříček. Byl vytvořen smícháním 10 µl BlueJuice Gel loading buffer (Invitrogen™, USA) s 2 µl 250 bp DNA Ladder (Invitrogen™, USA). Do ostatních jamek byly napipetovány pokusné vzorky získané z izolované bakteriální DNA po PCR reakci pro gen 16S rRNA. Původní pokusné vzorky pocházely z výkalů z provozu A, bachorové tekutiny z provozu A, výkalů z provozu B, separovan kejda z provozu B, siláže ze

zavadlé píče jetele lučního. Do předposlední jamky byla umístěna pozitivní kontrola (ověření funkčnosti metody) obsahující 16S rRNA gen izolátu *Clostridium perfringens* CCN 4991 Česká sbírka mikroorganismů a do poslední jamky negativní kontrola (ověření případné kontaminace).

Elektroforetická vana byla připojena na napětí 85 V po dobu 70 minut. Postupně docházelo k separaci fragmentů DNA na základě jejich velikosti. Po ukončení doby elektroforézy byl gel vložen do Gel Logic 212 Pro (CareStream, Kanada). Pomocí UV záření byl gel prosvícen a v místech, kde byly obsaženy fragmenty DNA, došlo k emisi záření. Pomocí programu CareStream II (CareStream, Kanada) byl obraz gelu přenesen do digitální podoby.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V první experimentální části disertační práce probíhaly tři modelové pokusy v letech 2011 – 2013, kde byly v laboratorních podmínkách vyráběny modelové siláže. Byl sledován vliv přídavku povrchové vrstvy půdy a současně vliv silážních aditiv na snížení počtu klostridií, sporulujících mikroorganismů a ostatních mikroorganismů.

Druhá část práce byla zaměřena na ověření, jestli se klostridie vyskytují v provozních podmínkách.

V poslední části byl potvrzen výskyt *Clostridium perfringens* pomocí PCR.

Schéma experimentální části:

I. část – Modelový pokus v laboratorních podmínkách

Rostlinný materiál:

- Modelový pokus I. – jetel luční v roce 2011.
- Modelový pokus II. – vojtěška setá v roce 2012 konzervována s rozdílným obsahem sušiny.
- Modelový pokus III. – vojtěška setá v roce 2013 sklizena v první a druhé seči.

Ošetření siláží:

- biologické silážní aditivum,
- chemický silážní prostředek.

Rozbory:

- mikrobiologická analýza,
- aerobní stabilita,
- fermentační proces,
- výživná hodnota.

II. část – Monitoring provozních podmínek

Odběr vzorků:

- krmiv,
- bachorové tekutiny,
- stěry z povrchu struků,
- syrové mléko,
- výkaly,
- podestýlka (separovaná kejda jako plastické stelivo).

Rozbory:

- mikrobiologická analýza,
- aerobní stabilita,
- fermentační proces,
- výživná hodnota.

III. část – Detekce klostridií

- Gramovo barvení,
- biochemické testy,
- PCR.

Mikrobiologická analýza biologického silážního aditiva

Současně s mikrobiologickým rozbořem všech pokusných vzorků bylo analyzováno biologické silážní aditivum pro srovnání s hodnotami počtu mikroorganismů, které uvádí výrobce na obalu. Výsledné hodnoty mikrobiologického rozboru jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Počty mikroorganismů v biologickém silážním aditivu v KTJ/g

Počty mikroorganismů	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	celkem
Dle výrobce	$3,75 \times 10^9$	$3,75 \times 10^9$	$5,00 \times 10^9$	$1,25 \times 10^{10}$
Mikrobiologická analýza	$7,91 \times 10^9$	$5,64 \times 10^9$	$7,50 \times 10^9$	$2,11 \times 10^{10}$

Celkový počet BMK v biologickém silážním aditivu byl pomocí mikrobiologické analýzy stanoven celkem na $2,11 \times 10^{10}$ KTJ/g. GOLLOP et al. (2005) konstatují, že pro biologické silážní aditivum by měl být dostačující 1×10^6 životaschopných buněk BMK.

Výrobce uvádí, že celková koncentrace bakterií v biologickém silážním aditivu by měla být $1,25 \times 10^{10}$ KTJ/g. Dle výsledků uvedených v Tab. 5 počty mikroorganismů obsažených v biologickém silážním aditivu odpovídají hodnotám, které uvádí výrobce.

5.1 Modelový pokus v laboratorních podmínkách

V průběhu roku 2011 – 2013 byly uskutečněny celkem 3 modelové pokusy (1 pokus na jeteli lučním a 2 pokusy na vojtěšce seté). Rostlinný materiál byl před silážováním experimentálně kontaminován povrchovou vrstvou půdy spolu s použitím silážních aditiv. Statistické hodnocení bylo provedeno jen u hlavních sledovaných mikroorganismů (sporulujících mikroorganismů – spory klostridií, bacilů) a u charakteristik fermentačního procesu.

5.1.1 Modelový pokus I. – jetel luční

Mikrobiologická analýza

Sporulující mikroorganismy vytvářejí v silážích endospory, které tvoří z velké části rod *Clostridium* (zejména *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*), ale současně se mohou vyskytovat v této formě i bakterie rodu *Bacillus* (DRIEHUIS a ELFERINK, 2000; VISSERS et al., 2007a; MACIOROWSKI et al., 2007). Původní nezavdlá hmota jetele lučního použitého k silážování obsahovala $1,32 \times 10^1$ KTJ/g sporulujících mikroorganismů a *Clostridium perfringens* zde nebylo zjištěno. JATKAUSKAS a VROTNIAKIENE (2011) ve své studii zaměřené na směs jetele lučního a jílku vytrvalého (1:1) zjistili přítomnost klostridií již v původní píci v množství menší než 10^1 KTJ/g. V povrchové vrstvě půdy bylo nalezeno 8 KTJ/g *Clostridium perfringens* a $1,46 \times 10^1$ KTJ/g sporulujících mikroorganismů. RADA a VLKOVÁ (2010) společně s DUNIÈRE et al. (2013) také potvrzují výskyt klostridií v půdě.

Po otevření pokusných nádob a následné mikrobiologické analýze vzorků siláží ze zavdlé píce jetele lučního (dále jen jetelová siláž) byl zjištěn výskyt *Clostridium perfringens* u varianty B40 v množství $2,70 \times 10^1$ KTJ/g siláže. JATKAUSKAS a VROTNIAKIENE (2011) potvrzují výskyt klostridií v silážích o sušině 265,10 g/kg stejně jako u uvedených modelových jetelových siláží o průměrné sušině 208,81 g/kg. U ostatních ošetřených i neošetřených variant siláží nebyl jejich výskyt potvrzen. Lze tedy konstatovat, že výskyt klostridií v povrchové vrstvě půdy, kterou byla uměle

kontaminována zavadlá hmota jetele lučního v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty měl vliv vyššího množství půdy (40 g/kg sušiny hmoty) na výskyt klostridií v silážích. Jednalo se zejména o siláže ošetřené biologickým silážním aditivem, které neměly dostatečně inhibiční vliv na klostridie oproti silážím ošetřených chemickým silážním přípravkem. JANSSON (2005) testovala vliv biologického silážního aditiva obsahujícího čtyři kmeny bakterií mléčného kvašení (BMK) na výskyt klostridií (jednoho kmene *Clostridium butyricum* a tří kmenů *Clostridium tyrobutyricum*) v silážích z trav a zjistila, že všechny čtyři testované kmeny BMK byly schopny inhibovat nejméně dva kmeny klostridií. V uvedeném modelovém pokusu jetelových siláží inhibovalo biologické silážní aditivum s kmeny BMK (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*) růst klostridií (*Clostridium perfringens*) u kontrolní varianty a u varianty s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty. BMK však neinhibovaly růst *Clostridium perfringens* u varianty s vyšším přidavkem povrchové vrstvy půdy (40 g/kg sušiny hmoty).

Nejvyšší počty sporulujících mikroorganismů v silážích s přidavkem povrchové vrstvy půdy i po ošetření silážními aditivy dosahovaly hodnot řádově 10^1 KTJ/g. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 6. Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že po přidání povrchové vrstvy půdy k silážované hmotě se nezvýšil počet sporulujících mikroorganismů. Statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) počet sporulujících mikroorganismů (o 54,5 %) byl u varianty ošetřené biologickým silážním aditivem (B) ve vztahu ke kontrolní skupině (K) a mezi variantami B40 a K20. HONIG (1991) uvádí, že koncentrace spor klostridií vyšší než 1×10^5 KTJ/g siláže je predispozicí pro problémy s aerobní stabilitou siláží. RADA (2009) uvádí, že nejvíce se spory klostridií vyskytují v anaerobně nestabilních silážích a silážích ze zavadlé píce, zejména vojtěškové a travní.

Výskyt *Clostridium perfringens* koresponduje se statisticky průkazně vyšším ($P < 0,05$) počtem sporulujících mikroorganismů u varianty B40.

Tab. 6: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů v jetelových silážích v KTJ/g

Vliv	Varianta	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	17	5,05	a
	20	12	6,10	a
	40	15	6,48	a
Ošetření	K	11	6,01	a
	CH	15	6,02	ab
	B	17	4,77	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	16	4,72	ab
	CH0	20	6,17	ab
	B0	14	4,37	ab
	K20	5	7,07	a
	CH20	16	3,21	ab
	B20	16	1,80	ab
	K40	14	3,60	ab
	CH40	9	1,41	ab
	B40	23	1,41	b

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidáním povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Kromě sporulujících mikroorganismů a klostridií byly analyzovány pokusné modelové jetelové siláže pro zjištění celkového počtu mikroorganismů (CPM), BMK, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, plísní a kvasinek (Tab. 7).

Tab. 7: Průměrné hodnoty ostatních skupin mikroorganismů v jetelových silážích v KTJ/g

Varianta	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Bakterie čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>
K0	$2,52 \times 10^6$	$2,09 \times 10^7$	$1,80 \times 10^3$	$1,27 \times 10^4$	$1,60 \times 10^1$
K20	$2,53 \times 10^6$	$1,73 \times 10^7$	$4,32 \times 10^2$	$2,73 \times 10^2$	$7,50 \times 10^1$
K40	$4,08 \times 10^6$	$2,65 \times 10^7$	$5,91 \times 10^2$	$1,82 \times 10^2$	$2,02 \times 10^3$
B0	$2,07 \times 10^6$	$3,48 \times 10^6$	$2,05 \times 10^2$	$1,59 \times 10^2$	$2,30 \times 10^1$
B20	$6,73 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	$5,00 \times 10^2$	$2,27 \times 10^2$	$2,70 \times 10^1$
B40	$1,70 \times 10^6$	$1,14 \times 10^6$	ND	ND	$2,43 \times 10^3$
CH0	$7,02 \times 10^6$	$1,81 \times 10^7$	$2,98 \times 10^3$	$2,30 \times 10^1$	$4,87 \times 10^3$
CH20	$2,07 \times 10^6$	$1,32 \times 10^7$	$5,57 \times 10^3$	ND	$2,77 \times 10^2$
CH40	$4,32 \times 10^6$	$1,40 \times 10^7$	$9,10 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	$2,48 \times 10^2$

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, ND – neidentifikováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g siláže

V pokusných vzorcích všech variant se bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* vyskytovaly v hodnotách 10^1 až 10^3 KTJ/g siláže. Počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebyly během fermentačního procesu sníženy na minimální množství. Zejména u variant s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty dosahovaly bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* hodnot v řádu 10^3 KTJ/g siláže. SANDLE (2014) i GREIF et al. (2006) uvádějí, že bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* bývají stanovovány jako významný hygienický indikátor.

Celkový počet mikroorganismů se pohyboval u všech variant v hodnotách 10^6 KTJ/g siláže. Tato skupina mikroorganismů byla zkoumána pro zjištění celkové úrovně mikrobiálního osídlení siláží. Do celkového počtu mikroorganismů se výrazně promítají i počty bakterií mléčného kvašení, které se podílejí na fermentačním procesu v silážích.

BMK se pohybovaly v řádu od 10^6 do 10^7 KTJ/g siláže. DOLEŽAL et al. (2010) uvádějí, že bakteriím mléčného kvašení v silážní hmotě konkurují kvasinky a obecně platí, že čím vyšší obsah BMK, tím je usnadněn proces primární fermentace.

V současné době nejsou zavedeny přípustné limity na množství plísní a kvasinek. Avšak limity počtu kvasinek by měly dle ZEMANA et al. (2006) dosahovat maximální koncentrace do 10^4 KTJ/g. Nejvyšší počty kvasinek u všech pokusných variant dosahovaly hodnot 10^2 KTJ/g siláže, jen u kontrolní varianty byla hodnota na hranici

($1,27 \times 10^4$ KTJ/g) s doporučeným limitem. Při zvýšeném počtu kvasinek v silážích nad 10^7 či 10^8 KTJ/g dochází k jejich zahřívání. To ve své studii potvrdil i BOLSEN et al. (1992). S přidavkem silážních aditiv byl počet kvasinek nižší. S tím se shodují výsledky FILYA (2003), který zaznamenal inhibici tvorby kvasinek po ošetření siláží biologickým silážním aditivem a KLEINSCHMIT et al. (2005), kteří ve svém pokusu uvádějí pozitivní vliv biologického silážního aditiva (na bázi *Lactobacillus buchneri*) i chemického silážního aditiva na snížení množství kvasinek v silážích. Největší inhibiční vliv na růst kvasinek měl chemický silážní přípravek. Již WOOLFORD v roce 1975 ve své studii uváděl pozitivní vliv silážních přípravků na bázi kyseliny octové a kyseliny propionové na snížení počtu kvasinek i plísní.

Vzorky pokusných siláží nebyly viditelně zaplísněny. Počty plísní dosahovaly u všech pokusných variant maximálních hodnot $10^2 - 10^3$ KTJ/g siláže. MUDŘÍK et al. (2006) společně se ZEMANEM et al. (2006) považují za podmíněně zkrmitelná krmiva s limitem plísní do 10^5 KTJ/g, což pokusné jetelové siláže splňují. Pokud je koncentrace plísní vyšší než 10^6 či 10^7 KTJ/g, jsou krmiva považována za zkažená a nekrmitelná. WILKINSON (2005) předpokládá, že při vyšším výskytu plísní lze očekávat také nález toxinogenních druhů hub.

Pokusné modelové siláže bez přidavku povrchové vrstvy půdy a s přidavkem povrchové vrstvy půdy (20 g/kg sušiny hmoty) vyhovovaly požadavkům na hygienickou kvalitu siláží. Avšak modelové siláže s vyšším přidavkem povrchové vrstvy půdy (40 g/kg sušiny hmoty) obsahovaly vyšší počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, které indikují fekální znečištění a nižší hygienickou kvalitu siláží. A v jednom případě (B40) i výskyt nežádoucích klostridií. U B40 nebyly identifikovány kvasinky, což bylo způsobeno zřejmě vlivem kyseliny máselné, která inhibovala růst kvasinek. S tímto tvrzením se ztotožňuje KUNG (2010).

Aerobní stabilita

Jako indikátor aerobní stability modelových jetelových siláží byla hodnocena teplota po dobu 5 dnů, která je jejím významným ukazatelem. Z Obr. P1 je patrné, že se teplota začala prudce zvyšovat od 16. hodiny po vystavení modelových siláží vzduchu. Nejvíce je to zřejmé u varianty B40, následně postupně u siláží K40, K20, B20, K a B. Po 18 hodinách se u varianty siláže B40 teplota zvýšila z 22 °C na 40 °C, u varianty

K40 na 39 °C a u varianty K20 na 36 °C. U siláží varianty B20 se teplota zvýšila 24. den na 38 °C. U varianty B byla nejvyšší teplota 27. den, kdy se zvýšila až na 35 °C. Podle RANJIT a KUNG (2000) je aerobní stabilita definována jako doba, která uplyne před tím, než se zvýší teplota siláží o 2 °C. U siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem bylo pozorováno pozvolnější zvyšování teplot. Podle vývoje teplot můžeme sledovat i vliv přidavku povrchové vrstvy půdy v zasilážívané hmotě. Lze tedy obecně říci, že všechny pokusné siláže byly aerobně nestabilní, ale chemické silážní přípravky na bázi organických kyselin oddálily zahřívání siláží, které po otevření byly vystaveny působení vzduchu.

Hodnocení kvality fermentačního procesu

Aby proběhla úspěšná fermentace siláží, je potřeba vytvořit vhodné anaerobní podmínky s nízkou hodnotou pH (PIEPER a KORN, 2010).

V modelovém pokusu byl sledován obsah sušiny, hodnota pH, obsah kyseliny mléčné, kyseliny octové, kyseliny propionové, kyseliny máselné, etanolu, amoniaku, kyselost vodního výluhu a byl vypočten stupeň proteolýzy.

Jetel luční měl po sklizni a následném krátkém zavadnutí obsah sušiny 241,67 g/kg. Sušina byla záměrně zvolená nižší, abychom zjistili vliv nízkého obsahu sušiny na výskyt mikroorganismů, zejména klostridií v silážích a vliv na následný vývoj fermentačních ukazatelů. STONE a CHASE (2004) uvádějí, že typická klostridiová siláž má obsah sušiny pod 320 g/kg. Přehled výsledků fermentačního procesu je uveden v Tab. P1.1.2 až P1.1.12.

Z uvedených výsledků vyplývá, že obsah sušiny (Tab. P1.1.1) se po třech měsících skladování snížil u kontrolní varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy na hodnotu $206,60 \pm 7,168$ g/kg. Statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) byl obsah sušiny u modelových siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem ($211,85 \pm 9,956$ g/kg) v porovnání s kontrolní variantou bez ošetření ($206,55 \pm 7,026$ g/kg). Během aplikace chemického silážního přípravku WILKINSON (2005) zdůrazňuje nutnost dodržení přesného dávkování, které je předepsáno výrobcem, aby nedošlo k redukci mléčného kvašení, popř. změně v kvašení máselné.

Průměrné hodnoty pH pokusných jetelových siláží (Tab. P1.1.2) u variant s přidavkem povrchové vrstvy půdy se pohybovaly v rozmezí 5,07 – 5,14. Vyšší

hodnotou pH (6,6) u siláže z jetele červeného potvrzují také JATKAUSKAS a VROTNIAKIENE (2011). WILKINSON (2005) konstatuje, že při pH vyšším než 4,5 mohou klostridie svou aktivitou produkovat nežádoucí metabolity. Dle McDONALD et al. (1991) mají špatně zachovalé siláže hodnoty pH 5,0 – 7,0 v důsledku vyšší tvorby kyseliny octové a kyseliny máselné, které jsou obě slabší než kyselina mléčná, a nejsou tak schopny dostatečně snížit hodnotu pH. Tato hypotéza byla potvrzena i v uvedeném pokusu, zejména u varianty s vyšším přídatkem povrchové vrstvy půdy (40 g/kg sušiny hmoty), kde dosahovala hodnota pH v siláži 5,14. V siláži s přídatkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty byla hodnota pH statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$), než u kontrolní siláže a varianty s přídatkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty. Mezi všemi variantami s přídatkem silážních aditiv a kontrolní variantou byl potvrzen u hodnoty pH statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Z výsledků vyplývá, že v modelovém pokusu byla nižší hodnota pH o 7,08 % u variant s přídatkem biologického silážního aditiva a o 10,95 % po ošetření chemickým konzervantem ve srovnání s kontrolní siláží. Také MUCK (2010) uvádí, že při rychlém snížení hodnoty pH u silážovaných píce se redukuje aktivita klostridií, zejména bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a bacilů. V modelovém pokusu nebylo pH dostatečně sníženo, což souvisí i s nízkou sušinou píce před silážováním a současně s vyšším výskytem bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, zejména po přídatku povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty.

Kyselost vodního výluhu (Tab. P1.1.3) byla nejnižší u kontrolní varianty (K) $736,3 \pm 34,68$ mg KOH/100 ml. U ošetřených modelových siláží silážními aditivy byla statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) hodnota KVV (o 28,98 %) u biologického aditiva a po ošetření chemickým silážním přípravkem (o 34,75 %) ve srovnání s kontrolní variantou. Také BOLSEN et al. (1996) ve své studii poukazují na zvýšení titrační kyselosti silážního výluhu po aplikaci silážních aditiv. Mezi silážemi s přídatkem povrchové vrstvy půdy byl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) u KVV mezi variantou 20 a 40.

Dále byla analyzována kyselina mléčná (Tab. P1.1.4). V silážích s přídatkem povrchové vrstvy půdy se postupně snižoval obsah kyseliny mléčné. Byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi kontrolní siláží bez přídatku povrchové vrstvy půdy ($124,2 \pm 10,23$ g/kg sušiny) a siláží s přídatkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty ($109,6 \pm 22,26$ g/kg sušiny). U modelových siláží

ošetřených biologickým silážním aditivem byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah kyseliny mléčné (až o 8,99 %) ve srovnání s kontrolní variantou (K). Přídavek chemického silážního přípravku neinhiboval růst BMK, naopak byla podpořena jejich aktivita. Hodnoty dosahovaly až řádu 10^7 KTJ/g a následně byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) i obsah kyseliny mléčné v modelových silážích o 21,48 % ve srovnání s kontrolní variantou. Rovněž JATKAUSKAS a VROTNIAKIENE (2005) i KALDMÄE et al. (2007) potvrzují pozitivní vliv silážních inokulantů na fermentační proces.

U kyseliny propionové (Tab. P1.1.6) byl nalezen statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) u kontrolní varianty (bez přídavku silážních aditiv) a mezi variantami s přídavkem biologického aditiva a chemického silážního přípravku. Po ošetření siláží chemickým silážním přípravkem se kyselina propionová nevyskytovala. Statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah kyseliny propionové byl u siláží s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty ve srovnání s variantou bez přídavku povrchové vrstvy půdy.

U všech variant jetelových siláží byla zjištěna kyselina octová (Tab. P1.1.5). Nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi variantami bez povrchové vrstvy půdy a s přídavkem povrchové vrstvy půdy v rozdílném množství. Po aplikaci chemického silážního přípravku byl obsah kyseliny octové statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) o 11,52 % oproti kontrolní variantě. O nižším množství kyseliny octové po aplikaci chemického silážního přípravku referují také KALDMÄE et al. (2009). Naopak po ošetření siláží biologickým silážním aditivem byl obsah kyseliny octové statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) o 11,59 % oproti kontrolní siláži. JALČ et al. (2009) uvádějí, že dobrým ukazatelem efektivity fermentačního procesu je rovněž poměr kyseliny mléčné ke kyselině octové, který by měl v ideálním případě být 3:1. Čím vyšší je poměr mezi kyselinami, tím je průběh primární fermentace lepší. V modelových pokusných silážích byl poměr kyseliny mléčné ke kyselině octové nižší. U kontrolní varianty (bez přídavku povrchové vrstvy půdy) byl nejvyšší (2,2:1). S přídavkem povrchové vrstvy půdy se poměr snižoval. Ani po ošetření siláží chemickým silážním přípravkem se poměr kyselin nezvýšil na požadovaný poměr 3:1, avšak byl ze všech variant nejvyšší (2,5:1). Z uvedených výsledků lze usuzovat, že chemický silážní přípravek měl pozitivní efekt na snížení kyseliny octové. Vliv přídavku povrchové vrstvy půdy na celkové množství kyseliny octové nebyl prokázán.

Kyselina máselná (Tab. P1.1.7) byla stanovena v množství 0,909 g/kg u varianty s přidavkem povrchové vrstvy půdy (40 g/kg sušiny hmoty) a ve stejném množství (0,909 g/kg) také u varianty ošetřené biologickým silážním aditivem. U těchto variant byl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantou s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 0 a 20 g/kg sušiny hmoty a přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty. Dále mezi biologicky ošetřenou siláží a kontrolní neošetřenou variantou i chemickým silážním přípravkem. DEWHURST et al. (2003) zkoumali siláže připravené z různých píceň a zjistili u siláže z jetele lučního o sušině 359 g/kg vyšší hladiny kyseliny máselné. BERTILSSON a MURPHY (2003) uvádějí stejné množství kyseliny máselné v siláži ze zavádě píce jetele lučního při sušině 263 g/kg. DOLEŽAL et al. (2012) uvádějí, že kyselina máselná je průvodním ukazatelem hlubokého rozkladu bílkovin a měla by být zastoupena jen ve stopách. Současně RYTINA (2005) uvádí, že siláž s obsahem kyseliny máselné vyšší než 1 % by se neměla zkrmovat zvířatům.

U všech pokusných variant byl také stanoven amoniak (Tab. P1.1.11). Statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) obsah amoniaku o 9,56 % byl zjištěn u varianty s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty v porovnání s kontrolní variantou. Byl stanoven statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah amoniaku u varianty s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty (o 11,05 %) oproti variantě s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty. Anaerobně nestabilní siláže jsou obecně charakterizované vyšší hodnotou pH a vyšší úrovní kyseliny máselné a amoniaku, zejména u siláží trav, jetele nebo vojtěšky (VISSERS et al., 2007a; WEISSBACH, 1996). S přidavkem silážních aditiv bylo množství amoniaku statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) ve srovnání s kontrolní variantou, a to nejvíce u siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem.

U varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy byl obsah etanolu $7,770 \pm 1,623$ g/kg (Tab. P1.1.10). Se zvyšujícím se množstvím povrchové vrstvy půdy se množství etanolu výrazně neměnilo. Stejně množství etanolu uvádí BERTILSSON a MURPHY (2003) u siláže z jetele lučního s obsahem sušiny 263 g/kg. Naopak po aplikaci silážních aditiv bylo statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) množství etanolu ve srovnání s kontrolní skupinou, a to u biologického silážního aditiva o 33,58 % a u chemického silážního přípravku o 17,80 %.

Celkové množství kvasných kyselin (Tab. P1.1.8) u varianty bez přídavku povrchové vrstvy půdy činilo $181,9 \pm 15,95$ g/kg sušiny. Z toho tvořila kyselina mléčná 68,28 %. S přídavkem povrchové vrstvy půdy se však procentuální zastoupení snižovalo až na hodnotu 65,32 % (u varianty s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty). SHAVER (2003) uvádí, že kyselina mléčná by měla dosahovat alespoň 65 – 70 % z celkového množství kvasných kyselin. Toto rozmezí pokusné modelové jetelové siláže splňují. Tudíž v počáteční fázi fermentace, kdy se tvořila kyselina mléčná za pomoci BMK se vytvořilo dostatek kyseliny mléčné. Statistický průkazně vyšší ($P < 0,05$) množství sumy kyselin o 7,75 % bylo u kontrolní varianty vzhledem k variantě s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg v sušině hmoty.

Poměr kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám je uveden v Tab. P1.1.9. Statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) poměr (o 9,17 %) kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám byl u varianty s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty vzhledem ke kontrolní variantě. A statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) poměr byl u varianty ošetřené chemickým silážním přípravkem ve srovnání s ošetřením biologickým silážním aditivem a kontrolní variantou.

V pokusných jetelových silážích byl zjištěn vyšší stupeň proteolýzy (Tab. P1.1.12), který se pohyboval v rozmezí od 8,49 do 11,98 %. U siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem byl stupeň proteolýzy nižší. CUSSEN et al. (1995) konstatují, že rychlejší okyselení siláže a vyšší koncentrace kyseliny mléčné, by mělo vést ke snížení proteolytického rozkladu.

Z uvedených výsledků lze konstatovat, že záměrně zvolená nižší sušina u siláží ze zavadlé píce jetele lučního svědčila o tom, že nemohl správně proběhnout fermentační proces. Modelové siláže byly po otevření sensoricky zhodnoceny a vše poukázalo na špatnou kvalitu modelových siláží, kde barva siláží byla tmavě hnědá, konzistence mazlavá a modelová siláž zapáchala po kyselině máselné. Zápach nám poukázal na přítomnost klostridií a vyšší stupeň proteolýzy. STONE a CHASE (2004) potvrzují zápach při klostridiální fermentaci siláží, který je způsoben vyšším obsahem kyseliny máselné, aminů a amoniaku. Přítomnost klostridií byla následně prokázána při mikrobiologické analýze a potvrdil se výskyt *Clostridium perfringens* u varianty s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty a ošetřené biologickým silážním aditivem. Na základě stanovení amoniakálního dusíku

z celkového dusíku byl vypočten stupeň proteolýzy, který byl vyšší. Současně poměr mezi kyselinou mléčnou a kyselinou octovou byl nízký. Vše odpovídalo špatnému průběhu fermentačního procesu.

DUNIÈRE et al. (2013) potvrzují, že s přidavkem povrchové vrstvy půdy do siláží se zvyšuje pufrační kapacita siláží a aerobní mikroorganismy, které byly nalezeny na začátku silážování, zůstávají delší dobu aktivní. Tím se sníží množství hexóz a pentóz dostupných pro BMK. Nedochozí ihned k rychlému okyselení siláží a díky klostridiím se rozbíhá sekundární fermentace, kdy se část kyseliny mléčné metabolizuje na kyselinu máselnou. Následně se zvyšuje pH a siláže jsou dále znehodnocovány.

Výživná hodnota jednotlivých variant

Pro jednotlivé varianty modelových siláží byla stanovena výživná hodnota. Obsah živin je uveden v Tab. P1.1.13.

Původní obsah sušiny jetelových siláží se pohyboval v rozmezí 19,98 – 22,07 %. U popele můžeme sledovat, že se zvyšujícím se množstvím přidané povrchové vrstvy půdy se hodnota popele u všech variant zvyšovala. Naopak u dusíkatých látek se se zvyšujícím se množstvím přidané povrchové vrstvy půdy jejich obsah snižoval. Naproti tomu BERTILSSON a MURPHY (2003) uvádějí v silážích ze zavadlé píce jetele lučního při sušině 26,3 %, vzhledem k modelovému pokusu, nižší obsah popele a dusíkatých látek, naopak hodnoty stravitelnosti vyšší. DEWHURST et al. (2003) rovněž popisují nižší obsah dusíkatých látek, popele, vyšší stravitelnost při sušině 35,9 %.

Obsah tuku jetelových siláží byl vyšší a obsah vlákniny nižší, což dokládá skutečnost, že se jednalo o mladou píci jetele lučního.

Brutto energie siláží se pohybovala v hodnotách od 16,66 do 18,14 MJ/kg sušiny, organická hmota (OH) 807, 1 – 868,1 g/kg sušiny a bezdusíkaté látky výtažkové (BNLV) 364,8 – 401,5 g/kg sušiny.

5.1.2 Modelový pokus II. – vojtěška setá konzervována s rozdílným obsahem sušiny

Vojtěška setá byla v 1. seči posečena, ponechána zavadnout a zasilážována na obsah sušiny (S1) 331,60 g/kg a druhá varianta (S2) na obsah sušiny 355,01 g/kg.

Mikrobiologická analýza

Nezavadlá hmota vojtěšky seté S1 neobsahovala *Clostridium perfringens* a u S2 bylo zjištěno v množství 5 KTJ/g. V povrchové vrstvě půdy bylo u S1 20 KTJ/g a u S2 10 KTJ/g *Clostridium perfringens*. ABU-ELNAGA et al. (2014) potvrzují výskyt *Clostridium perfringens* zejména v půdě a prachu. REDONDO et al. (2013) souhlasí, že *Clostridium perfringens* je široce rozšířeno v životním prostředí. Sporulující mikroorganismy byly v původní nezavdlé píci u S1 v množství $2,51 \times 10^2$ KTJ/g, u S2 $1,82 \times 10^4$ KTJ/g. V povrchové vrstvě půdy se pohybovaly hodnoty sporulujících mikroorganismů u S1 $1,0 \times 10^5$ KTJ/g a u S2 $1,4 \times 10^5$ KTJ/g. JOHANSSON et al. (2005) uvádějí nižší výskyt spor klostridií (*Clostridium butyricum*) v půdě v množství $5,01 \times 10^3$ KTJ/g.

Po otevření pokusných nádob se silážemi ze zavdlé píce vojtěšky seté (dále jen vojtěšková siláž) nebyl zjištěn výskyt *Clostridium perfringens* u S2. Bylo stanoveno u S1, a to u varianty K40 (5 KTJ/g siláže), u varianty B20 (5 KTJ/g siláže), B40 (5 KTJ/g siláže) a u varianty CH20 (5 KTJ/g siláže) i CH40 (5 KTJ/g siláže). U ostatních S1 ošetřených i neošetřených variant s přídavkem i bez přídavku povrchové vrstvy půdy nebylo zjištěno.

Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů u S1 i S2 jsou uvedeny v Tab. 8. Nejvyšší hodnoty sporulujících mikroorganismů u všech variant dosahovaly hodnot od 10^1 do 10^3 KTJ/g siláže. JATKAUSKAS et al. (2013) uvádějí počty spor klostridií ve vojtěškových silážích v množstvích do 10 KTJ/g.

S přídavkem povrchové vrstvy půdy postupně docházelo ke zvýšení výskytu sporulujících mikroorganismů u obou skupin (S1 i S2). Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl však jen u varianty S1. Po přídavku silážních aditiv se počet sporulujících mikroorganismů nesnížil. U S2 mezi jednotlivými variantami s přídavkem povrchové vrstvy půdy a ošetřených silážními aditivy nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl.

U siláží S1 ošetřených biologickým silážním aditivem byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) počet sporulujících mikroorganismů než u siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem a kontrolou.

Tab. 8: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Vliv	Varianta	S1		Index	S2		Index
		Průměr	Sm. odch.		Průměr	Sm. odch.	
Povrchová vrstva půdy	0	$2,16 \times 10^2$	$2,08 \times 10^2$	a	$1,33 \times 10^3$	$1,33 \times 10^3$	a
	20	$1,15 \times 10^3$	$3,54 \times 10^2$	b	$1,35 \times 10^3$	$5,01 \times 10^2$	a
	40	$2,16 \times 10^3$	$1,39 \times 10^3$	c	$1,61 \times 10^3$	$5,14 \times 10^2$	a
Ošetření	K	$8,83 \times 10^2$	$6,30 \times 10^2$	a	$1,31 \times 10^3$	$8,31 \times 10^2$	a
	CH	$8,98 \times 10^2$	$4,63 \times 10^2$	a	$1,68 \times 10^3$	$1,09 \times 10^3$	a
	B	$1,75 \times 10^3$	$1,78 \times 10^3$	b	$1,31 \times 10^3$	$6,13 \times 10^2$	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	$1,21 \times 10^2$	$5,00 \times 10^1$	bc	$3,55 \times 10^2$	$6,40 \times 10^1$	a
	CH0	$4,78 \times 10^2$	$6,70 \times 10^1$	abc	$3,03 \times 10^3$	$4,17 \times 10^2$	d
	B0	$5,00 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	b	$6,09 \times 10^2$	$1,36 \times 10^2$	ab
	K20	$1,40 \times 10^3$	$4,00 \times 10^2$	a	$1,43 \times 10^3$	$1,80 \times 10^2$	abc
	CH20	$7,73 \times 10^2$	$1,29 \times 10^2$	abc	$7,82 \times 10^2$	$9,50 \times 10^1$	abc
	B20	$1,29 \times 10^3$	$5,50 \times 10^1$	ac	$1,85 \times 10^3$	$2,40 \times 10^2$	bcd
	K40	$1,13 \times 10^3$	$7,40 \times 10^1$	abc	$2,14 \times 10^3$	$4,14 \times 10^2$	cd
	CH40	$1,44 \times 10^3$	$2,67 \times 10^2$	a	$1,22 \times 10^3$	$2,43 \times 10^2$	abc
	B40	$3,91 \times 10^3$	$4,91 \times 10^2$	d	$1,48 \times 10^3$	$4,24 \times 10^2$	abc

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm. odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

CPM u S1 i S2 (Tab. 9) dosahoval nejvyšších hodnot 10^8 KTJ/g siláže. Nejvyšší množství CPM bylo v původní hmotě u S1 ($1,15 \times 10^8$ KTJ/g), u S2 ($3,43 \times 10^8$ KTJ/g) a dále u S1 u varianty B40, u S2 u varianty K40, B, B20 i B40. S přidavkem povrchové vrstvy půdy se CPM u kontrolní varianty u S1 i S2 postupně zvyšoval. Chemický silážní přípravek snížil CPM u varianty S1 ve srovnání s kontrolní variantou. VLKOVÁ et al. (2012) uvádějí nižší hodnoty CPM v množství $6,76 \times 10^4$ KTJ/g u kontrolní varianty bez ošetření po 63. dnech fermentace a u varianty ošetřené biologickým silážním aditivem ($7,59 \times 10^4$ KTJ/g siláže).

BMK se pohybovaly u S1 i S2 (Tab. 9) řádově do 10^8 KTJ/g siláže. VLKOVÁ et al. (2012) stanovili nižší hodnoty BMK ($9,33 \times 10^4$ KTJ/g siláže) u kontrolní varianty. HOLZER et al. (2003) potvrzují důležitost BMK zejména v první fázi fermentace.

Tab. 9: Průměrné hodnoty CPM a BMK ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Varianta	CPM		BMK	
	S1	S2	S1	S2
Půda	$2,32 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	$4,50 \times 10^2$	$7,23 \times 10^2$
PH	$1,15 \times 10^8$	$3,43 \times 10^8$	$8,74 \times 10^6$	$3,91 \times 10^7$
K0	$2,30 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7$	$2,66 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$
K20	$3,14 \times 10^7$	$2,75 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$	$3,75 \times 10^7$
K40	$9,14 \times 10^7$	$1,31 \times 10^8$	$1,08 \times 10^8$	$8,05 \times 10^7$
B0	$8,22 \times 10^7$	$3,31 \times 10^8$	$9,91 \times 10^7$	$2,70 \times 10^8$
B20	$3,77 \times 10^7$	$2,45 \times 10^8$	$4,86 \times 10^7$	$1,95 \times 10^8$
B40	$1,29 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$	$2,02 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$
CH0	$1,64 \times 10^6$	$6,41 \times 10^7$	$8,30 \times 10^6$	$6,52 \times 10^7$
CH20	$7,98 \times 10^6$	$4,43 \times 10^7$	$1,11 \times 10^7$	$2,41 \times 10^7$
CH40	$1,02 \times 10^7$	$3,98 \times 10^7$	$4,80 \times 10^6$	$3,34 \times 10^7$

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, PH – původní hmota, CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, S1 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 355,01 g/kg

Hodnoty plísní i kvasinek pro jednotlivé varianty jsou uvedeny v Tab. 10. Nejvyšší počet plísní byl u S1 a S2 v původní hmotě v množství do $10^5 - 10^6$ KTJ/g. MAGAN a ALDRED (2007) uvádějí přítomnost plísní již během sklizně. V povrchové vrstvě půdy byly hodnoty plísní u S1 i S2 v množství 10^3 KTJ/g. Vlivem fermentačního procesu, který probíhal v silážních nádobách, se snížil počet plísní u S1 na hodnoty 10^1 KTJ/g siláže a u S2 byl v rozmezí $10^2 - 10^3$ KTJ/g siláže. BIANCHINI (2015) ve své studii potvrzuje antifungální aktivitu BMK. DOLEŽAL et al. (2012) potvrzují teorii MUDŘÍKA et al. (2006), že vyhovující limit pro plísně je do 10^5 KTJ/g siláže, což S1 i S2 splňují. U varianty S1 s přidavkem povrchové vrstvy půdy u neošetřené siláže i ošetřené biologickým a chemickým silážním aditivem se počet plísní postupně nepatrně zvyšoval. Podobný vliv měla fermentace i na počet kvasinek v silážích, kde se snížilo množství kvasinek v původní hmotě u S1 a S2 z hodnoty řádově 10^5 KTJ/g na

hodnoty v řádu 10^1 KTJ/g. MUDŘÍK et al. (2006) doporučují limity pro výskyt kvasinek v silážích do 10^4 KTJ/g, kterým modelové siláže vyhovují. PAHLOW et al. (2003) považují kvasinky za mikroorganismy, které jsou příčinou zahájení aerobního kažení siláží. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* v silážích nebyly detekovány.

Tab. 10: Průměrné hodnoty plísní a kvasinek ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Varianta	Plísně		Kvasinky	
	S1	S2	S1	S2
Půda	$7,00 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$8,50 \times 10^3$
PH	$9,38 \times 10^5$	$9,50 \times 10^5$	$6,48 \times 10^5$	$6,75 \times 10^5$
K0	$1,40 \times 10^1$	ND	ND	$2,60 \times 10^1$
K20	$2,50 \times 10^1$	$6,48 \times 10^2$	$1,30 \times 10^1$	5
K40	$4,80 \times 10^1$	$3,73 \times 10^2$	$2,00 \times 10^1$	3
B0	$1,50 \times 10^1$	$2,76 \times 10^2$	$2,30 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$
B20	$3,40 \times 10^1$	$1,23 \times 10^2$	3	ND
B40	$4,80 \times 10^1$	$1,56 \times 10^3$	$1,50 \times 10^1$	ND
CH0	3	$1,53 \times 10^2$	ND	$1,00 \times 10^1$
CH20	$1,80 \times 10^1$	$9,40 \times 10^1$	5	3
CH40	$3,90 \times 10^1$	$1,22 \times 10^2$	8	8

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, PH – původní hmota, CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, S1 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 355,01 g/kg, ND – neidentifikováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g siláže

Aerobní stabilita

V pokusu byla opět sledována aerobní stabilita siláží. Byl sledován CPM, počty BMK, sporulujících mikroorganismů, *Clostridium perfringens*, plísní a kvasinek. Mikrobiologická analýza probíhala v den otevření siláží (0. den), 1. den, 2. den a 3. den po otevření siláží. Postupný vývoj CPM je uveden v příloze na Obr. P2, P3. Do CPM se promítá jak negativní, tak i pozitivní mikroflóra (BMK). Na Obr. P2 i P3 je patrný rozdíl mezi variantami siláží K a K20 o jeden řád, a to u S1 druhý den po otevření, u S2 v první i druhý den po otevření siláží. U S2 (Obr. P3) byl CPM nejnižší u kontrolní varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy ve srovnání s variantami ošetřenými silážními aditivy. S přidavkem povrchové vrstvy půdy u kontrolní varianty se u S1 v 0. den i 1. den a u S2 jen v 0. den mírně zvyšoval počet CPM. U S1, S2 varianty K40 můžeme vidět nejvyšší CPM v 0. den. Následně byl zaznamenán pokles CPM v 1., 2.

a 3. den, zejména u siláže S1 byl pokles patrnější. Lze usuzovat, že u varianty K40, kde bylo přidáno vyšší množství povrchové vrstvy půdy, byly vneseny i další mikroorganismy. V dalších dnech již byl patrný vliv kyslíku, docházelo ke změně hodnoty pH, začaly se rozvíjet látky s antimikrobiálními účinky a následkem byla změna mikrobiologického spektra. U S1 u varianty B byly počty CPM vyšší ve srovnání s kontrolní siláží (K). Opět se zde promítají ve velké míře BMK. U siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem byl CPM nižší v porovnání s kontrolní variantou (K). Lze konstatovat, že chemické silážní přípravky měly příznivý vliv na snížení CPM.

Při porovnání Obr. P2 a P3 s BMK na Obr. P4 a P5 lze usoudit, že na počet CPM měl velký vliv počet BMK, jelikož na obrázcích jsou blízké počty CPM jako BMK u S1 i S2.

Počty *Clostridium perfringens* (Tab. 11) byly sice ve všech vzorcích siláží nízké (u S1 i S2), ale lze usuzovat, že u vzorků, které byly obohaceny přidavkem povrchové vrstvy půdy, byl záchyt *Clostridium perfringens* častější než u vzorků bez přidavku povrchové vrstvy půdy. DRIEHUIS a ELFERINK (2000) uvádějí, že při kontaminaci píče použité k silážování, dlouhé aerobní fázi nebo při pomalém okyselení siláží, začnou v silážích převládat klostridie, kvasinky, plísně a patogenní mikroorganismy.

Tab. 11: *Clostridium perfringens* vyjádřeno v KTJ/g siláže

Označení vzorku	K0		K20		K40		B0		B20		B40		CH0		CH20		CH40	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
0. den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	5	ND
1. den	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	5	5	5	ND	ND	5	ND	ND	ND	5
2. den	ND	ND	ND	ND	5	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5
3. den	ND	5	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, S1 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 355,01 g/kg, ND – neidentifikováno v 10¹ a 10² KTJ/g siláže

Sporulující mikroorganismy (Obr. P6 a P7) byly nejnižší u kontrolní varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy. S přidavkem povrchové vrstvy půdy byl pozorován nárůst sporulujících mikroorganismů. U S1 varianty B můžeme vidět postupný nárůst sporulujících mikroorganismů s přibývajícím dnem. U S2 varianty B byl bez přidavku povrchové vrstvy půdy nejvyšší počet sporulujících mikroorganismů v den otevření

modelových siláží, pak se jejich počet snížil a vlivem aerobních podmínek se opět postupně začaly počty sporulujících mikroorganismů u varianty B zvyšovat. U vzorků siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem není nárůst sporulujících mikroorganismů tak patrný, můžeme pozorovat konzervační vliv chemického silážního přípravku.

Kvasinky (Tab. 12) se vyskytovaly zejména v 0. den, tedy ihned po otevření modelových siláží. 0. den se u varianty S1 s přidavkem povrchové vrstvy půdy počty kvasinek u kontrolní neošetřené varianty zvyšovaly a v ostatních dnech se počty kvasinek snižovaly nebo nebyly detekovány. O'KIELY et al. (1992) potvrzují potlačení růstu kvasinek u aerobně stabilních vojtěškových siláží. Jen u varianty K40 u S2 a B40 u S1 se v třetí den kvasinky opět objevily v nepatrném množství. V důsledku pronikání vzduchu do siláží začnou mikroorganismy růst. Většinou je zhoršení aerobní stability způsobeno množением kvasinek, které využívají zbytkové sacharidy a kyselinu mléčnou jako substráty pro svůj metabolismus. Současně se množí plísně a mikroorganismy rodu *Bacillus* (PAHLOW et al., 2003).

Byl zaznamenán vliv chemického silážního přípravku na snížení počtu kvasinek. Lze tedy konstatovat, že chemický silážní přípravek měl pozitivní vliv na jejich snížení. DANNER et al. (2003) také potvrzují pozitivní vliv chemického silážního přípravku (obsahujícího kyselinu octovou) na snížení počtu kvasinek.

Tab. 12: Kvasinky vyjádřeno v KTJ/g siláže

Označení vzorku	K0		K20		K40		B0		B20		B40		CH0		CH20		CH40	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
0. den	ND	26	13	5	20	3	23	30	3	ND	15	ND	ND	10	5	3	8	7
1. den	ND	ND	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
2. den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3. den	ND	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, S1 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěšková siláž s obsahem sušiny 355,01 g/kg, ND – neidentifikováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g siláže

U S1 kontrolní varianty (Obr. P8) můžeme sledovat v 0. a 1. den, že se množství plísní zvyšovalo s přidavkem povrchové vrstvy půdy. MALÍŘ a OSTRÝ (2003) potvrzují, že povrchová vrstva půdy je přirozeným rezervoárem plísní. Nejvyšší počet

plísni byl 1. den po otevření pokusných silážních nádob. Nejnížší počty plísni byly u většiny vzorků 2. a 3. den po otevření siláží, jelikož začal působit vliv rozvoje ostatních konkurenčních mikroorganismů, které inhibovaly růst plísni.

Kontrolní varianta u S2 (Obr. P9) se nepatrně liší od S1. U kontrolní varianty S2 bez přídavku povrchové vrstvy půdy byl počet plísni nejvyšší 1. den a postupně s přibývajícím dny se počet plísni snižoval. S přídavkem povrchové vrstvy půdy byl počet plísni v čase vyšší. Chemický silážní přípravek u S2 měl vliv na snížení počtu plísni u variant CH a CH20. Avšak vlivem vyššího přídavku povrchové vrstvy půdy (u vzorku K40, B40 i CH40) byl již zaznamenán vliv plísni obsažených v povrchové vrstvě půdy a postupně s časem docházelo ke zvyšování počtu plísni. Pokusné vzorky siláží nebyly však viditelně zaplísněny. Plísně jsou aerobní mikroorganismy, jakmile se dostane vzduch ke sporám, které jsou prozatím neaktivní, začnou klíčit a dojde k rozvoji plísni. CHELI et al. (2013) uvádějí, že spory jsou rizikové ve vlhčím materiálu, ale nejsou vyloučeny v materiálu sušším, proto je velmi důležité dbát na řádné utěsnění silážních nádob, aby se zabránilo průniku vzduchu dovnitř.

Počty všech mikroorganismů jsou velmi variabilní, jelikož se postupem času rychle mění mikrobiologické spektrum. Vždy se změna společenstva mikroorganismů nemusí projevit v počtech, ale v druhovém zastoupení, kdy v siláží začnou jiné biochemické procesy.

Aerobní stabilita byla monitorována i pomocí sledování průběhu teplot, které jsou zaznamenány v příloze u S1 na Obr. P10 a S2 na Obr. P11. U S1 měly teploty všech vzorků stejnou rostoucí tendenci. Postupně docházelo ke zvyšování teploty z 19 °C na 22,9 °C u kontrolní varianty a ostatní varianty pokusných siláží tendenci kontrolní varianty kopírovaly. U S2 došlo jen k nepatrnému zvýšení teploty v průběhu sledování teplot, a to z 21 °C na 22,5 °C. Všechny vzorky kopírovaly podobnou nepatrně se zvyšující tendenci. Lze tedy konstatovat, že u vzorků S2 bylo zaznamenáno nepatrné zvýšení teplot v průběhu pěti dní. WANG a NISHINO (2008) ve svém experimentu zaznamenali, že při zvýšení teploty o více než 2 °C se siláž zhoršila. Siláž s obsahem sušiny 36 % (S2) byla aerobně stabilnější ve srovnání se siláží s obsahem sušiny 33 % (S1).

Hodnocení kvality fermentačního procesu

Veškeré hodnoty fermentačního procesu pro S1 a S2 jsou uvedeny v příloze Tab. P1.2.1 až Tab. P1.2.10.

Původní hmota vojtěšky seté u S1 měla po zavadnutí sušinu 333,52 g/kg a u S2 365,19 g/kg. Po třech měsících skladování se obsah sušiny snížil u S1 o 2,24 % a u S2 o 3,82 % vzhledem ke kontrolní variantě bez přídavku povrchové vrstvy půdy. McGARVEY et al. (2013) uvádějí ztráty sušiny původní píce o 7,41 % vojtěšky seté po zasilážování. Statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah sušiny byl u S1 po přidání povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty vzhledem k variantě bez přídavku povrchové vrstvy půdy a po přidání 20 g/kg sušiny hmoty. U S2 byl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantami bez přídavku povrchové vrstvy půdy a po přidání 20 g/kg sušiny hmoty v množství 40 g/kg sušiny hmoty vzhledem k variantě s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty. Po aplikaci silážních aditiv se obsah sušiny u S1 i S2 zvýšil.

Hodnoty pH jsou uvedeny v Tab. P1.2.2. Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl u S1 mezi variantou bez přídavku povrchové vrstvy půdy a variantami s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty a u S2 mezi všemi variantami. S přídavkem povrchové vrstvy půdy se hodnota pH u S1 i S2 zvyšovala. Naopak s přídavkem silážních aditiv se hodnota pH nepatrně snížila, což potvrzuje WILKINSON (2005). Z výsledků uvedených v Tab. P1.2.2 vyplývá, že v modelovém pokusu u siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem byla statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) hodnota pH u S1 (o 5,64 %) a u S2 (o 4,39 %) v porovnání s kontrolní variantou.

KVV (Tab. P1.2.3) u S1 i S2 byla nejnižší u varianty s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty. U siláží S1 i S2 se s přídavkem povrchové vrstvy půdy KVV snižovalo. U siláží S1 byl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantami bez přídavku povrchové vrstvy půdy a variantami s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. U variant ošetřených silážními aditivy byla hodnota KVV vyšší, nejvíce po ošetření chemickým silážním přípravkem, což bylo staticky průkazné ($P < 0,05$), a to u S1 (o 17,96 %), u S2 (o 9,69 %) ve srovnání s kontrolní variantou. Také DOLEŽAL (2002) potvrzuje mírné zvýšení KVV po aplikaci chemických silážních přípravků.

Analýza kyseliny mléčné je uvedena v Tab. P1.2.4. U siláže S1 byl statisticky průkazný ($P < 0,05$) rozdíl mezi kontrolní variantou bez přídavku povrchové vrstvy půdy ($94,60 \pm 13,81$ g/kg sušiny) a variantou s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty ($88,58 \pm 8,89$ g/kg sušiny). U siláže S2 byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah kyseliny mléčné mezi kontrolní variantou bez přídavku povrchové vrstvy půdy ($72,58 \pm 6,08$ g/kg sušiny) a modelovými silážemi s přídavkem povrchové vrstvy půdy 20 g/kg sušiny hmoty ($80,51 \pm 4,02$ g/kg sušiny) a 40 g/kg sušiny hmoty ($78,09 \pm 7,14$ g/kg sušiny). U siláže S2 se s přídavkem silážních aditiv bylo množství kyseliny mléčné vyšší. FILYA et al. (2007) uvádějí, že ve svém pokusu po přídavku biologického silážního aditiva (*Lactobacillus plantarum* a *Enterococcus faecium*) měly stejné množství kyseliny mléčné, ale při vyšší sušině.

V obsahu kyseliny octové (Tab. P1.2.5) u siláže S1 nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi variantami s přídavkem a bez přídavku povrchové vrstvy půdy. U siláže S2 byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah kyseliny octové u varianty s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty ve srovnání s variantou bez přídavku povrchové vrstvy půdy. Po přidání silážních aditiv se obsah kyseliny octové snížil u siláží S1 i S2. JATKAUSKAS et al. (2013) ve svém pokusu u siláže vojtěšky seté při sušině 335,1 g/kg dospěli k podobné hodnotě pH, ale k nižšímu množství kyseliny mléčné a octové.

Kyselina máselná i kyselina propionová nebyly v modelových silážích u S1 i S2 detekovány. K podobným závěrům dospěli ve svém pokusu HASSANAT et al. (2014).

Suma kyselin je uvedena v Tab. P1.2.6. V siláži S2 s přídavkem povrchové vrstvy půdy byl statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) obsah kyselin u variant s obsahem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny ve srovnání s kontrolní variantou. Po ošetření modelových siláží aditivou byla suma kyselin u S1 statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolní variantou, a to u B o 16,45 % a u CH o 15,68 %.

Poměr kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám (Tab. P1.2.7) byl nejvyšší u varianty bez přídavku povrchové vrstvy půdy (u S1 = 3,5, u S2 = 3,6). S přídavkem povrchové vrstvy půdy se tento poměr snižoval. Na zlepšení poměru mělo vliv ošetření chemickým silážním přípravkem, kdy byl poměr kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám vyšší.

V silážích S1 i S2 se množství amoniaku (Tab. P1.2.9) s přidavkem povrchové vrstvy půdy nepatrně zvyšovalo oproti kontrolní variantě. Přídavkem silážních aditiv se obsah amoniaku snížil, což potvrzují i JATKAUSKAS a VROTNIKIENE (2011) v siláži vojtěšky seté po 90 dnech silážování. Také množství etanolu se snížilo v modelových silážích ošetřených chemickým silážním přípravkem (Tab. P1.2.8).

V Tab. P1.2.10 je vypočten stupeň proteolýzy. V siláži S1 po přidání povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty byl stupeň proteolýzy vyšší (o 9,14 %) a v siláži S2 (o 3,51 %) a po přidavku 40 g/kg sušiny u S1 (o 11,53 %) u S2 (o 6,01 %) ve srovnání s variantou bez přidavku povrchové vrstvy půdy. Statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) stupeň proteolýzy byl stanoven v modelových silážích ošetřených silážními aditivy ve srovnání s kontrolní variantou.

Výživná hodnota jednotlivých variant siláží

Výživná hodnota siláží S1 i S2 je uvedena v Tab. P1.2.11A, Tab. P1.2.11B. Sušina siláží ze zavadlé vojtěšky seté u S1 byla v rozmezí 31,07 – 34,49 % a u S2 33,43 – 38,18 %.

S přidavkem povrchové vrstvy půdy do modelových siláží u S1 i S2 docházelo k postupnému zvyšování množství popelovin. Naopak obsah dusíkatých látek se postupně snižoval. Obsah tuku byl v silážích S1 i S2 vyšší, ale obsah vlákniny nižší.

Brutto energie modelových siláží u S1 i S2 se pohybovala kolem 17 – 18 MJ/kg, organická hmota u S1 v hodnotách 879,51 – 914,17 g/kg a u S2 882,74 – 917,60 g/kg sušiny, BNVL kolem 350 g/kg sušiny. WANG et al. (2009) uvádějí u siláží vojtěšky seté o nižší sušině (kontrolní varianta 21,1 % sušiny, po ošetření biologickým silážním aditivem 21,8 % sušiny) podobné výživné hodnoty (zejména NL, ADF, NDF). Současně také HASSANAT et al. (2014) popisují podobný obsah NL, ale nižší obsah ADF a NDF u siláží při sušině 34,7 %.

5.1.3 Modelový pokus III. – vojtěška setá v první a druhé seči

Vojtěška setá byla sklizena ve dvou sečích a podrobena mikrobiologické analýze. Následně byla vyhodnocena aerobní stabilita, zhodnocen fermentační proces a stanoven obsah živin. První seč vojtěšky seté je označena v textu jako 1S a druhá seč jako 2S.

Mikrobiologická analýza

V původní hmotě, v povrchové vrstvě půdy, ani v modelových vojtěškových silážích v první i ve druhé seči nebylo zjištěno *Clostridium perfringens*. Podle BOLSEN et al. (1992) je výskyt klostridií u siláží se sušinou nad 35 % velmi ojedinělý. Množství sporulujících mikroorganismů bylo v původní hmotě v první seči $2,25 \times 10^4$ KTJ/g a ve druhé seči $6,74 \times 10^4$ KTJ/g.

V povrchové vrstvě půdy v 1S bylo nalezeno $1,98 \times 10^5$ KTJ/g sporulujících mikroorganismů a ve 2S v množství o jeden řád nižší ($1,07 \times 10^4$ KTJ/g). HAAGSMA (1991) konstatuje, že spory některých bakterií, zejména klostridií, mohou přežít v půdě.

V Tab. 13 jsou uvedeny průměrné počty sporulujících mikroorganismů u všech variant. VISSERS et al. (2006) uvádějí, že některé mikroorganismy mohou přežít v kyselém prostředí v inaktivní formě (kvasinky), anebo ve formě spor (klostridie). Nejvyšší počet sporulujících mikroorganismů v 1S dosahoval hodnot do 10^4 KTJ/g siláže. Ve 2S byly hodnoty o jeden řád nižší (do 10^3 KTJ/g siláže). DAVIES et al. (1996) potvrzují tvorbu spor u klostridií a jejich odolnost vůči nepříznivým podmínkám v silážích. S přidavkem povrchové vrstvy půdy v 1S byl počet sporulujících mikroorganismů vyšší. Nejvyšší množství sporulujících mikroorganismů bylo v první seči (1S) u varianty s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty. V 1S i ve 2S byl statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) mezi variantami s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 a 20 g/kg sušiny hmoty. Dále i v 1S mezi variantou bez přidavku povrchové vrstvy půdy a s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny a ve 2S u varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy a s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty.

U siláží v 1S ošetřených chemickým silážním přípravkem bylo zjištěno statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) množství sporulujících mikroorganismů ve srovnání s kontrolní variantou a variantou ošetřenou biologickým silážním aditivem. Ve 2S bylo zjištěno

statisticky nižší množství ($P < 0,05$) sporulujících mikroorganismů u siláží ošetřených biologickým i chemickým silážním aditivem ve srovnání s kontrolní skupinou.

Tab. 13: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Vliv	Varianta	1S		Index	2S		Index
		Průměr	Sm. odch.		Průměr	Sm. odch.	
Povrchová vrstva půdy	0	$9,69 \times 10^2$	$1,07 \times 10^3$	a	$2,97 \times 10^2$	$3,02 \times 10^2$	a
	20	$1,52 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	a	$4,54 \times 10^2$	$4,98 \times 10^2$	b
	40	$3,10 \times 10^3$	$3,10 \times 10^3$	b	$2,77 \times 10^2$	$1,26 \times 10^2$	a
Ošetření	K	$2,68 \times 10^3$	$3,27 \times 10^3$	a	$7,13 \times 10^2$	$3,58 \times 10^2$	b
	CH	$4,35 \times 10^2$	$2,02 \times 10^2$	b	$1,52 \times 10^2$	$2,90 \times 10^1$	a
	B	$2,47 \times 10^3$	$8,87 \times 10^2$	a	$1,64 \times 10^2$	$1,27 \times 10^2$	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	$3,55 \times 10^2$	$2,20 \times 10^1$	a	$6,58 \times 10^2$	$2,56 \times 10^2$	b
	CH0	$2,52 \times 10^2$	$7,80 \times 10^1$	a	$1,67 \times 10^2$	$2,60 \times 10^1$	a
	B0	$2,30 \times 10^3$	$7,37 \times 10^2$	a	$6,80 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	a
	K20	$1,07 \times 10^3$	$1,38 \times 10^2$	a	$1,11 \times 10^3$	$1,77 \times 10^2$	c
	CH20	$5,14 \times 10^2$	$2,74 \times 10^2$	a	$1,47 \times 10^2$	$1,80 \times 10^1$	a
	B20	$2,97 \times 10^3$	$9,98 \times 10^2$	ab	$1,09 \times 10^2$	$4,30 \times 10^1$	a
	K40	$6,62 \times 10^3$	$2,76 \times 10^3$	b	$3,74 \times 10^2$	$8,90 \times 10^1$	ab
	CH40	$5,39 \times 10^2$	$7,60 \times 10^1$	a	$1,42 \times 10^2$	$4,30 \times 10^1$	a
B40	$2,15 \times 10^3$	$1,02 \times 10^3$	a	$3,15 \times 10^2$	$1,01 \times 10^2$	ab	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm. odch. – směrodatná odchylka, 1S – první seč, 2S – druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Počty ostatních skupin mikroorganismů z příslušných vzorků siláží jsou uvedeny v Tab. 14 a Tab. 15. U CPM byly zjištěny hodnoty v 1S i ve 2S až do výše 10^7 KTJ/g siláže. V modelovém pokusu měl největší vliv na snížení CPM chemický silážní přípravek, což potvrzuje i BOLSEN et al. (1992).

Počty BMK se pohybovaly v rozmezí 10^6 až 10^7 KTJ/g siláže. PANG et al. (2011) uvádějí stejný počet BMK (v řádu 10^7 KTJ/g) v silážích vojtěšky seté u varianty B. DOLEŽAL et al. (2010) uvádějí, že čím vyšší je obsah BMK, tím je usnadněn proces primární fermentace. Nejvyšší počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byly zjištěny u obou sečí v původní hmotě (1S v řádu 10^6 KTJ/g, ve 2S v řádu 10^4 KTJ/g) a v povrchové vrstvě půdy (v řádu 10^5 KTJ/g). Vlivem fermentačního procesu se jejich

počty snížily. V modelových silážích v 1S i ve 2S u všech variant se bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* vyskytovaly jen v nepatrném množství. PAHLOW et al. (2003) potvrzuje, že jakmile se v silážích během fermentace vytvoří anaerobní prostředí, sníží se počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* na minimální hodnotu či vymizí.

Tab. 14: Průměrné hodnoty CPM, BMK, enterobakterií ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Varianta	CPM		BMK		Bakterie čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	
	1S	2S	1S	2S	1S	2S
Půda	$3,11 \times 10^7$	$6,68 \times 10^7$	$1,64 \times 10^5$	$4,27 \times 10^6$	$8,14 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$
PH	$3,81 \times 10^7$	$4,29 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$1,98 \times 10^6$	$1,55 \times 10^6$	$1,21 \times 10^4$
K0	$1,67 \times 10^7$	$4,37 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$	$2,22 \times 10^7$	$1,80 \times 10^1$	$5,71 \times 10^2$
K20	$2,36 \times 10^7$	$3,58 \times 10^7$	$3,02 \times 10^7$	$2,90 \times 10^7$	$2,30 \times 10^1$	$3,21 \times 10^2$
K40	$2,19 \times 10^7$	$8,73 \times 10^7$	$2,91 \times 10^7$	$5,29 \times 10^7$	$2,30 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$
B0	$4,06 \times 10^7$	$3,07 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$	$2,59 \times 10^7$	$1,20 \times 10^1$	$4,70 \times 10^1$
B20	$3,78 \times 10^7$	$2,21 \times 10^7$	$1,55 \times 10^7$	$2,22 \times 10^7$	5	$1,50 \times 10^1$
B40	$2,25 \times 10^7$	$5,31 \times 10^7$	$9,45 \times 10^6$	$4,85 \times 10^7$	8	$2,70 \times 10^1$
CH0	$4,27 \times 10^6$	$1,42 \times 10^7$	$4,98 \times 10^6$	$4,98 \times 10^6$	$3,60 \times 10^1$	$3,20 \times 10^1$
CH20	$4,61 \times 10^6$	$8,79 \times 10^6$	$4,15 \times 10^6$	$1,82 \times 10^6$	$7,60 \times 10^1$	8
CH40	$3,18 \times 10^5$	$8,64 \times 10^6$	$7,88 \times 10^5$	$9,77 \times 10^6$	$2,30 \times 10^1$	$5,90 \times 10^1$

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, PH – původní hmota, BMK – bakterie mléčného kvašení, CPM – celkový počet mikroorganismů, 1S – první seč, 2S – druhá seč

V původní hmotě i v povrchové vrstvě půdy byly zjištěny u obou sečí plísně v množství 10^5 KTJ/g a kvasinky v 1S v množství řádově 10^3 až 10^4 KTJ/g, ve 2S 10^5 KTJ/g siláže. U 2S byl detekován počet kvasinek v původní hmotě o jeden řád vyšší, zatímco v povrchové vrstvě půdy až o dva řády vyšší než u 1S. Počty kvasinek i plísni jsou uvedeny v Tab. 15. Po zasilážování původní hmoty a po následném otevření modelových siláží bylo zjištěno, že se počet kvasinek i plísni snížil, a to u obou sečí. Ve 2S byl zaznamenán pozitivní vliv silážních aditiv na snížení výskytu plísni a kvasinek. Podobnou tendenci konstatuje FILYA (2003), který zaznamenal inhibici tvorby kvasinek po ošetření siláží biologickým silážním aditivem a KLEINSCHMIT et al. (2005), kteří ve svém pokusu uvádějí pozitivní vliv biologického silážního aditiva (na bázi *Lactobacillus buchneri*) na snížení množství kvasinek v silážích. Současně

chemické silážní přípravky na bázi organických kyselin a jejich solí mají výraznější antifungální a antibakteriální účinky, jak potvrzují i další autoři (LÄTTEMÄE a LINGVALL, 1996; WILKINSON, 2005). Také LÁD et al. (2008) potvrzují pozitivní vliv silážních inokulantů na kvalitu fermentačního procesu.

Při smyslovém hodnocení pokusných siláží v první i druhé seči nebylo potvrzeno jejich zaplísnění, ani změna barvy či zápach siláží. Pokusné siláže vyhovovaly hygienické kvalitě siláží. Dle ZEMANA et al. (2006) jsou plísňe indikátory špatných skladovacích podmínek a kontaminovaná krmina jsou podmíněně zkrmitelná při koncentraci plísni do 10^5 KTJ/g a k zahřívání siláží dochází činností kvasinek, pokud dosáhnou počtu $10^7 - 10^8$ KTJ/g. WOOLFORD (1990) uvedl, že siláže s obsahem kvasinek nad 10^5 KTJ/g jsou náchylné k aerobnímu poškození.

Tab. 15: Průměrné hodnoty plísni a kvasinek ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Varinata	Plísňe		Kvasinky	
	1S	2S	1S	2S
Půda	$1,40 \times 10^5$	$3,59 \times 10^5$	$7,73 \times 10^3$	$1,86 \times 10^5$
PH	$1,27 \times 10^5$	$2,53 \times 10^5$	$2,32 \times 10^4$	$1,16 \times 10^5$
K0	$1,42 \times 10^2$	$8,60 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$6,89 \times 10^2$
K20	$8,00 \times 10^1$	$2,00 \times 10^2$	ND	$3,70 \times 10^2$
K40	$1,50 \times 10^1$	$1,40 \times 10^1$	1	$6,50 \times 10^1$
B0	$3,80 \times 10^1$	3	$5,80 \times 10^1$	ND
B20	$3,50 \times 10^1$	7	$5,00 \times 10^1$	ND
B40	$1,92 \times 10^2$	7	$9,70 \times 10^1$	ND
CH0	$2,41 \times 10^2$	6	$5,32 \times 10^2$	9
CH20	$3,95 \times 10^2$	$1,20 \times 10^1$	$2,41 \times 10^2$	$2,20 \times 10^1$
CH40	$1,44 \times 10^2$	$1,80 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1$	$3,60 \times 10^1$

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, PH – původní hmota, 1S – první seč, 2S – druhá seč

Aerobní stabilita

V modelových silážích byla pomocí sond hodnocena také teplota, jako ukazatel aerobní stability vojtěškových siláží. Průběh teplot u všech vzorků je uveden v příloze pro 1S na Obr. P12 a 2S na Obr. P13. Z Obr. P12 pro 1S je patrné, že u kontrolní varianty bez i s přidavkem povrchové vrstvy půdy (20 a 40 g/kg sušiny hmoty) se teplota zvýšila již po 9 hodinách aerace o 2 °C, což je podle WANG a NISHINO (2008)

hraniční hodnota aerobní stability a postupně docházelo ke zvyšování teploty u kontrolní varianty bez přídavku povrchové vrstvy půdy z původních 23 °C na 28 °C a u kontrolních variant s přídavkem povrchové vrstvy půdy (20 a 40 g/kg sušiny) z 22 °C na 27 °C. U modelových siláží ošetřených biologickým silážním aditivem s přídavkem i bez přídavku povrchové vrstvy půdy se teplota zvýšila po devíti hodinách z 22 °C na 24 °C a v 64. hodině teplota vzrostla na maximální hodnotu 25 °C. Modelová siláž ošetřená chemickým silážním přípravkem s přídavkem i bez přídavku povrchové vrstvy půdy měla nejnižší teplotu aerace 19 °C a postupně se teplota zvyšovala. Po pěti dnech dosáhla měřená teplota 24 °C. Z Obr. P12 vyplývá, že nejméně aerobně stabilní z hlediska teploty byla modelová siláž, která nebyla ošetřena silážními aditivem a byla s přídavkem nebo bez přídavku povrchové vrstvy půdy, neboť došlo ke zvýšení teploty o 2 °C hned po 9 hodinách aerace. Teplota již po otevření modelových siláží byla nejvyšší ze všech variant (23 °C), vzápětí se zvýšila o 2 °C v den otevření siláží a dále se postupně zvyšovala. Nejnižší teplota (19 °C) modelových siláží byla zjištěna u siláží ošetřených chemickým silážním přípravkem. Chemický silážní přípravek měl pozitivní vliv na posílení aerobní stability. Také KUNG a RANJIT (2001) současně potvrzují pozitivní vliv chemického silážního přípravku (s obsahem kyseliny mravenčí), na zvýšení aerobní stability u siláží z čiroku a kukuřice. U variant bez i s přídavkem povrchové vrstvy půdy byl u kontrolní varianty nárůst teplot o 5 °C, u variant ošetřených biologickým silážním aditivem jen o 3 °C.

U siláží ve 2S (Obr. P13) byl průběh teplot podobný jako u 1S (Obr. P12). Teplota u kontrolní siláže s přídavkem povrchové vrstvy půdy i bez přídavku povrchové vrstvy půdy byla 21 °C a po 10 hodinách aerace se zvýšila o 3 °C na 24 °C. Následně se teplota pohybovala ve stejné hodnotě až do 46 hodin, kdy se teplota aerací postupně zvyšovala až na 25 °C. U variant ošetřených biologickým silážním aditivem byla teplota modelových siláží po otevření silážních nádob nižší (19 °C) oproti kontrolní variantě. Podobně jako u kontrolní varianty se od 10. hodiny aerace postupně teplota zvyšovala až na teplotu 23 °C, tedy celkově o 4 °C. Stejná teplota modelových siláží (19 °C) ošetřených chemickým silážním přípravkem byla jako u variant ošetřených biologickým silážním aditivem. Po otevření silážních nádob postupně docházelo ke zvyšování teploty až na 23,5 °C.

U siláží obou sečí (1S i 2S) lze konstatovat podobný průběh teplot, kdy u kontrolních variant byla teplota po otevření siláží vždy nejvyšší a nejnižší u variant

ošetřených chemickým silážním přípravkem. KNICKÝ a SPÖRNDLY (2010) uvádějí posílení aerobní stability a snížení ztrát po použití chemických přípravků. Po 9 až 10 hodinách aerace byl zaznamenán nárůst teplot u kontrolních variant a u variant ošetřených biologickým silážním aditivem bez přídavku i s přídavkem povrchové vrstvy půdy a následně postupné zvyšování teplot. Mírně odlišný průběh nárůstu teploty měly vzorky modelových siláží, které byly ošetřeny chemickým silážním přípravkem.

Hodnocení kvality fermentačního procesu

Jednotlivé fermentační ukazatele vojtěškových siláží v první a druhé seči jsou uvedeny v tabulkách v příloze (Tab. P1.3.1 až Tab. P1.3.10).

Původní hodnota sušiny vojtěšky seté po zavadnutí byla v první seči (1S) 338,09 g/kg a v druhé seči (2S) 321,69 g/kg. Během skladování modelových siláží a následně po jejich otevření, byla zjištěna ztráta sušiny siláží z obou sečí (Tab. P1.3.1). V 1S byl obsah sušiny u kontrolní varianty snížen na hodnotu 327,67 g/kg (o 3,08 %) a ve 2S na obsah sušiny 311,78 g/kg (o 3,08 %) vzhledem k sušině zavadlé hmoty vojtěšky. MUCK et al. (2003) doporučují silážování při sušině nad 30 %, aby se zabránilo klostridiové fermentaci. S přídavkem povrchové vrstvy půdy byl obsah sušiny u 1S i 2S vyšší, což bylo u 1S statisticky průkazné ($P < 0,05$). V 1S po aplikaci biologického i chemického silážního přípravku se obsah sušiny nepatrně zvýšil.

U ošetřených siláží biologickým silážním aditivem byla hodnota pH (Tab. P1.3.2) statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) v 1S (o 6,52 %) a ve 2S (o 12,18 %) a také po ošetření chemickým silážním přípravkem v 1S (o 7,57 %) a ve 2S (o 14,53 %) ve srovnání s kontrolní variantou bez ošetření silážními aditivy. DRIEHUIS (2013) uvádí, že pH pod 4,2 je důležitým faktorem pro inhibici nežádoucích mikroorganismů. Průměrná hodnota pH se pohybuje u obou sečí okolo 4,5, což jsou hodnoty podobné hodnotám uvedených v pokusu DENONCOURT et al. (2007) u siláže vojtěšky seté. WHITER a KUNG (2001) uvádějí, že v siláži vojtěšky seté při 30 % sušině došlo ke zvýšení kyseliny mléčné a snížení pH v porovnání s kontrolní variantou již po dvou dnech zasilážování.

V 1S siláží bez přídavku povrchové vrstvy půdy byla nejnižší titrační kyselost (Tab. P1.3.3) u kontrolní varianty ($1393,3 \pm 132,0$ mg KOH/100 ml). Po přidání povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty byla titrační kyselost

statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) oproti variantě bez přidavku povrchové vrstvy půdy. Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl i mezi variantami s přidavkem půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. V siláži 2S nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými variantami s přidavkem i bez přidavku povrchové vrstvy půdy. Siláže s přidavkem biologického silážního aditiva v 1S i ve 2S měly statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) titrační kyselost v porovnání s kontrolní variantou bez ošetření. Rovněž MUCK (2004) uvádí vyšší hodnoty titrační kyselosti v silážích ošetřených mikrobiálními inokulanty ve srovnání s kontrolní variantou.

Obsah kyseliny mléčné (Tab. P1.3.4) v silážích v 1S byl statisticky průkazně nejnižší ($P < 0,05$) u varianty bez přidavku povrchové vrstvy půdy ($111,29 \pm 15,42$ g/kg sušiny) ve srovnání s variantou 20 a 40. Ve 2S byl obsah kyseliny mléčné nejnižší u kontrolní varianty, ale nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl. U ošetřených siláží biologickým silážním aditivem u obou sečí byl obsah kyseliny mléčné v silážích vyšší v porovnání s kontrolní variantou, avšak nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl. Také FILYA et al. (2007) potvrzují zvýšení množství kyseliny mléčné po aplikaci biologického silážního aditiva oproti kontrolní siláži. Současně i KALDMÄE et al. (2007) ve své studii popisují pozitivní vliv biologického silážního aditiva na fermentační proces.

Kyselina octová (Tab. P1.3.5) byla v siláži bez přidavku povrchové vrstvy půdy v 1S v množství $19,75 \pm 6,176$ g/kg sušiny a ve 2S $18,38 \pm 6,029$ g/kg sušiny. Modelová siláž ve 2S s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 g/kg sušiny hmoty měla statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) množství kyseliny octové (o 13,49 %) a s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty (o 33,03 %) vzhledem k siláži bez přidavku povrchové vrstvy půdy. Po ošetření pokusných siláží silážními aditivy se snížil obsah kyseliny octové. Statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) množství kyseliny octové bylo zaznamenáno v 1S u varianty CH vzhledem k variantě B a mezi B i CH a kontrolní variantou. Ve 2S bylo statisticky nižší množství ($P < 0,05$) kyseliny octové v modelových silážích ošetřených chemickým silážním přípravkem ($12,31 \pm 1,903$ g/kg sušiny) ve srovnání s kontrolní variantou a variantou ošetřenou biologickým silážním aditivem. Podobně MUCK et al. (2007) potvrzují vliv biologického silážního aditiva na snížení kyseliny octové, etanolu a zvýšení kyseliny mléčné ve srovnání s kontrolní siláží.

Kyselina máselná i kyselina propionová nebyly v modelových silážích z obou sečí detekovány. Výsledky uvedené v modelovém pokusu jsou shodné s výsledky publikovanými HASHEMZADEH-CIGARI et al. (2013).

Suma kyselin (Tab. P1.3.6) byla staticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) u siláží s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny oproti kontrolní varinatě bez povrchové vrstvy půdy u obou sečí. S postupným přidavkem povrchové vrstvy půdy do siláží byl poměr kyseliny mléčné k těkavým mastným kyselinám nižší ve 2S (Tab. P1.3.7).

Byl potvrzen pozitivní vliv přidavku silážních aditiv na snížení množství etanolu v silážích (Tab. P1.3.8). Statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) množství etanolu bylo u siláží ošetřených biologickým silážním aditivem v 1S (o 28,74 %) a ve 2S (o 61,69 %) vzhledem ke kontrolní variantě. Nejvýraznější vliv na potlačení tvorby etanolu měl chemický silážní přípravek, kde byl obsah etanolu redukován v 1S až na hodnotu $0,484 \pm 0,148$ g/kg sušiny a ve 2S na hodnotu $0,216 \pm 0,075$ g/kg sušiny. V siláži 1S byl sice počet kvasinek nejvyšší u varianty ošetřené chemickým silážním přípravkem, avšak etanol kvasinky produkovaly v malém množství. Příčinou může být skutečnost, že kvasinky ke svému metabolismu využily organické kyseliny obsažené v chemickém silážním přípravku, což potvrzuje i JANDEROVÁ a BENDO VÁ (1999). Je známo, že kvasinky mohou využívat jako zdroj uhlíku etanol, laktát, glycerol, pyruvát nebo i acetát.

Dalším sledovaným faktorem byl amoniak (Tab. P1.3.9). Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl u obou sečí u siláží s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty oproti kontrolní variantě bez přidavku povrchové vrstvy půdy. Bylo zaznamenáno statisticky průkazně nižší množství amoniaku v 1S (o 8,11 %) a ve 2S (o 42,15 %) u siláží ošetřených biologickým silážním aditivem a v 1S (o 51,25 %) a ve 2S (o 72,00 %) po ošetření chemickým silážním přípravkem vzhledem ke kontrolní variantě. Také TYROLOVÁ a VÝBORNÁ (2008) potvrzují vliv biologického a chemického silážního aditiva na snížení množství amoniaku ve vojtěškových silážích.

U modelových vojtěškových siláží v 1S a ve 2S byl zjištěn nízký stupeň proteolýzy (Tab. P1.3.10). U siláží z obou sečí byl stupeň proteolýzy statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) po aplikaci silážních aditiv, zejména chemického silážního přípravku.

Výživná hodnota jednotlivých variant siláží

Výživná hodnota pro obě seče a pro všechny varianty pokusných siláží je uvedena v příloze Tab. P1.3.11A, Tab. P1.3.11B.

U ošetřených variant siláží biologickým i chemickým silážním přípravkem se obsah popela u 1S postupně snižoval. Obsah dusíkatých látek se pohyboval v průměru okolo 195 g/kg sušiny v 1S i ve 2S.

Obsah tuku ve vojtěškových silážích byl vyšší v 1S (45,23 g/kg sušiny) i ve 2S (41,28 g/kg sušiny), obsah vlákniny byl nepatrně nižší v 1S (254,91 g/kg sušiny), 2S (277,24 g/kg sušiny). Brutto energie siláží se pohybovala v hodnotách u 1S od 17,42 – 19,29 MJ/kg sušiny a u 2S od 17,48 – 18,29 MJ/kg sušiny, organická hmota (OH) u 1S byla od 851,70 – 911,44 g/kg sušiny, u 2S od 871,08 – 925,28 g/kg sušiny. BNLV u 1S 344,97 – 432,69 g/kg sušiny, u 2S 359,30 – 414,91 g/kg sušiny. Dosažené výsledky jsou podobné s výsledky jiných publikovaných prací. Například HASSANAT et al. (2014) ve svém pokusu z vojtěškových siláží s obsahem sušiny 34,7 % se prakticky ztotožňuje s hodnotami ADF, NDF, kyselinou mléčnou, kyselinou octovou, nepřítomností kyseliny propionové a máselné s hodnotami v uvedeném pokuse. Podobně COBLENTZ et al. (2012) ve svém pokusu uvádějí u kontrolní siláže podobné hodnoty sušiny (34,2 %), ADF, NDF, popele i dusíkatých látek.

5.2 Monitoring provozních podmínek

Do sledování byly zařazeny dva provozy:

1.) **Provoz A** – byly odebrány vzorky krmiv: kukuřičná siláž, siláž ze zavadlé píče jetelovin (dále jen jetelová siláž), travin (dále jen travní siláž), seno (luční), sláma (ovesná), směs produkční, TMR (kukuřičná siláž, jetelová siláž, sláma, směs produkční) a současně byl odebrán volně ložený separát (separovaná kejda skotu). Dále byly provedeny stěry z povrchu struků, odběry syrového mléka, bachorové tekutiny a výkaly od osmi krav.

2.) **Provoz B** – byly odebrány vzorky krmiv: obilní šrot, TMR (kukuřičná siláž, jetelotravní směs, sláma, obilní šrot, mláto, produkční směs), jetelotravní směs, mláto, kukuřičná siláž, sláma, produkční směs. Dále byly provedeny stěry z povrchu struků, odběry syrového mléka, bachorové tekutiny a výkalů od šesti krav. Byl získán separát (separovaná kejda skotu).

Rozbory:

- mikrobiologická analýza,
- fermentační proces,
- aerobní stabilita,
- rozbor organických živin.

Mikrobiologická analýza

Pro provoz A byla provedena mikrobiologická analýza u vzorků krmiv a separované kejdy (dále jen separátu), které jsou uvedeny v Tab. 16.

Clostridium perfringens bylo zjištěno u provozu A jen v separátu v množství $9,00 \times 10^1$ KTJ/g. Současně byly v separátu diagnostikovány nejvyšší hodnoty sporulujících mikroorganismů v řádu 10^5 KTJ/g. VISSERS et al. (2006) přišli k závěru, že koncentrace spor klostridií vyšší než 10^5 KTJ/g v silážích vede ke zvýšení pravděpodobnosti jejich výskytu v nádržích na mléko v množství nad 1000 spor klostridií/l.

Nejvyšší CPM se pohyboval v řádu 10^7 KTJ/g u TMR, slámy a separátu. Zvýšené hodnoty plísní (nad 10^5 KTJ/g) byly zjištěny u TMR, slámy, lučního sena a vyšší hodnoty kvasinek byly objeveny v TMR a ve slámě než doporučuje MUDŘÍK et al. (2006). WILKINSON (2005) uvádí, že při vyšší koncentraci plísní lze očekávat výskyt toxinogenních druhů hub. Kvasinky byly v TMR v množství $1,48 \times 10^6$ KTJ/g, což hraničí s hodnotou kvasinek (nad 10^7 KTJ/g), kdy dochází dle ZEMANA et al. (2006) k zahřívání siláží. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* dosahovaly nejvyšších počtů, a to u TMR a separátu až řádově 10^4 KTJ/g. Z celkové mikrobiologické analýzy můžeme usoudit, že z hygienického hlediska byla nejméně kvalitní TMR, přičemž zdrojem klostridií byl separát.

Tab. 16: Provoz A – mikrobiologická analýza krmiv a separátu v KTJ/g

Vzorek	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Bakterie č. <i>Enterobact.</i>	SP	<i>Clostridium perfringens</i>
TMR	$1,04 \times 10^7$	$6,98 \times 10^6$	$1,35 \times 10^5$	$1,48 \times 10^6$	$2,31 \times 10^4$	$7,27 \times 10^3$	ND
Jetelová siláž	$4,09 \times 10^5$	$1,00 \times 10^4$	ND	$2,73 \times 10^3$	9	$1,82 \times 10^3$	ND
Směs produkční	$1,77 \times 10^6$	$1,86 \times 10^5$	$3,68 \times 10^4$	$5,00 \times 10^3$	$8,93 \times 10^3$	$4,09 \times 10^3$	ND
Travní siláž	$4,55 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$1,59 \times 10^4$	$1,91 \times 10^4$	ND	$1,82 \times 10^3$	ND
Kukuřičná siláž	$4,09 \times 10^5$	$5,41 \times 10^4$	$4,55 \times 10^2$	$6,36 \times 10^3$	$8,20 \times 10^1$	$2,73 \times 10^3$	ND
Sláma (ovesná)	$4,02 \times 10^7$	$3,68 \times 10^4$	$2,40 \times 10^5$	$8,13 \times 10^5$	$8,45 \times 10^3$	ND	ND
Seno (luční)	$1,68 \times 10^6$	$5,41 \times 10^4$	$1,92 \times 10^5$	$1,36 \times 10^3$	$1,80 \times 10^1$	$1,36 \times 10^3$	ND
Separát	$1,02 \times 10^7$	$2,82 \times 10^4$	$9,41 \times 10^2$	$3,20 \times 10^1$	$1,69 \times 10^4$	$5,47 \times 10^5$	$9,00 \times 10^1$

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, SP – sporulující mikroorganismy, TMR – směsná krmná dávka, ND – neidentifikováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g

Rozbor krmiv a separátu z provozu B je uveden v Tab. 17. *Clostridium perfringens* bylo zjištěno v produkční směsi, jetelotravní směsi a nejvyšší hodnoty (10^3 KTJ/g) v separátu. Současně byly zjištěny v separátu a TMR nejvyšší hodnoty sporulujících mikroorganismů (10^5 KTJ/g). VISSERS et al. (2007b) v Nizozemí detekovali spory klostridií u TMR v množství 10^4 KTJ/g. Nejvyšší CPM se pohyboval v řádu 10^8 KTJ/g u vzorků mláta a slámy. Zvýšený počet plísní byl zjištěn u slámy v množství $1,48 \times 10^5$ KTJ/g. Vyšší hodnoty kvasinek (nad 10^4 KTJ/g), než které jsou doporučeny DOLEŽALEM et al. (2010), ZEMANEM et al. (2006), MUDŘÍKEM et al. (2006) jako maximální koncentrace kvasinek, byly stanoveny u TMR, mláta, kukuřičné siláže a slámy. Již WOOLFORD v roce 1990 upozorňoval, že siláže s obsahem kvasinek nad 10^5 KTJ/g jsou náchylné k aerobnímu poškození. Ve slámě byl současně stanoven i vyšší počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tab. 17: Provoz B – mikrobiologická analýza krmiv a separátu v KTJ/g

Vzorek	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Bakterie č. Enterobact.	SP	<i>Clostridium perfringens</i>
Obilní šrot	$9,09 \times 10^6$	$1,36 \times 10^4$	$3,41 \times 10^4$	$1,64 \times 10^4$	$3,05 \times 10^3$	$4,09 \times 10^3$	ND
Produkční směs	$2,68 \times 10^6$	$5,45 \times 10^4$	$1,59 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$2,59 \times 10^3$	$3,64 \times 10^3$	9
TMR	$1,00 \times 10^7$	$2,16 \times 10^7$	ND	$2,13 \times 10^5$	$1,82 \times 10^2$	$3,07 \times 10^5$	ND
Jetelotrav. směs	$7,27 \times 10^5$	$1,14 \times 10^5$	ND	$4,55 \times 10^3$	$4,60 \times 10^1$	$6,36 \times 10^3$	$1,40 \times 10^1$
Separát	$1,55 \times 10^7$	$1,45 \times 10^6$	$1,85 \times 10^3$	$4,68 \times 10^3$	$1,36 \times 10^5$	$6,20 \times 10^5$	$1,55 \times 10^3$
Mláto	$1,36 \times 10^8$	$6,43 \times 10^7$	ND	$7,91 \times 10^6$	$7,73 \times 10^2$	$1,10 \times 10^5$	ND
Kukuřičná siláž	$5,91 \times 10^7$	$2,79 \times 10^7$	ND	$1,85 \times 10^5$	$9,00 \times 10^1$	$1,06 \times 10^5$	ND
Sláma	$5,98 \times 10^8$	$6,36 \times 10^4$	$1,48 \times 10^5$	$4,89 \times 10^5$	$1,21 \times 10^6$	$6,36 \times 10^3$	ND

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, SP – sporulující mikroorganismy, TMR – směsná krmná dávka, ND – neidentifikováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g

V provozu A bylo zjištěno *Clostridium perfringens* v bachorové tekutině ve dvou vzorcích v řádu 10^1 KTJ/ml (Tab. P2.1.1). Sporulující mikroorganismy se pohybovaly v řádu 10^3 – 10^4 KTJ/ml.

Ve výkalech (Tab. P2.1.2) bylo zjištěno pomocí mikrobiologické analýzy *Clostridium perfringens* u všech dojnic. Dosahovaly nejvyšších hodnot v řádu 10^3 KTJ/g. Počty sporulujících mikroorganismů byly řádově v hodnotách 10^5 KTJ/g. Přítomnost spor klostridií ve výkalech potvrzuje SONGER (2010).

V syrovém kravském mléce byl mírně zvýšený CPM (Tab. P2.1.3A) u dvou dojnic v množství $2,45 \times 10^5$ KTJ/ml a $1,05 \times 10^5$ KTJ/ml (vz. č. 1 a 7), než je uvedeno v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu (obsah mikroorganismů při 30 °C do 100 000 KTJ v 1 ml mléka). INNOCENTE a BIASUTTI (2013) stanovili CPM v syrovém kravském mléce pomocí automatického a konvenčního dojení v množství 10^4 KTJ na ml mléka.

Clostridium perfringens nebylo v syrovém kravském mléce zjištěno. Sporulující mikroorganismy dosahovaly hodnot do 10^1 KTJ/ml. Dle ČSN 57 0529 by se sporulující anaerobní bakterie neměly vyskytovat v 0,1 ml mléka. V Nizozemí dle VISSERS et al.

(2007b) byly sledovány spory klostridií jako podklad pro výkupní cenu mléka a mělo by jich být do 1000 spor klostridií/l.

Psychrotrofní i koliformní mikroorganismy (Tab. P2.1.3B) byly stanoveny ve vzorcích v množství nepřesahující limit dle ČSN 57 0529, tzn. u psychrotrofních mikroorganismů do 50 000 KTJ/ml mléka a u koliformních mikroorganismů do 1000 KTJ/ml mléka.

Ani u stěrů z povrchu struků (Tab. P2.1.4) nebylo zjištěno *Clostridium perfringens*, což svědčí o dobré hygieně struků před dojením dojnic.

V provozu B bylo nalezeno *Clostridium perfringens* v bachorové tekutině (Tab. P2.2.1) a ve výkalech v řádu 10^1 KTJ/g (Tab. P2.2.2) jen u jedné dojnice. Sporující mikroorganismy byly analyzovány u všech dojnic v bachorové tekutině v množství 10^6 KTJ/ml (Tab. P2.2.1) a ve výkalech (Tab. P2.2.2) také v řádu 10^6 KTJ/g.

Rozbor syrového kravského mléka (Tab. P2.2.3A) od všech dojnic splňoval limit podle ČSN 57 0529 u CPM do 100 000 KTJ v 1 ml mléka.

JULIEN et al. (2008) v Kanadě potvrdili výskyt klostridií v syrovém kravském mléce (*Clostridium disporicum*, *Clostridium tyrobutyricum*), ve stájovém prostředí (*Clostridium tyrobutyricum*), v kukuřičné a travní siláži.

Plísňe, kvasinky a enterokoky se vyskytovaly ve vzorcích syrového kravského mléka (Tab. P2.2.3A, P2.2.3B) v zanedbatelném množství. *Clostridium perfringens* nebylo ve vzorcích syrového mléka zjištěno. Sporující mikroorganismy byly zjištěny v řádu 10^1 KTJ/ml mléka (Tab. P2.2.3A). Podle normy ČSN 57 0529 by měl být negativní průkaz sporotvorných anaerobních bakterií v 0,1 ml mléka. PAHLOW et al. (2003) uvádějí, že v důsledku rozvoje nežádoucích mikrobiálních spor může být ovlivněna kvalita mléka a současně i zdraví zvířat.

Nejvyšší hodnoty psychrotrofních mikroorganismů v syrovém kravském mléce byly $3,31 \times 10^2$ KTJ/ml (Tab. P2.2.3B), což nepřesahuje limitní hodnoty (do 50 000 KTJ/ml mléka) uvedené v ČSN 57 0529. Vyšší počty psychrotrofních mikroorganismů se mohou vyskytovat v syrovém kravském mléce při nedostatečné hygieně dojícího zařízení, mléčného potrubí či chladících nádrží pro uchování mléka. Současně souvisí vyšší počty psychrotrofních mikroorganismů s delší dobou skladování syrového i chlazeného kravského mléka (VITHANAGE et al. 2014; HASSAN a FRANK, 2011).

CHEN et al. (2003) poukazují na problematiku zvýšení počtu psychrotrofních bakterií v syrovém kravském mléce, které produkují termorezistentní extracelulární

proteolytické a lipolytické enzymy, a ty představují riziko při zpracování mléka (kažení konečných produktů). Koliformní bakterie v syrovém mléce se pohybovaly v řádu $10^1 - 10^2$ KTJ/ml (Tab. P2.2.3B), což odpovídá hodnotám uvedených v ČSN 57 0529 do 1 000 KTJ/ ml mléka. HANUŠ et al. (2008) zjistili podobné hodnoty mikroorganismů v syrovém kravském mléce – koliformní bakterie v množství $1,4 \times 10^2$ KTJ v 1 ml mléka a psychrotrofní mikroorganismy v množství 5×10^3 KTJ/ml. Také JANŠTOVÁ et al. (2011) poukazuje na mikrobiologické hodnoty syrového kravského mléka nižší než je doporučený limit, podobně jako v uvedeném sledování. Vyšší množství koliformních bakterií v syrovém kravském mléce bývá spojeno s nedostatečnou hygienou struků, které byly fekálně znečištěny a bakterie pronikly během dojení do mléka. Některé druhy koliformních bakterií společně se stafylokoky a streptokoky způsobují mastitidy, které jsou závažné z ekonomického i epidemiologického hlediska (KUANG et al. 2009; LANGERHUUS et al., 2013).

Vzorky stěrů z povrchu struků dojníc před dojením neobsahovaly *Clostridium perfringens*. CPM, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a ostatní anaerobní mikroorganismy byly ve vzorcích v nepatrném množství (Tab. P2.2.4).

Aerobní stabilita

KE et al. (2015) definují aerobní stabilitu jako dobu po otevření sila než se zvýší teplota siláže o 2 ° C vzhledem k okolní teplotě.

V provozu A byla měřena teplota jako ukazatel aerobní stability u všech odebraných vzorků z provozních podmínek po dobu 5 dnů. Na Obr. P14 v příloze je patrné, že nejméně aerobně stabilní z hlediska teploty byla TMR, kdy po 25 hodinách aerace byl pozorován prudký nárůst teploty, a po 41 hodinách dosahovala teplota 40 °C u TMR. Maximální teplota, která byla u TMR naměřena, byla 44 °C za 86 hodin aerace. Dalším nestabilním odebraným vzorkem byla kukuřičná siláž. Po 8 hodinách došlo k její destabilizaci, kdy se teplota zvýšila o 2 °C a po 30 hodinách aerace nastalo prudké zvýšení teploty až na 40 °C. U separátu můžeme pozorovat ihned nárůst teploty. Během 4 hodin se teplota zvýšila o 2 °C z původních 20 °C na 22 °C. Nejvyšší teplota 24,5 °C u separátu byla dosažena po 16 hodinách a pak se po celou dobu udržovala při 22 – 23 °C. U jetelové siláže docházelo v průběhu času k postupnému zvyšování teploty až na 33,5 °C. Za 8 hodin se zvýšila původní teplota z 18 °C na 20 °C. U slámy se

teplota zvyšovala postupně až na 25 °C z původní teploty 20 °C. Směs produkční měla velmi podobný vývoj teploty jako travní senáž, kdy se teplota zvýšila z 19 °C na 24 °C za 96 hodin.

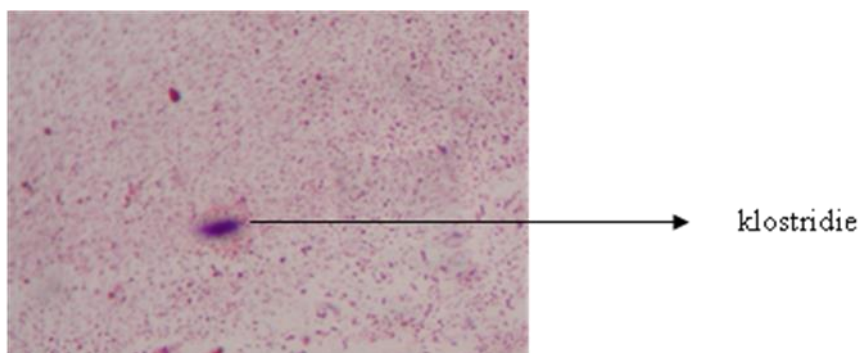
U provozu B byl průběh teplot u všech odebraných vzorků zaznamenáván po dobu 5 dnů a je uveden v příloze Obr. P15. Je patrné, že TMR byla z hlediska teploty aerobně nestabilní, stejně jako u provozu A. Již z počátku teplota dosahovala 25 °C a ihned za 1 hodinu se teplota TMR zvýšila o 2 °C. Za 30 hodin teplota dosahovala 44,5 °C. Maximální teplota byla u TMR 47 °C za 119 hodin vystavení působení vzduchu. Dalším aerobně nestabilním odebraným vzorkem byl separát. Zde separát vykazoval zahřívání již po dvou hodinách. Nejvyšší teplota u separátu byla za 54 hodin 42 °C a následně se teplota chvíli držela a postupně klesala až na 39 °C. U kukuřičné siláže můžeme z Obr. P15 zjistit opět destabilizaci vzorku. Teplota se prudce zvyšovala, po 4 hodinách se zvýšila o 2 °C a dosáhla nejvyšší teploty 40,5 °C za 50 hodin aerace. U mláta se teplota již od první hodiny aerace vzorku postupně zvyšovala až na 41 °C. U jetelotravní senáže se teplota prudce zvyšovala z 19°C až na 34,5 °C. Sláma, koncentrát a obilní šrot měly podobný průběh teplot během sledování aerobní stability. Teplota se pomalu zvyšovala a po 22 hodinách se zvýšila o 2 °C a dosahovala hodnot z původních 23 °C až na 25 – 26 °C, které si vzorky po celou dobu aerace udržovaly.

5.3 Potvrzení přítomnosti *Clostridium perfringens*

Biochemické testy a Gramovo barvení se využívají při identifikaci mikroorganismů. Pomocí Gramova barvení a biochemických testů byl identifikován rod *Clostridium*. Pro upřesnění druhu klostridií byla použita metoda PCR.

Gramovo barvení

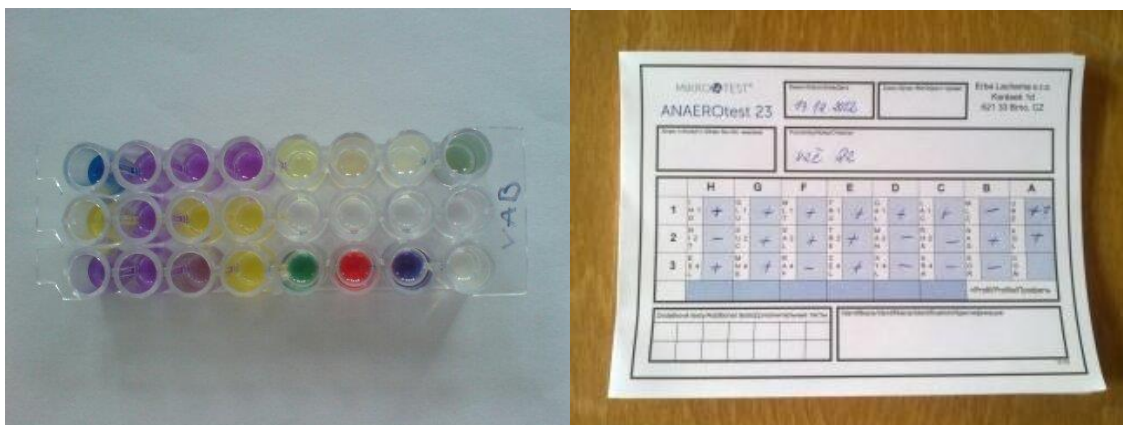
Pomocí Gramova barvení byl identifikován rod *Clostridium*. Na Obr. 7 je vyfocena klostridie. Jedná se o tyčinkovitou bakterii zbarvenou do fialova, což značí, že se jedná o grampozitivní bakterii.



Obr. 7: Gramovo barvení – klostridie (zdroj vlastní)

Biochemické testy

Pomocí biochemických testů (Obr. 8) bylo zjištěno, že vzorky obsahují mikroorganismy, jako jsou klostridie (*Clostridium ramosum*, *Clostridium tertium*, *Clostridium perfringens*), laktobacily (*Lactobacillus acidophilus*) a také *Blautia producta*, *Actinomyces israelii*, *Bifidobacterium breve*.



Obr. 8: Ukázka biochemického testu a jeho vyhodnocení (zdroj vlastní)

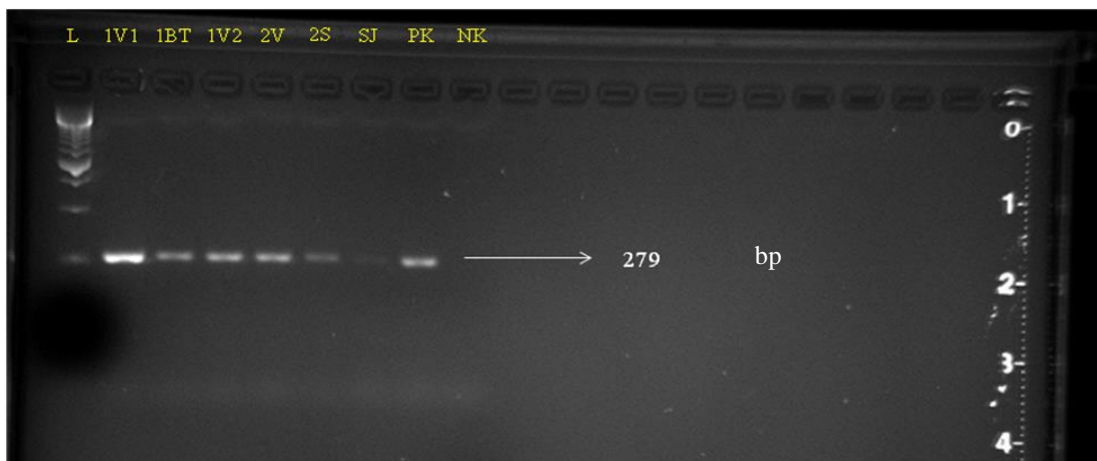
Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Po přeočkování a přečištění vzorků, u kterých bylo nalezeno *Clostridium perfringens*, byly izoláty podrobeny PCR. ALBINI et al. (2008) využili k identifikaci bakterie *Clostridium perfringens* metodu klasické i real-time PCR.

Výsledky PCR jednotlivých izolátů *Clostridium perfringens* (1V1 – SJ) získané z modelových jetelových siláží, z provozních podmínek – podestýlky (separátu) a výkalů jsou znázorněny na Obr. 9.

Současně byla provedena pozitivní a negativní kontrola (Obr. 9). Pozitivní kontrola obsahovala pozitivní druh bakterie *Clostridium perfringens* CCN 4991 (Česká sbírka mikroorganismů) pro vyloučení falešně negativní reakce. Negativní kontrola neobsahovala templátovou DNA a byla současně stanovena s ostatními vzorky z důvodu vyloučení případné kontaminace a falešně pozitivní reakce.

Z Obr. 9 je patrné, že všechny izoláty obsahovaly ve své gDNA gen 16 S rRNA identifikující *Clostridium perfringens*, což je potvrzeno i vizualizací amplikonu o 279 bp. Pomocí negativní kontroly bylo potvrzeno, že nedošlo ke kontaminaci ostatních vzorků a k falešně pozitivní reakci.



Obr. 9: PCR pro detekci izolátů Clostridium perfringens (zdroj vlastní)

L – ladder, 1V1, 1V2 – výkaly z provozu A, 1BT – bachorová tekutina z provozu A, 2V – výkaly z provozu B, 2S – separát z provozu B, SJ – siláž z jetele (vzorek B40), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Lze tedy konstatovat, že se primery navázaly na DNA všech stanovovaných izolátů a je zde potvrzena příslušnost k druhu *Clostridium perfringens*.

GURJAR et al. 2008 ve své studii zjistili přítomnost *Clostridium perfringens* ve výkalech mléčného skotu. Nejrozšířenější výskyt byl zjištěn u bakterie *Clostridium perfringens* produkující toxin typu A.

ALBINI et al. (2008) se shodují s uvedeným pokusem o potvrzení výskytu *Clostridium perfringens* ve výkalech (výtěr z živých zvířat) nebo ve střevním obsahu (získán při pitvě).

6 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce s názvem "Riziko výskytu klostridií v silážích a ve výkalech dojníc" pojednává o možnosti vnesení klostridií s povrchovou vrstvou půdy během sklizně píce do materiálu určeného k silážování. Pro modelový pokus byly založeny pokusné siláže s různou úrovní kontaminace rostlinného materiálu povrchovou vrstvou půdy v množství 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. Současně byl sledován vliv biologického a chemického silážního aditiva. Pokusné modelové siláže byly podrobeny mikrobiologické analýze. Kromě klostridií (*Clostridium perfringens*) a sporulujících mikroorganismů (spory ostatních klostridií a bacilů) byla práce rozšířena o posouzení celkového mikrobiologického rizika a doplněna o základní rozbory pro zjištění fermentačního procesu a výživné hodnoty siláží. Uvedené rozbory byly dále rozšířeny o zhodnocení celkové kvality a hygienické úrovně pokusných siláží. Veškeré výsledky tvoří ucelený a kompletní přehled o kvalitě modelových pokusných siláží a vzorků získaných z provozních podmínek.

Součástí prvního cíle experimentální části disertační práce bylo založit tři modelové pokusy. První modelový pokus byl zaměřen na silážování zavadlé píce z jetele lučního a stanovení mikrobiologické analýzy při kontaminaci povrchovou vrstvou půdy (0, 20, 40 g/kg sušiny hmoty) a po ošetření hmoty k silážování biologickým a chemickým silážním aditivem. *Clostridium perfringens* nebylo detekováno v původní nezavadlé hmotě jetele lučního, ale bylo zjištěno v povrchové vrstvě půdy v množství 8 KTJ/g a následně v siláži u varianty B40 v množství $2,70 \times 10^1$ KTJ/g. Sporulující mikroorganismy byly zjištěny v původní nezavadlé hmotě jetele lučního v množství $1,32 \times 10^1$ KTJ/g a v povrchové vrstvě půdy v množství $1,46 \times 10^1$ KTJ/g. Nejvyšší počty sporulujících mikroorganismů s přidavkem povrchové vrstvy půdy a po ošetření chemickým i biologickým silážním aditivem dosahovaly hodnot do 10^2 KTJ/g siláže. Vyšší počet sporulujících mikroorganismů nebyl zjištěn po přidání půdy do rostlinného materiálu určeného k silážování. Avšak statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) počet sporulujících mikroorganismů byl u varianty ošetřené biologickým silážním aditivem (B) ve srovnání s kontrolní skupinou (K) a současně mezi variantami K20 a B40. Chemický silážní přípravek inhiboval růst *Clostridium*

perfringes. Výskyt *Clostridium perfringes* koresponduje s vyšším počtem sporulujících mikroorganismů u varianty B40. Lze tedy konstatovat, že u varianty B40 vlivem přídavku povrchové vrstvy půdy v množství 40 g/kg sušiny hmoty a ošetření biologickým silážním aditivem vedlo k nedostatečné fermentaci hmoty za vzniku nedostatečného množství kyseliny mléčné, charakterizované růstem klostridií a ostatních sporulujících mikroorganismů, tedy spor klostridií. Současně byl zjištěn výskyt kyseliny máselné, vyšší stupeň proteolýzy, vyšší výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a po vystavení modelových siláží vzduchu byla siláž aerobně nestabilní již po 15 hodinách aerace. Jednalo se tedy o hygienicky závadnou (nekvalitní) siláž.

Ve druhém modelovém pokusu byla zvolena jako pokusná píce vojtěška setá o dvou sušínách (S1 = 331,60 g/kg, S2 = 355,01 g/kg). *Clostridium perfringes* bylo detekováno jen v nezavdlé hmotě u S2 v množství 5 KTJ/g. V povrchové vrstvě půdy bylo *Clostridium perfringes* zjištěno u S1 v množství 20 KTJ/g a u S2 v množství 10 KTJ/g. V původní nezavdlé píci byl počet sporulujících mikroorganismů u S1 v řádu 10^2 KTJ/g, u S2 byl o dva řády vyšší (10^4 KTJ/g), v povrchové vrstvě půdy u S1 i S2 v řádu 10^5 KTJ/g. U pokusných modelových siláží bylo *Clostridium perfringes* zjištěno u S1 pro každou uvedenou variantu (K40, B20, B40, CH20, CH40) v množství 5 KTJ/g siláže. Můžeme usuzovat, že *Clostridium perfringes*, které bylo zjištěno ve vyšším množství v povrchové vrstvě půdy u S1 oproti S2, mělo vliv na výskyt *Clostridium perfringes* v silážích s přídavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty. U všech variant siláží dosahovaly sporulující mikroorganismy počtů v rozmezí $10^1 - 10^3$ KTJ/g. S přídavkem povrchové vrstvy půdy se zvyšoval počet sporulujících mikroorganismů u S1 i S2, ale statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) počet byl jen u S1, což koresponduje s výskytem *Clostridium perfringes*. Nebyl zjištěn statisticky průkazný vliv ($P < 0,05$) silážních aditiv na snížení počtu sporulujících mikroorganismů. U S1 a S2 byly některé hodnoty fermentačního procesu mírně zvýšeny.

Ve třetím modelovém pokusu byla vojtěška setá sklizena ve dvou sečích (1S, 2S). *Clostridium perfringes* nebylo zjištěno v původní hmotě, ani v povrchové vrstvě půdy u obou sečí, ani v pokusných modelových silážích. Sporulující mikroorganismy v původní hmotě byly v 1S i ve 2S v řádu 10^4 KTJ/g, v povrchové vrstvě půdy v 1S v řádu 10^5 KTJ/g, u 2S o jeden řád nižší (10^4 KTJ/g). Nejvyšší počty sporulujících

mikroorganismů dosahovaly hodnot u 1S $10^3 - 10^4$ KTJ/g siláže, u 2S o řád nižší $10^2 - 10^3$ KTJ/g siláže. S přidavkem povrchové vrstvy půdy v 1S se množství sporulujících mikroorganismů zvyšovalo. Byl zaznamenán pozitivní vliv chemického silážního přípravku na statisticky průkazně nižší ($P < 0,05$) množství sporulujících mikroorganismů ve srovnání s kontrolní variantou v 1S i ve 2S. Fermentační proces v silážích z obou sečí probíhal úspěšně a siláže byly z hygienického hlediska hodnoceny jako nezávadné. Experimentem byla potvrzena hypotéza, že použití silážních aditiv vede ve většině případů k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů a kontaminace siláží ze zavadlé píce jetele lučního či vojtěšky seté povrchovou vrstvou půdy k jejich zvýšení.

V rámci druhého cíle předkládané práce byly odebrány vzorky krmiv, bachorové tekutiny, syrového kravského mléka, stěry z povrchu struků, výkaly a separát ze dvou provozů. U TMR v provozu A byl zjištěn vyšší počet plísní, kvasinek, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, CPM a v provozu B vyšší počet sporulujících mikroorganismů a kvasinek. Současně po vystavení TMR vzduchu se u obou provozů během několika hodin prudce zvyšovala její teplota. Lze tedy konstatovat, že TMR byla aerobně nestabilní.

Clostridium perfringens bylo detekováno u obou provozů v separátu (v provozu A v řádu 10^1 KTJ/g, v provozu B v řádu 10^3 KTJ/g), v bachorové tekutině v řádu 10^1 KTJ/ml (v provozu A u dvou dojnic, v provozu B u jedné dojnice), ve výkalech (v provozu A v množství 10^3 KTJ/g a v provozu B byly vyšší hodnoty řádově 10^6 KTJ/g), avšak *Clostridium perfringens* nebylo zjištěno ve stěrech z povrchu struků a v syrovém kravském mléce, což svědčí o dobré hygieně struků před dojením. *Clostridium perfringens* se v malém množství přirozeně vyskytuje ve výkalech lidí i dojnic. V provozu B bylo zjištěno *Clostridium perfringens* v produkční a jetelotravní směsi v množství do 10^1 KTJ/g. Sporulující mikroorganismy byly detekovány v bachorové tekutině v provozu A v rozmezí $10^3 - 10^4$ KTJ/ml, ve výkalech 10^5 KTJ/g, v provozu B v bachorové tekutině i ve výkalech v množství 10^6 KTJ/g, což koresponduje s obsahem *Clostridium perfringens*. V syrovém kravském mléce byl detekován počet sporulujících mikroorganismů u obou provozů řádově 10^1 KTJ/ml mléka. V provozu A byl zaznamenán zvýšený počet CPM v syrovém mléce u dvou dojnic, než je doporučeno dle ČSN 57 0529. Jednalo se tedy o vzorky mléka, které byly

z hygienického hlediska závadné. Ostatní mikroorganismy splňovaly limity stanovené ČSN 57 0529. Monitoringem provozních podmínek byla potvrzena hypotéza výskytu klostridií v provozních podmínkách.

Třetím cílem práce bylo potvrzení výskytu klostridií pomocí Gramova barvení, biochemických testů a PCR. Pomocí PCR bylo identifikováno a potvrzeno *Clostridium perfringens*, a to v prvním modelovém pokusu v siláži ze zavadlé píce jetele lučního ve vzorku B40, dále u monitoringu provozních podmínek v provozu A v bachorové tekutině a ve výkalech a v provozu B rovněž ve výkalech a také v separátu. V silážích ze zavadlé píce vojtěšky seté nebyl prokázán výskyt *Clostridium perfringens* pomocí PCR ani při záměrné kontaminaci vzorků povrchovou vrstvou půdy.

Závěrem lze tedy konstatovat, že klostridie i sporulující mikroorganismy se v provozních podmínkách vyskytovaly v bachorové tekutině, výkalech a separátu. Avšak pomocí metody PCR bylo detekováno *Clostridium perfringens* ve výkalech u obou provozů, v bachorové tekutině (provoz A) a v separátu (provoz B). U výkalů v provozu B, kde byl zjištěn vyšší počet *Clostridium perfringens* i sporulujících mikroorganismů, nebyly dostatečně eliminovány klostridie během výroby separátu, což mohlo být způsobeno nedostatečným záhřevem či krátkou dobou záhřevu při výrobě separátu.

Prevenčí pro výskyt nežádoucích mikroorganismů (zejména klostridií) v silážích je dodržování správné výrobní praxe, otevírání siláží a jejich následné zpracování. V provozních podmínkách pro dodržení správné hygienické praxe bych doporučila dodržování technologického postupu výroby separátu, zejména dodržování doby a teploty ošetření separátu, následně přidání mletého vápence do separátu v doporučeném poměru 3-4:1, jeho vhodné uskladnění a zvýšit četnost výměny separátu. Pokud to umožní technické podmínky pro výrobu separátu, zvýšení teploty a doby ošetření sníží pravděpodobnost výskytu klostridií na minimum.

7 SEZNAM LITERATURY

ABBERTON M. T., MARSHALL A. H., 2005: Progress in breeding perennial clovers for temperate agriculture: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *The Journal of Agricultural Science*, 143(2-3): 117-135. ISSN 0021-8596.

ABU-ELNAGA A. S. M., HEDIA R. H., ATA N. S., ZAKI M. S., 2014: Bacterial aspect of Food Poisoning. *Life Science Journal*, 11(3): 290-298. ISSN 1097-8135.

ALBINI S., BRODARD I., JAUSSI A., WOLLSCHLAEGER N., FREY J., MISEREZ R., ABRIL C., 2008. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 127(1–2): 179-185. ISSN 0378-1135.

ALBRECHT K. A., BEAUCHEMIN K. A., 2003: Alfalfa and other perennial legume silage, s. 633-644. In: BUXTON D. R., MUCK R. E., HARRISON J. H. (eds): *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy.

ALONSO V. A., PEREYRA C. M., KELLER L. A. M., DALCERO A. M., ROSA C. A. R., CHIACCHIERA S. M., CAVAGLIERI L. R., 2013: Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3): 637-643. ISSN 1364-5072.

AOAC, 1990: Official Methods of Analysis. In: HERLICK K., (ed.): *Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. USA: Arlington, 1230 s.

ARMSTRONG J. A., SCHULZ J. R., 2008: Agarose Gel Electrophoresis, s. 7.2.1-7.2.20. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley publishers.

ARONOFF D. M., 2013: *Clostridium novyi*, *sordellii*, and *tetani*: Mechanisms of disease. *Anaerobe*, 24: 98-101. ISSN 1075-9964.

ATKINSON W., HAMBORSKY J., MCINTYRE L., WOLFE CH., 2008: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10th ed. Washington DC: Public Health Foundation, 360 s. ISBN 9990234221.

AURELI P., FRANCIOSA G., SCALFARO C., 2011: Pathogens in Milk | *Clostridium* spp., s. 47-53. In: FUQUAY J. W. (ed.): *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 4170 s.

BACHMANN H. P., BÜTIKOFER U., FRÖHLICH-WYDER M.-T., ISOLINI D., JAKOB E., 2011: Cheese | Swiss-Type Cheeses, s. 712-720. In: FUQUAY J. W. (ed.): *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 4170 s.

BELL J. F., OFFER N. W., ROBERTS D. J., 2007: The effect on dairy cow performance of adding molassed sugar beet feed to immature forage maize at ensiling or prior to feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1–2): 84-92. ISSN 0377-8401.

BERTILSSON J., MURPHY M., 2003: Effects of feeding clover silages on feed intake, milk production and digestion in dairy cows. *Grass and Forage Science*, 58(3): 309-322. ISSN 0142-5242.

BIANCHINI A., 2015: 14 - Lactic acid bacteria as antifungal agents, s. 333-353. In: HOLZAPFEL W. (ed.): *Advances in Fermented Foods and Beverages*. UK: Woodhead Publishing, 586 s.

BÖHNEL H., WAGNER C., GESSLER F., 2008: Tonsils – Place of botulinum toxin production: Results of routine laboratory diagnosis in farm animals. *Veterinary Microbiology*, 130(3–4): 403-409. ISSN 0378-1135.

BOLSEN K. K., BONILLA D. R., HUCK G. L., YOUNG M. A., HART-THAKUR R. A., JOYEAUX A., 1996: Effect of a propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage. *Journal of Animal Science*, 74(1): 274. ISSN 0021-8812.

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 Science*, 75(11): 3066-3083. ISSN 0022-0302.

BRÜGGEMANN H., GOTTSCHALK G. (eds), 2009: *Clostridia: Molecular Biology in the post-genomic era*. Norwich: Caister Academic Press, 230 s. ISBN 978-1-904455-38-7.

BURGAIN J., SCHER J., FRANCIUS G., BORGES F., CORGNEAU M., REVOL-JUNELLES A. M., CAILLIEZ-GRIMAL C., GAIANI C., 2014: Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213: 21-35. ISSN 0001-8686.

COBLENTZ W. K., HOFFMAN P. C., ESSER N. M., BERTRAM M. G., 2012: Using eastern gamagrass to construct diets that limit intake and caloric density for dairy replacement heifers. *Journal of Dairy Science*, 95(10): 6057-6071. ISSN 0022-0302.

COFFIELD J. A., WHELCHER D. D., 2012: Botulinum neurotoxins, s. 937-949. In: GUPTA R. C. (ed.): *Veterinary Toxicology (Second Edition)*. Boston: Academic Press, 1454 s.

CONTRERAS-GOVEA F. E., MUCK R. E., BRODERICK G. A., WEIMER P. J., 2013: *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. *Animal feed science and technology*, 179(1-4): 61-68. ISSN 0377-8401.

CUNHA C. E. P., MOREIRA G. M. S. G., SALVARANI F. M., NEVES M. S., LOBATO F. C. F., DELLAGOSTIN O. A., CONCEIÇÃO F. R., 2014: Vaccination

of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. *Vaccine*, 32(2): 214-216. ISSN 0264-410X.

CUSSEN R. F., MERRY R. J., WILLIAMS A. P., TWEED J. K. S., 1995: The effect of additives on the ensilage of forage of differing perennial ryegrass and white clover content. *Grass and Forage Science*, 50(3): 249-258. ISSN 0142-5242.

ČERNÝ J., BALÍK J., KULHÁNEK M., VAŠÁK F., PEKLOVÁ L., SEDLÁŘ O., 2012: The effect of mineral N fertiliser and sewage sludge on yield and nitrogen efficiency of silage maize. *Plant, Soil and Environment*, 58(2): 76-83. ISSN 1214-1178.

DANNER H., HOLZER M., MAYRHUBER E., BRAUN R., 2003: Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1): 562-567. ISSN 0099-2240.

DAVIES D. R., MERRY R. J., BAKEWELL E. L., 1996: The effect of timing of slurry application on the microflora of grass, and changes occurring during silage fermentation. *Grass and Forage Science*, 51(1): 42-51. ISSN 0142-5242.

DELIDOW B., LYNCH J., PELUSO J. P., WHITE B. R., 1993: Polymerase Chain Reaction, s. 1-29. In: WHITE B. A. (ed.): *PCR Protocols*. New Jersey: Humana Press, 392 s.

DENONCOURT P., CAILLET S., LACROIX M., 2007: Bacteriological and chemical changes occurring in Bunker-stored silage covered with biodegradable coating. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2): 261-270. ISSN 1364-5072.

DEWHURST R. J., FISHER W. J., TWEED J. K. S., WILKINS R. J., 2003: Comparison of Grass and Legume Silages for Milk Production. 1. Production Responses with Different Levels of Concentrate. *Journal of Dairy Science*, 86(8): 2598-2611. ISSN 0022-0302.

DOLEŽAL P. (ed.), 2012: *Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat*. Olomouc: Baštan, 307 s. ISBN 978-80-87091-33-3.

DOLEŽAL P., 2002: Vliv přídavku *Lactobacillus Plantarum* DSM 12771 na kvalitu siláží silně zavadlé vojtěšky a trávy. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 50(5): 37-44. ISSN 1211-8516.

DOLEŽAL P., DOLEŽAL J., MIKYSKA F., MRKVICOVÁ E., SZWEDZIAK K., TUKIENDORF M., ZEMAN L., 2010: *Konzervace, skladování a úpravy objemných krmiv (Přednášky)*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 248 s. ISBN 978-80-7375-441-9.

DOLEŽAL P., DVOŘÁČEK J., 2000: Aerobní stabilita siláží z krmivářského pohledu. *Krmivářství*, 1: 26 – 28. ISSN 1212-9992.

DRIEHUIS F., 2013: Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agricultural and Food Science*, 22(1): 16-34. ISSN 1459-6067.

DRIEHUIS F., ELFERINK OUDE S. J. W. H., WIKSELAAR VAN P. G., 2001: Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4): 330-343. ISSN 0142-5242.

DRIEHUIS F., ELFERINK OUDE S. J. W. H., 2000: The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly*, 22(4): 212-216. ISSN 0165-2176.

DUNIÈRE L., SINDOU J., CHAUCHEYRAS-DURAND F., CHEVALLIER I., THÉVENOT-SERGENTET D., 2013: Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182(1–4): 1-15. ISSN 0377-8401.

EL-MOEZ S. I. A., ATA N. S., ZAKI M. S., 2013: Bacterial Causes of Sudden Death in Farm Animals. *Life Science Journal*, 10(1): 1188-1201. ISSN 1097-8135.

FELIGINI M., BRAMBATI E., PANELLI S., GHITTI M., SACCHI R., CAPELLI E., BONACINA C., 2014: One-year investigation of *Clostridium spp.* occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control*, 42: 71-77. ISSN 0956-7135.

FERRAREZI M. C., CARDOSO T. C., DUTRA I. S., 2008: Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. *Anaerobe*, 14(6): 328-331. ISSN 1075-9964.

FERREIRA G., ALFONSO M., DEPINO S., ALESSANDRI E., 2014: Effect of planting density on nutritional quality of green-chopped corn for silage. *Journal of Dairy Science*, 97(9): 5918-5921. ISSN 0022-0302.

FIGUEIREDO R., RODRIGUES A. I., COSTA M. DO CÉU, 2007: Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chemistry*, 104(4): 1445-1453. ISSN 0308-8146.

FILYA I., 2003: The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 86: 3575 – 3581. ISSN 0022-0302.

FILYA I., MUCK R. E., CONTRERAS-GOVEA F. E., 2007: Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *Journal of Dairy Science*, 90(11): 5108-5114. ISSN 0022-0302.

FILYA I., SUCU E., 2010: The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass and Forage Science*, 65(4): 446-455. ISSN 0142-5242.

FINK-GREMMELS J., 2008: The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1): 84-92. ISSN 1090-0233.

FINNIE J. W., 2004: Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe*, 10(2): 145-150. ISSN 1075-9964.

FLODIN J., 2009: *Validation of Steins/Arla Foods method for lactate fermenting clostridia in milk*. Swedish. Independent thesis Advanced level (nepubl., dep. Uppsala University). Uppsala University, Disciplinary Domain of Medicine and Pharmacy, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Microbiology.

FREULING C. M., HOFFMANN B., FISCHER M., McELHINNEY L. M., MARSTON D. A., FOOKS A. R., MÜLLER T. F., 2014: Chapter Seven – Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid, s. 75-84. In: RUPPRECHT CH. C. E., NAGARAJAN T. (eds): *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. Amsterdam: Academic Press, 350 s.

FREY J., FALQUET L., 2015: Patho-genetics of *Clostridium chauvoei*. *Research in Microbiology*, 166(4): 384-392. ISSN 0923-2508.

GARDE S., GAYA P., ARIAS R., NUÑEZ M., 2012: Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium spp.* isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. *Food Control*, 28(2): 392-399. ISSN 0956-7135.

GARIBYAN L., AVASHIA N., 2013: Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3): e6. ISSN 0022-202x.

GAROFOLO G., GALANTE D., SERRECCHIA L., BUONAVOGLIA D., FASANELLA A., 2011: Development of a real time PCR taqman assay based on the TPI gene for simultaneous identification of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2): 307-311. ISSN 0167-7012.

GOLLOP N., ZAKIN V., WEINBERG Z. G., 2005: Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Mikrobiology*, 98(3): 662-666. ISSN 1364-5072.

GREIF G., GREIFOVÁ M., KAROVIČOVÁ J., 2006: Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter spp.* bacteria in model condition. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(1): 21-29. ISSN 1336-8672.

GURJAR A. A., HEGDE N. V., LOVE B. C., JAYARAO B. M., 2008: Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes*, 22(2): 90-95. ISSN 0890-8508.

HAAGSMA J., 1991: Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 10(3): 749-764. ISSN 0253-1933.

HADIDI A., FLORES R., RANGLES J., SEMANCIK J., 2003: *Viroids Properties, Detection, Diseases and their Control*. Austria: CSIRO Publishing, 392 s. ISBN 978-06-43067-89-9.

HALLIT R. R., AFRIDI M., SISON R., SALEM E., BOGHOSSIAN J, SLIM J., 2013: *Clostridium tetani* bacteraemia. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1): 155-156. ISSN 0022-2615.

HAN H., OGATA Y., YAMAMOTO Y., NAGAO S., NISHINO N., 2014: Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. *Journal of Dairy Science*, 97(9): 5754-5762. ISSN 0022-0302.

HANUŠ O., VEGRICHT J., FRELICH J., MACEK A., BJELKA M., LOUDA F., JANŮ L., 2008: Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents

in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53(1): 17-30. ISSN 1212-1819.

HARTMAN M., 1974: Stanovení neutrálních těkavých látek v silážích a senážích plynovou chromatografií. *Živočišná výroba*, 4: 209-216. ISSN 1212-1819.

HASHEMZADEH-CIGARI F., KHORVASH M., GHORBANI G. R., GHASEMI E., TAGHIZADEH A., KARGAR S., YANG W. Z., 2013: Interactive effects of molasses by homofermentative and heterofermentative inoculants on fermentation quality, nitrogen fractionation, nutritive value and aerobic stability of wilted alfalfa (*Medicago sativa* L) silage. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(2): 290-299. ISSN 0931-2439.

HASSAN A. N., FRANK J. F., 2011: Microorganisms associated with milk, s. 447-457. In: FUQUAY J. W. (ed.): *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 4170 s.

HASSANAT F., GERVAIS R., MASSÉ D. I., PETIT H. V., BENCHAAAR C., 2014: 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*, 97(10): 6463-6474. ISSN 0022-0302.

HAVLÍČEK Z., SKLÁDANKA J., DOLEŽAL P., CHLÁDEK G., VESELÝ P., RYANT P., 2008: *Pastevní chov zvířat v podmínkách cross compliance*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 84 s. ISBN 978-80-7375-237-8.

HERNANDEZ J. D., SCOTT P. T., SHEPHARD R. W., JASSIM AL R. A. M., 2008: The characterization of lactic acid producing bacteria from the rumen of dairy cattle grazing on improved pasture supplemented with wheat and barley grain. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6): 1754-1763. ISSN 1364-5072.

HERON S. J. E., WILKINSON J. F., DUFFUS C. M., 1993: Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(1): 13-17. ISSN 0021-8847.

HERRMANN CH., HEIERMANN M., IDLER CH., 2011: Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology*, 102(8): 5153-5161. ISSN 0960-8524.

HOFÍREK B., DVOŘÁK R., 2002: Metody odběru bachorové tekutiny a její praktický význam. *Farmář*, 7: 46-47. ISSN 1210-9789.

HOFÍREK B., DVOŘÁK R., NĚMEČEK L., DOLEŽAL R., POSPÍŠIL Z. (eds), 2009: *Nemoci skotu*. Brno: Noviko, 1149 s. ISBN 978-80-86542-19-5.

HOLZAPFEL W. H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U., 2001: Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S–373S. ISSN 0002-9165.

HOLZER M., MAYRHUBER E., DANNER H., BRAUN R., 2003: The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6): 282-287. ISSN 0167-7799.

HONIG H., 1991: Reducing losses during storage and unloading of silage, s. 116-129. In: PAHLOW G., HONIG H. (eds): *Silage Conservation Towards 2000*. Germany.

HUISDEN C. M., ADESOGAN A. T., KIM S. C., OSOSANYA T., 2009: Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 92(2): 690-697. ISSN 0022-0302.

CHELI F., CAMPAGNOLI A., DELL'ORTO V., 2013: Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1–2): 1-16. ISSN 0377-8401.

CHEN B.Y., JANES H.W., 2002: *PCR cloning protocols*. New Jersey: Humana Press, 439 s. ISBN 0-89603-969-2.

CHEN L., DANIEL R. M., COOLBEAR T., 2003: Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4): 255-275. ISSN 0958-6946.

ILLEK J., 1998: Výživa dojnic a její vliv na jakost a složení mléka. *Krmiva a výživa*, 1: 14 – 16.

ILLEK J., 2007: Zdraví a hygienická kvalita siláží. *Krmivářství*, 1: 29–31. ISSN 1212-9992.

ILLEK J., 2012: Klostridiové infekce skotu. In: *Seminář Klostridiové infekce skotu*, Střítež.

IMMERSEEL VAN F., PARDON B., MAES S., HEYNDRICKX M., TIMBERMONT L., BOYEN F., HAESBROUCK F., DUCATELLE R., DEPREZ P., 2010: Isolation of a Clonal Population of *Clostridium perfringens* type A from a Belgian Blue Calf with Abomasal Ulceration. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4): 289-293. ISSN 0021-9975.

INNOCENTE N., BIASUTTI M., 2013: Automatic milking systems in the Protected Designation of Origin Montasio cheese production chain: Effects on milk and cheese quality. *Journal of Dairy Science*, 96(2): 740-751. ISSN 0022-0302.

JAKOBE P., JAKOBE P., 1987: *Konzervace krmiv*. Praha: SZN, 262 s.

JALČ D., LAUKOVÁ A., SIMONOVÁ M., VÁRADYOVÁ Z., HOMOLKA P., 2009: The use of bacterial inoculants for grass silage: their effects on nutrient composition and fermentation parameters in grass silages. *Czech Journal of Animal Science*, 54 (2): 84–91. ISSN 1212-1819.

JANDEROVÁ B., BENDO VÁ O., 1999: *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 108 s. ISBN 807184-990-1.

JANSSON S., 2005: *Lactic acid bacteria in silage – growth, antibacterial activity and antibiotik resistance*. Swedish. Master thesis (dep. Uppsala University). Swedish University of Agricultural Sciences in Uppsala, Department of Microbiology. Supervisor Karin Jacobsson, Katrin Ström. ISSN 1101-8151.

JANŠTOVÁ B., DRAČKOVÁ M., DLESKOVÁ K., CUPÁKOVÁ Š., NECIDOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., VORLOVÁ L., 2011: Kvalita syrového mléka z farmy s automatickým dojením systémem v České republice. *Acta Veterinaria Brno*, 80: 207-214. ISSN 0001-7213.

JATKAUSKAS J., VROTNIAKIEN V., OHLSSON C., LUND B., 2013: Effects of combined lactic acid bacteria strains on fermentation, aerobic deterioration and mould growth in lucerne big bale silage, s. 237-239. In: HELGADÓTTIR Á.; HOPKINS A. (eds): *The role of grasslands in a green future: threats and perspectives in less favoured areas. Proceedings of the 17th Symposium of the European Grassland Federation, 23-26 June 2013*. Akureyri, Iceland. ISBN 978-9979-881-20-9.

JATKAUSKAS J., VROTNIAKIENE V., 2005: Performance of lactating dairy cows fed rations with inoculated red clover-grass mixture silage, s. 494-497. In: LILLAK R., VIIRALT R., LINKE A., GEHERMAN V. (eds): *Integrating efficient grassland farming and biodiversity*. Tartu: Greif printhouse.

JATKAUSKAS J., VROTNIAKIENE V., 2011: The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. *Zemdirbyste Agriculture*, 98(4): 367–374. ISSN 1392-3196.

JELÍNEK A., KRAUS R., DĚDINA M., 2006: Nová technologie zpracování kejdy z chovu skotu jako plastického steliva pro zlepšení vztahu k životnímu prostředí a welfare chovaných zvířat, s. 8-13. In: *Separovaná kejda jako plastické stelivo v chovech skotu. Sborník přednášek*. České Budějovice: Výzkumný ústav zemědělské techniky, 65 s. ISBN 80-86884-14-7.

JOHANSSON M., EMMOTH E., SALOMONSSON A.-C., ALBIHN A., 2005: Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops – survival of bacteria, moulds and viruses. *Grass and Forage Science*, 60(2): 175–185. ISSN 0142-5242.

JULIEN M.-C., DION P., LAFRENIERE C., ANTOUN H., DROUIN P., 2008: Sources of Clostridia in Raw Milk on Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20): 6348-6357. ISSN 0099-2240.

JULIN D., 2014: Polymerase Chain Reaction, s. 1-3. In: BELL E. (ed.): *Molecular Life Sciences, An Encyclopedic Reference*. New York: Springer.

KALDMÄE H., KÄRT O., OLT A., SELGE A., KERES I., 2009: Inoculant effects on red clover silage: fermentation products and nutritive value. *Agronomy Research*, 7(2): 793-800. ISSN 1406-894X.

KALDMÄE H., OLT A., OTS M., KÄRT O., SONGISEPP E., 2007: Effect of biological additive on fermentation and nutritive value of red clover-timothy silage. *Agraarteadus*, 18(1): 9 – 14. ISSN 1024-0845.

KAMMES K. L., HEEMINK G. B. H., ALBRECHT K. A., COMBS D. K., 2008: Utilization of Kura Clover-Reed Canarygrass Silage Versus Alfalfa Silage by Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 91(8): 3138-3144. ISSN 0022-0302.

KAMRA D. N., SRIVASTAVA S. K., 1991: Effect of organic acids and ensiling of cattle dung on the growth of *Clostridium perfringens*. *Bioresource Technology*, 37(2): 115-119. ISSN 0960-8524.

KE W. C., YANG F. Y., UNDERSANDER D. J., GUO X. S., 2015: Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfalfa silage ensiled with apple or grape pomace. *Animal Feed Science and Technology*, 202: 12-19. ISSN 0377-8401.

KENNEDY C. L., LYRAS D., CHEUNG J. K., HISCOX T. J., EMMINS J. J., ROOD J. I., 2009: Cross-complementation of *Clostridium perfringens* PLC and *Clostridium septicum* α -toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene. *Microbes and Infection*, 11(3): 413-418. ISSN 1286-4579.

KLEINSCHMIT D. H., SCHMIDT R. J., KUNG L. JR., 2005: The effects of variol antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 88(6): 2130 – 2139. ISSN 0022-0302.

KLEINSCHMIT D. H., KUNG L. JR., 2006: A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. *Journal of Dairy Science*, 89(10): 4005-4013. ISSN 0022-0302.

KNICKÝ M., SPÖRNDLY R., 2010: The efficiency of mixture of sodium nitrate, sodium benzoate and potassium benzoate in aerobically unstable silages, s. 148-151. In: *The XIV th International Silage Conference*. Brno.

KRÁTKÝ J., 2006: Jak se vyvarovat problémům s aerobní stabilitou siláží. *Krmivářství*, 2: 20-22. ISSN 1212-9992.

KRAUSE D. O., SMITH W. J. M., CONLAN L. L., GOUGH J. M., WILLIAMSON M. A., MCSWEENEY CH. S., 2003: Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. *Microbiology*, 149(1): 57-65. ISSN 1350-0872.

KREJČÍ J., 2011: Imunita skotu vůči klostridiím, s. 15-19. In: *Klostridiové infekce skotu. Sborník referátů odborného semináře 8. prosince 2011*. Střížec u Jihlavy: Pfizer, 39 s.

KRÜGER M., NEUHAUS J., HERRENTHEY A. G., GÖKCE M. M., SCHRÖDL W., SHEHATA A. A., 2014: Chronic botulism in a Saxony dairy farm: Sources,

predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities. *Anaerobe*, 28: 220-225. ISSN 1075-9964.

KUANG Y., TANI K., SYNNOTT A. J., OHSHIMA K., HIGUCHI H., NAGAHATA H., TANJI Y., 2009: Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. *Biochemical Engineering Journal*, 45(1): 76-81. ISSN 1369-703X.

KUNG L. JR., 2010: Aerobic stability of silage. In: *Proceedings, 2010 California Alfalfa & Forage Symposium and Crop/cereal Conference 1-2 December 2010*. Visalia, CA, USA.

KUNG L. JR., RANJIT N. K., 2001: The Effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science*, 84(5): 1149-1155. ISSN 0022-0302.

KUNG L. JR., STOKES M. R., LIN C. J., 2003: Silage Additives, s. 305-360. In: BUXTON D. R., MUCK R. E., HARRISON J. H. (eds): *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy.

LÁD F., ČERMÁK B., VONDRÁŠKOVÁ B., KADLEC J., 2008: Effect of additive substances in the grass silages, s. 128-129. In: *The XIII th International Symposium Forage Conservation*. Nitra. ISBN 978-80-888 72-78-8.

LANGE M., NEUBAUER H., SEYBOLDT CH., 2010: Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Molecular and Cellular Probes*, 24(4): 204-210. ISSN 0890-8508.

LANGERHUUS S. N., INGVARTSEN K. L., BENNEDSGAARD T. W., RØNTVED C. M., 2013: Gram-typing of mastitis bacteria in milk samples using flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, 96(1): 267-277. ISSN 0022-0302.

LÄTTEMÄE P., LINGVALL P., 1996: Effect of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and storage stability of wilted and long cut grass silage. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 26: 135-146. ISSN 0049-2701.

LAYANA J. E., MIYAKAWA M. E. F., UZAL F. A., 2006: Evaluation of different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia. *Anaerobe*, 12(4): 204-206. ISSN 1075-9964.

LEWIS CH. J., 2011: Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27 (1): 121-126. ISSN 0749-0720.

LIANHUA L., FENG Z., YONGMING S., ZHENHONG Y., XIAOYING K., XIANYOU Z., HONGZHI N., 2014: Low-cost additive improved silage quality and anaerobic digestion performance of napiergrass. *Bioresource Technology*, 173: 439-442. ISSN 0960-8524.

MACIOROWSKI K. G., HERRERA P., JONES F. T., PILLAI S. D., RICKE S. C., 2007: Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1–2): 109-136. ISSN 0377-8401.

MACKAY R. J., 2014: Tetanus, s. 368-372. In: SELTON D. C., LONG M. T. (eds): *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*. St. Louis: Saunders Elsevier, 650 s.

MAGAN N., ALDRED D., 2007: Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2): 131-139. ISSN 0168-1605.

MACHEREY-NAGEL, 2003: PCR clean-up, User manual NucleoMag 96 PCR. In: Clontech.com [online]. Takara [vid. 2015_08_05] Dostupné z: http://www.clontech.com/XN/Products/Nucleic_Acid_Purification/DNA_CleanUp/PCR_CleanUp/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17453&fileId=5985006&sitex=10020:22372:US.

MALÍŘ F., OSTRÝ V., 2003: *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECKENBEECK A., MAINIL J. G., 2002: A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology*, 86(3): 191-202. ISSN 0378-1135.

MANTECA C., DAUBE G., PIRSON V., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J. G., 2001: Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Veterinary Microbiology*, 81(1): 21-32. ISSN 0378-1135.

MATHIES E., 2002: Der natürliche weg zu höheren futterwertern. *Erfolg im Stall*, 1: 2 – 4.

McALLISTER T. A., FENIUK R., MIR Z., MIR P., SELINGER L. B., CHENG K.-J., 1998: Inoculants for alfalfa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Production Science*, 53(2): 171-181. ISSN 03016226.

McDONALD P., HENDERSON A. R., HERON S. J. E., 1991: *The Biochemistry of silage*. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publications, 340 s. ISBN 978-0948617225.

McGARVEY J. A., FRANCO R. B., PALUMBO J. D., HNASKO R., STANKER L., MITLOEHNER F. M., 2013: Bacterial population dynamics during the ensiling of *Medicago sativa* (alfalfa) and subsequent exposure to air. *Journal of Applied Microbiology*, 144(6): 1661–1670. ISSN 1364-5072.

McSWEENEY P. L. H., 2004: Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3): 127-144. ISSN 1364-727x.

MESHAD EL A. H., IBRAHIM E. M., SELIM A. M., HAMOUDA F. K., 2013: A New Trend in Donkeys Tetanus Treatment Using IgY. *Researcher*; 5(4): 23-29. ISSN 1553-9865.

MOORBY J. M., LEE M. R. F., DAVIES D. R., KIM E. J., NUTE G. R., ELLIS N. M., SCOLLAN N. D., 2009: Assessment of dietary ratios of red clover and grass silages on milk production and milk quality in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(3): 1148-1160. ISSN 0022-0302.

MOREIRA G. M. S. G., CUNHA C. E. P., SALVARANI F. M., GONÇALVES L. A., PIRES P. S., CONCEIÇÃO F. R., LOBATO F. C. F., 2014: Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. *Anaerobe*, 28: 130-136. ISSN 1075-9964.

MUCK R. E., 2004: Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. Transactions of the ASAE. *American Society of Agricultural Engineers*, 47(4): 1011 – 1016. ISSN 0001–2351.

MUCK R. E., 2010: Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(4): 183-191. ISSN 1806-9290.

MUCK R. E., FILYA I., CONTRERAS-GOVEA F. E., 2007: Inoculant Effects on Alfalfa Silage: In Vitro Gas and Volatile Fatty Acid Production. *Journal of Dairy Science*, 90(11): 5115-5125. ISSN 0022-0302.

MUCK R. E., MOSER L. E., PITT E. E., 2003: Postharvest factors affecting ensiling, s. 251-304. In: BUXTON D. R., MUCK R. E., HARRISON J. H. (eds): *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy.

MUDŘÍK Z., KODEŠ A., KACEROVSKÁ L., HUČKO B., ZEMAN L., DOLEŽAL P., KOUKAL P., KRÁSA A., ZEMANOVÁ D., HOMOLKA P., VESELÝ P., 2006: *Základy moderní výživy skotu*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 270 s. ISBN 80-213-1559-8.

MUYLAERT A., LEBRUN M., DUPREZ J.-N., LABROZZO S., THEYS H., TAMINIAU B., MAINIL J., 2010: Enterotoxaemia-like syndrome and *Clostridium perfringens* in veal calves. *Veterinary Record*, 167(2): 64-65. ISSN 0042-4900.

MYLLYKOSKI J., LINDSTRÖM M., BEKEMA E., PÖLÖNEN I., KORKEALA H., 2011: Fur animal botulism hazard due to feed. *Research in Veterinary Science*, 90(3): 412-418. ISSN 0034-5288.

NADER-MACÍAS M. E., OTERO M. C., ESPECHE M. C., MALDONADO M. C., 2008: Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology*, 35(11): 1387-1395. ISSN 1367-5435.

NEUMANN A. P., REHBERGER T. G., 2009: MLST analysis reveals a highly conserved core genome among poultry isolates of *Clostridium septicum*. *Anaerobe*, 15(3): 99-106. ISSN 1075-9964.

NJÅSTAD K. M., ADLER S. A., HANSEN-MØLLER J., THUEN E., GUSTAVSSON A. M., STEINSHAMN H., 2014: Gastrointestinal metabolism of phytoestrogens in lactating dairy cows fed silages with different botanical composition. *Journal of Dairy Science*, 97(12): 7735-7750. ISSN 0022-0302.

OELBERG T. J., STONE W., 2014: Monitoring Total Mixed Rations and Feed Delivery Systems. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(3): 721-744. ISSN 0749-0720.

O'KIELY P., MUCK R. E., WILLIAMS A. P., TWEED J. K. S., 1992: Aerobic deterioration of lucerne (*Medicago sativa*) and Maize (*zea mais*) Silages-Effects of Yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(2): 139-144. ISSN 0022-5142.

OLGUÍN-ARANEDA V., BANAWAS S., SARKER M. R., PAREDES-SABJA D., 2015: Recent advances in germination of *Clostridium* spores. *Research in Microbiology*, 166(4): 236-243. ISSN 0923-2508.

OLT A., KALDMÄE H., KÄRT O., OTS M., 2008: Effect of inoculant on fermentation and digestibility of lucerne silage, s. 144-145. In: RAJCAKOVA L., MLYNAR R. (eds): *13th International Conference Forage Conservation 3-5 September 2008*. Nitra. ISBN 978-80-88872-78-8.

OSWEILER G. D., 2000: Mycotoxins, contemporary issues of animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(3): 511-530. ISSN 0749-0720.

PAHLOW G., 1997: New microbiological approaches to the use of additives for the production of high quality silages, s. 132-133. In: *Proceedings of the 8th International Symposium Forage conservation*. Brno.

PAHLOW G., MUCK R. E., DRIEHUIS F., ELFERINK OUDE S. J. W. H., SPOELSTRA S. F., 2003: Microbiology of ensiling, s. 31-93. In: BUXTON D. R., MUCK R. E., HARRISON J. H. (eds): *Silage Science and Technology*. Madison: American Society of Agronomy.

PANG H., QIN G., TAN Z., LI Z., WANG Y., CAI Y., 2011: 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*, 34(3): 235-241. ISSN 0723-2020.

PARKER M., 2008: Emergency nurse practitioner management of tetanus status and tetanus-prone wounds. *International Emergency Nursing*, 16(4): 266-271. ISSN 1755-599X.

PATEL A. K., SINGHANIA R. R., PANDEY A., JOSHI V. K., NIGAM P. S., SOCCOL C. R., 2014: Enterobacteriaceae, Coliforms and E. Coli, s. 659-666.

In: BATT C. (ed.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2th ed. Oxford: Academic Press, 3248 s.

PEDROSO A. F., ADESOGAN A. T., QUEIROZ O. C. M., WILLIAMS S. K., 2010: Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. *Journal of Dairy Science*, 93(3): 1098-1104. ISSN 0022-0302.

PETIT L., GIBERT M., POPOFF M. R., 1999: *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, 7(3): 104-110. ISSN 0966-842X.

PEYRAT J., NOZIÈRE P., MORVAN LE A., FÉRARD A., PROTIN P. V., BAUMONT R., 2014: Effects of ensiling maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and fibre. *Animal Feed Science and Technology*, 196: 12-21. ISSN 0377-8401.

PIEPER B., KORN U., 2010: Influence of lactic and acetic acid in corn silage on biogas production and conclusions for the application of silage additives, s. 117-118. In: *14 International 86 symposium Forage conservation*. Brno: Mendel University in Brno. ISBN 978-80-7375-386-3.

POLLOCK K. M., MEAD D. J., MCKENZIE B. A., 2009: Soil moisture and water use by pastures and silvopastures in a sub-humid temperate climate in New Zealand. *Agroforestry Systems*, 75(3): 223-238. ISSN 0167-4366.

POPOFF M. R., STILES B. G., 2005: Clostridial toxins vs. other bacterial toxins, s. 324-372. In: DÜRRE P. (ed.): *Handbook on Clostridia*. USA: Crc Press-Taylor & Francis Group, 920 s.

POPOFF M. R., BOUVET P., 2009: Clostridial toxins. *Future Microbiology*, 4(8): 1021-1064. ISSN 1746-0913.

PYROCHTA V., KALHOTKA L., DOLEŽAL P., 2007: Vliv přídavku silážních aditiv na kvalitu fermentačního procesu a aerobní stabilitu výsledných kukuřičných siláží, s. 23-27. In: *VII. Kábrtovy dietetické dny*. Brno. ISBN 978-80-7305-002-3.

QUEIROZ O. C. M., ARRIOLA K. G., DANIEL J. L. P., ADESOGAN A. T., 2013: Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 96(9): 5836-5843. ISSN 0022-0302.

RADA V., 2009: Siláž a zdraví zvířat. In: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha – Uhřetěves [cit. 2014-09-09]. Dostupné z: <http://www.vuzv.cz/sites/SilazRada.pdf>.

RADA V., VLKOVÁ E., 2010: *Silážní inokulanty*. Praha – Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., 58 s. ISBN 978-80-7403-069-7.

RADOSTITS O. M., GAY C. C., HINCHCLIFF K. W., CONSTABLE P. D., 2007: *Veterinary Medicine: A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. UK: Elsevier Scientific Publications, Saunders. ISBN 978-0702027772.

RANJIT N. K., KUNG L., 2000: The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 83(3): 526-535. ISSN 0022-0302.

REDONDO L. M., FARBER M., VENZANO A., JOST B. H., PARMA Y. R., FERNANDEZ-MIYAKAWA M. E., 2013: Sudden death syndrome in adult cows associated with *Clostridium perfringens* type E. *Anaerobe*, 20: 1-4. ISSN 1075-9964.

REINDL A., DZIECIOL M., HEIN I., WAGNER M., ZANGERL P., 2014: Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science*, 97(10): 6036-6045. ISSN 0022-0302.

RIEPL M., GRAEHL H., FUNK H., GAWANBACHT A., KLOPOCKI E., KARTHA R., 2011: The NanoPhotometer™ Pearl - Comparison of the performance characteristics of the New NanoPhotometer™ Pearl and the NanoDrop 2000c. *Application note*, 1-3.

Dostupný také z: <http://ww1.prweb.com/prfiles/2011/02/21/569654/NanoPhotometer-PearlNanoDrop.pdf>.

RICHARD E., HEUTTE N., BOUCHART V., GARON D., 2009: Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4): 309-320. ISSN 0377-8401.

RICHARD E., HEUTTE N., SAGE L., POTTIER D., BOUCHART V., LEBAILLY P., GARON D., 2007: Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12): 2420-2425. ISSN 0278-6915.

RYAN K. J., RAY C. G. (eds), 2004: *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. McGraw Hill, 979 s. ISBN 0-8385-8529-9.

RYTINA L., 2005: Předcházet klostridiím v siláži. In: *Náš chov* [online]. Agroweb [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://naschov.cz/predchazet-klostridiim-v-silazi/>.

SANDLE T., 2014: Biochemical and modern identification techniques *Enterobacteriaceae*, *Coliforms*, and *Escherichia Coli*, s. 232-237. In: BATT C. (ed.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2th ed. Oxford: Academic Press, 3248 s.

SATHISH S., SWAMINATHAN K., 2008: Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: Analysis of cross-contamination. *Anaerobe*, 14(3): 190-199. ISSN 1075-9964.

SCUDAMORE1 K. A., LIVESEY CH. T., 1998: Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1): 1-17. ISSN 0022-5142.

SEPPÄLÄ A., HEIKKILÄ T., MÄKI M., MIETTINEN H., RINNE M., 2013: Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations. *Animal Feed Science and Technology*, 179(1–4): 54-60. ISSN 0377-8401.

SHAVER R. D., 2003: Practical application of new forage quality tests, s. 22-25. In: *Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference, 12-14 March 2003*. Reno, USA.

SHEEHAN J. J., 2011: Cheese | Avoidance of Gas Blowing, s. 661-666. In: FUQUAY J. W. (ed.): *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, 4170 s.

SCHMIDT J., SZAKÁCS G., CENKVÁRI É., SIPOCZ J., URBÁNSZKI K., TENGÉRDY R. P., 2001: Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrate fermentation. *Bioresource Technology*, 76(3): 207-212. ISSN 0960-8524.

SCHNÜRER J., MAGNUSSON J., 2005: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1–3): 70-78. ISSN 0924-2244.

SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G., 2012: *Snedecor and Cochran's Statistical Methods*. 6. vyd. Malden: Blackwell Pub, 576 s. ISBN 978-0813808642.

SONGER J. G., 2010: Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4): 399-404. ISSN 0378-1135.

SOVA A. D., LEBLANC S. J., MCBRIDE B. W., DEVRIES T. J., 2014: Accuracy and precision of total mixed rations fed on commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97(1): 562-571. ISSN 0022-0302.

SPAGNUOLO P., RASINI E., LUINI A., LEGNARO M., LUZZANI M., CASARETO E., CARRERI M., PARACCHINI S., MARINO F., COSENTINO M., 2014: Isoflavone

content and estrogenic activity of different batches of red clover (*Trifolium pratense* L.) extracts: An in vitro study in MCF-7 cells. *Fitoterapia*, 94: 62-69. ISSN 0367-326X.

STADHOUDERS J., SPOELSTRA S. F., 1990: Prevention of the contamination of raw milk by making a good silage. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 251: 24-31. ISSN 0250-5118.

STANĚK S., DOLEŽAL O., 2012: Podestýlka pro skot. In: Zootechnika.cz [online]. eStránky.cz [vid. 2014_12_02]. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/clanky/chov-skotu/ustajeni-skotu/podestylky-pro-skot.html>.

STONE W. C., CHASE L. E., 2004: Dealing with problem silages: focus on clostridium, s. 205-214. In: *Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. New York: Cornell University, 205 s.

STORM I. D. ML, SØRENSEN J. L., RASMUSSEN R. R., NIELSEN K. F., THRANE U., 2008: Mycotoxins in silage. *Stewart Postharvest Review*, 4(6): 1-12. ISSN 1745-9656.

SYKES J. E., 2014: Tetanus and Botulism, s. 520-530. In: SYKES J. E., SAUNDERS W. B. (eds): *Canine and Feline Infectious Diseases*. Saint Louis: Elsevier, 928 s.

ŠILHÁNKOVÁ L., 2008: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

TABACCO E., PIANO S., CAVALLARIN L., BERNARDES T. F., BORREANI G., 2009: Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5): 1632-1641. ISSN 1364-5072.

TYROLOVÁ Y., 2006: Silážní konzervanty na českém trhu v roce 2006. *Krmivářství*, 10(2): 26. ISSN 1212-9992.

TYROLOVÁ Y., VÝBORNÁ A., 2008: Effect of stage of maturity on the leaf percentage of lucerne and the effect of additives on silage characteristics. *Czech Journal of Animal Science*, 53(8): 330-335. ISSN 1212-1819.

TYROLOVÁ Y., VÝBORNÁ A., 2011: The effects of wilting and biological and chemical additives on the fermentation process in field pea silage. *Czech Journal of Animal Science*, 56(10): 427-432. ISSN 1212-1819.

UZAL F. A., 2012: Evidence-Based Medicine Concerning Efficacy of Vaccination Against *Clostridium chauvoei* Infection in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(1): 71-77. ISSN 0749-0720.

UZAL F. A., HUGENHOLTZ P., BLACKALL L. L., PETRAY S., MOSS S., ASSIS R. A., MIYAKAWA M. F., CARLONI G., 2003: PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Veterinary Microbiology*, 91(2-3): 239-248. ISSN 0378-1135.

UZAL F. A., McCLANE B. A., 2012: Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes and Infection*, 14(12): 1009-1016. ISSN 1286-4579.

VALGAEREN B., PARDON B., GOOSSENS E., VERHERSTRAETEN S., SCHAUVLIEGE S., TIMBERMONT L., DUCATELLE R., DEPREZ P., IMMERSEEL VAN F., 2013: Lesion Development in a New Intestinal Loop Model Indicates the Involvement of a Shared *Clostridium perfringens* Virulence Factor in Haemorrhagic Enteritis in Calves. *Journal of Comparative Pathology*, 149(1): 103-112. ISSN 0021-9975.

VANHATALO A., KUOPPALA K., AHVENJÄRVI S., RINNE M., 2009: Effects of feeding grass or red clover silage cut at two maturity stages in dairy cows. 1. Nitrogen metabolism and supply of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 92(11): 5620-5633. ISSN 0022-0302.

VILEI E. M., JOHANSSON A., SCHLATTER Y., REDHEAD K., FREY J., 2011: Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Research*, 42(1): 2-9. ISSN 1297-9716.

VISSERS M. M. M., DRIEHUIS F., GIFFEL TE M. C., JONG DE P., LANKVELD J. M. G., 2007a: Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. *Journal of Dairy Science*, 90(2): 928-936. ISSN 0022-0302.

VISSERS M. M. M., DRIEHUIS F., GIFFEL TE M. C., JONG DE P., LANKVELD J. M. G., 2006: Improving Farm Management by Modeling the Contamination of Farm Tank Milk with Butyric Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89(3): 850-858. ISSN 0022-0302.

VISSERS M. M. M., GIFFEL TE M. C., DRIEHUIS F., JONG DE P., LANKVELD J. M. G., 2007b: Minimizing the Level of *Bacillus cereus* Spores in Farm Tank Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7): 3286-3293. ISSN 0022-0302.

VITHANAGE N. R., YEAGER T. R., JADHAV S. R., PALOMBO E. A., DATTA N., 2014: Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, 189(17): 26-38. ISSN 0168-1605.

VLKOVÁ E., RADA V., BUNEŠOVÁ V., ROČKOVÁ Š., 2012: Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *Folia Microbiologica*, 57(4): 359-362. ISSN 0015-5632.

VOTAVA M., 2003: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

WANG F., NISHINO N., 2008: Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage: effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation

characteristics and aerobic stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1): 133-140. ISSN 0022-5142.

WEINBERG Z. G., ASHBELL G., 2003: Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3): 181-188. ISSN 1369-703X.

WEINBERG Z. G., CHEN Y., 2013: Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 185(3-4): 196-200. ISSN 0377-8401.

WEISSBACH F., 1996: New developments in crop conservation, s. 11–25. In: JONES D. I. H., JONES R., DEWHURST R., MERRY R., HAGH P. M. (eds): Proc. of the 11th Int. Silage Conference. Aberystwyth: IGER Publ. Section.

WHITER A. G., KUNG L. JR., 2001: The Effect of a Dry or Liquid Application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*, 84(10): 2195-2202. ISSN 0022-0302.

WILKINSON J. M., 2005: *Silage*. Lincoln: Chalcombe Publications, 254 s. ISBN 0-948617-50-0.

WOOLFORD M. K., 1975: Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C₁-C₁₂) as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(2): 219-228. ISSN 0022-5142.

WOOLFORD M. K., 1990: The detrimental effect of air on silage. *Journal of Applied Microbiology*, 68(2): 101–116. ISSN 1364-5072.

WU J., ZHANG W., XIE B., WU M., TONG X., KALPOE J., ZHANG D., 2009: Detection and Toxin Typing of *Clostridium perfringens* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3): 807-810. ISSN 0095-1137.

YANG X., WANG H., 2014: *Escherichia coli* | Pathogenic *E. coli* (Introduction), s. 695-701. In: BATT C. (ed.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2th ed. Oxford: Academic Press, 3248 s.

ZEMAN L. (ed.), 2006: *Výživa a krmení hospodářských*. Praha: Profi Press, 360 s. ISBN 80-86726-17-7.

ZENG J., DENG G., WANG J., ZHOU J., LIU X., XIE Q., WANG Y., 2011: Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows. *Vaccine*, 29(33): 5459-5466. ISSN 0264-410X.

ZINK V., 2012: Boxové lože a typy podestýlek. In: Agropress.cz [online]. Fishcat [cit. 2014-12-02]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/typy-podestylek.php>.

8 PŘÍLOHY

8.1 Seznam tabulek a obrázku

8.1.1 Seznam tabulek v textu

Tab. 1: Rozdělení lactobacilů dle HOLZERA et al. (2003)

Tab. 2: Schéma pokusu

Tab. 3: Izoláty klostridií

Tab. 4: Primery genu pro 16S rRNA

Tab. 5: Počty mikroorganismů v biologickém silážním aditivu v KTJ/g

Tab. 6: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů v jetelových silážích v KTJ/g

Tab. 7: Průměrné hodnoty ostatních mikroorganismů v jetelových silážích v KTJ/g

Tab. 8: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Tab. 9: Průměrné hodnoty CPM a BMK ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Tab. 10: Průměrné hodnoty plísní a kvasinek ve vojtěškových silážích (S1 a S2) v KTJ/g

Tab. 11: Clostridium perfringens vyjádřeno v KTJ/g siláže

Tab. 12: Kvasinky vyjádřeno v KTJ/g siláže

Tab. 13: Průměrné hodnoty sporulujících mikroorganismů ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Tab. 14: Průměrné hodnoty CPM, BMK, enterobakterií ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Tab. 15: Průměrné hodnoty plísní a kvasinek ve vojtěškových silážích (1S i 2S) v KTJ/g

Tab. 16: Provoz A – mikrobiologická analýza krmiv a separátu v KTJ/g

Tab. 17: Provoz B – mikrobiologická analýza krmiv a separátu v KTJ/g

Tab. 18: Mikrobiologická analýza vzorků z provozních podmínek v KTJ/g, KTJ/ml

8.1.2 Seznam obrázků v textu

Obr. 1: Polymerázová řetězová reakce

Obr. 2: Sečení vojtěšky seté

Obr. 3: Silážní nádoby

Obr. 4: Izolace DNA pomocí magnetických kuliček

Obr. 5: Princip aplikace vzorku na přístroj Nanophotometer™ Pearl

Obr. 6: Teplotní profil PCR reakce

Obr. 7: Gramovo barvení – klostridie

Obr. 8: Ukázka biochemického testu a jeho vyhodnocení

Obr. 9: PCR pro detekci izolátů *Clostridium perfringens*

8.1.3 Seznam tabulek v příloze

Modelový pokus v laboratorních podmínkách

Modelový pokus I. – jetel luční

Tab. P1.1.1: Obsah sušiny

Tab. P1.1.2: Hodnota pH

Tab. P1.1.3: Hodnota KVV

Tab. P1.1.4: Kyselina mléčná

Tab. P1.1.5: Kyselina octová

Tab. P1.1.6: Kyselina propionová

Tab. P1.1.7: Kyselina máselná

Tab. P1.1.8: Suma kyselin

Tab. P1.1.9: Poměr kyseliny mléčné k TMK

Tab. P1.1.10: Etanol

Tab. P1.1.11: Amoniak

Tab. P1.1.12: Proteolýza

Tab. P1.1.13: Vyživná hodnota jednotlivých variant v g/kg

Modelový pokus II. – vojtěška setá (S1, S2)

Tab. P1.2.1: Obsah sušiny

Tab. P1.2.2: Hodnota pH

Tab. P1.2.3: Hodnota KVV

Tab. P1.2.4: Kyselina mléčná

Tab. P1.2.5: Kyselina octová

Tab. P1.2.6: Suma kyselin

Tab. P1.2.7: Poměr kyseliny mléčné k TMK

Tab. P1.2.8: Etanol

Tab. P1.2.9: Amoniak

Tab. P1.2.10: Proteolýza

Tab. P1.2.11A: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg ve 100 % sušině

Tab. P1.2.11B: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg ve 100 % sušině

Modelový pokus III. – vojtěška setá (1S, 2S)

Tab. P1.3.1: Obsah sušiny

Tab. P1.3.2: Hodnota pH

Tab. P1.3.3: Hodnota KVV

Tab. P1.3.4: Kyselina mléčná

Tab. P1.3.5: Kyselina octová

Tab. P1.3.6: Suma kyselin

Tab. P1.3.7: Poměr kyseliny mléčné k TMK

Tab. P1.3.8: Etanol

Tab. P1.3.9: Amoniak

Tab. P1.3.10: Proteolýza

Tab. P1.3.11A: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg ve 100 % sušině

Tab. P1.3.11B: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg ve 100 % sušině

Monitoring provozních podmínek

Provoz A

Tab. P2.1.1: Bachorová tekutina v KTJ/g

Tab. P2.1.2: Výkaly v KTJ/g

Tab. P2.1.3A: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Tab. P2.1.3B: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Tab. P2.1.4: Stěry z povrchu struků v KTJ/ml

Provoz B

Tab. P2.2.1: Bachorová tekutina v KTJ/ml

Tab. P2.2.2: Výkaly v KTJ/g

Tab. P2.2.3A: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Tab. P2.2.3B: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Tab. P2.2.4: Stěry z povrchu struků v KTJ/ml

Tab. P 2.2.5: Živinové složení TMR a podestýlky ve 100 % sušiny v g/kg

8.1.4 Seznam obrázků v příloze

Obr. P1: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píce jetele lučního

Obr. P2: Celkový počet mikroorganismů u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)

Obr. P3: Celkový počet mikroorganismů u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

Obr. P4: Bakterie mléčného kvašení u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)

Obr. P5: Bakterie mléčného kvašení u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

Obr. P6: Sporující mikroorganismy u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)

Obr. P7: Sporující mikroorganismy u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

Obr. P8: Plísně u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)

Obr. P9: Plísně u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

Obr. P10: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)

Obr. P11: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

Obr. P12: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté v 1. seči

Obr. P13: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté ve 2. seči

Obr. P14: Vývoj teplot v krmivech a separátu u provozu A

Obr. P15: Vývoj teplot v krmivech a separátu u provozu B

- Obr. P16: *Clostridium perfringens*
- Obr. P17: Sporulující mikroorganismy
- Obr. P18: CPM
- Obr. P19: BMK
- Obr. P20: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*
- Obr. P21: Plísňe a kvasinky
- Obr. P22: Separát – výroba
- Obr. P23: Směsná krmná dávka (TMR)
- Obr. P24: Odběr bachorové tekutiny

8.2 Tabulková a obrázková příloha

Modelový pokus I. – Ukazatele kvality fermentačního procesu jednotlivých variant siláží ze zavadlé píče jetele lučního

Tab. P1.1.1: Obsah sušiny

Vliv	Varianta	Sušina v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	206,60	7,168	a
	20	212,67	3,778	b
	40	207,16	10,878	a
Ošetření	K	206,55	7,026	a
	B	208,04	6,614	ab
	CH	211,85	9,956	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	210,04	8,264	ab
	B0	209,96	4,433	ab
	CH0	199,80	2,810	a
	K20	209,61	3,967	ab
	B20	213,40	1,172	ab
	CH20	215,00	3,847	b
	K40	199,98	3,278	a
	B40	200,76	5,049	a
	CH40	220,74	5,331	b

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.2: Hodnota pH

Vliv	Varianta	pH		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	5,115	0,247	a
	20	5,070	0,299	b
	40	5,140	0,250	a
Ošetření	K	5,435	0,014	c
	B	5,050	0,075	b
	CH	4,840	0,107	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	5,440	0,008	c
	B0	4,965	0,013	ab
	CH0	4,940	0,110	ab
	K20	5,430	0,008	c
	B20	5,050	0,029	be
	CH20	4,730	0,018	d
	K40	5,435	0,024	c
	B40	5,135	0,013	e
	CH40	4,850	0,008	ad

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.3: Hodnota KVV

Vliv	Varianta	KVV v mg KOH/100 ml		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	887,1	138,28	ab
	20	912,9	118,24	b
	40	878,1	117,33	a
Ošetření	K	736,3	34,68	a
	B	949,7	59,06	b
	CH	992,2	43,08	c
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	707,8	27,20	b
	B0	1007,5	10,41	a
	CH0	946,0	49,24	ac
	K20	756,8	14,80	b
	B20	964,0	15,71	a
	CH20	1018,0	8,52	a
	K40	744,3	41,51	b
	B40	877,5	27,53	c
CH40	1012,5	4,93	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.4: Kyselina mléčná

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	124,2	10,23	b
	20	115,4	7,18	ab
	40	109,6	22,26	a
Ošetření	K	105,7	13,42	a
	B	115,2	12,07	b
	CH	128,4	12,67	c
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	115,1	5,94	abc
	B0	129,4	3,73	ab
	CH0	128,1	12,98	ab
	K20	112,2	10,16	abc
	B20	112,5	1,03	abc
	CH20	121,6	2,84	ab
	K40	89,8	3,07	c
	B40	103,7	8,15	ac
CH40	135,4	16,87	b	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.5: Kyselina octová

Vliv	Varianta	Kyselina octová v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	57,55	6,947	a
	20	57,70	8,446	a
	40	56,96	7,807	a
Ošetření	K	57,39	7,402	b
	B	64,04	2,941	c
	CH	50,78	4,642	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	50,55	4,542	bc
	B0	65,29	3,112	a
	CH0	56,81	0,805	abc
	K20	62,39	8,553	a
	B20	62,33	3,661	a
	CH20	48,39	1,244	bc
	K40	59,23	2,633	ac
	CH40	47,14	1,733	b

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.6: Kyselina propionová

Vliv	Varianta	Kyselina propionová v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	0,159	0,235	b
	20	0,393	0,337	a
	40	0,333	0,246	a
Ošetření	K	0,326	0,241	b
	B	0,559	0,178	c
	CH	0,000	0,000	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	0,000	0,000	b
	B0	0,476	0,010	a
	CH0	0,000	0,000	b
	K20	0,477	0,009	a
	B20	0,703	0,272	a
	CH20	0,000	0,000	b
	K40	0,500	0,008	a
	CH40	0,000	0,000	b

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.7: Kyselina máselná

Vliv	Varianta	Kyselina máselná v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	0,000	0,000	a
	20	0,000	0,000	a
	40	0,909	1,467	b
Ošetření	K	0,000	0,000	a
	B	0,909	1,467	b
	CH	0,000	0,000	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	0,000	0,000	a
	B0	0,000	0,000	a
	CH0	0,000	0,000	a
	K20	0,000	0,000	a
	B20	0,000	0,000	a
	CH20	0,000	0,000	a
	K40	0,000	0,000	a
	B40	2,726	1,134	b
CH40	0,000	0,000	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.8: Suma kyselin

Vliv	Varianta	Suma kyselin v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	181,9	15,95	b
	20	173,5	10,37	ab
	40	167,8	17,58	a
Ošetření	K	163,4	15,69	b
	B	180,7	12,00	a
	CH	179,2	13,82	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	165,7	10,27	ab
	B0	195,1	6,79	a
	CH0	185,0	13,58	a
	K20	175,1	18,71	ab
	B20	175,5	3,54	ab
	CH20	170,0	2,58	ab
	K40	149,5	0,95	b
	B40	171,5	6,46	ab
CH40	182,6	18,36	ab	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.9: Poměr kyseliny mléčné k TMK

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná/těkavé MK		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	2,169	0,193	b
	20	2,033	0,368	ab
	40	1,970	0,686	a
Ošetření	K	1,862	0,348	a
	B	1,765	0,215	a
	CH	2,545	0,322	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	2,284	0,107	cd
	B0	1,968	0,041	bc
	CH0	2,254	0,206	cd
	K20	1,794	0,082	ab
	B20	1,790	0,120	ab
	CH20	2,515	0,104	de
	K40	1,507	0,116	a
	B40	1,536	0,167	ab
CH40	2,867	0,274	e	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, MK – mastná kyselina, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.10: Etanol

Vliv	Varianta	Etanol v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	7,770	1,623	a
	20	7,139	2,206	a
	40	7,357	1,120	a
Ošetření	K	8,956	1,325	c
	B	5,949	0,956	a
	CH	7,362	1,171	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	8,595	1,575	abd
	B0	5,953	0,225	cd
	CH0	8,763	0,709	ab
	K20	9,519	1,780	b
	B20	4,919	0,588	c
	CH20	6,979	0,418	abcd
	K40	8,754	0,369	ab
	B40	6,974	0,377	abcd
CH40	6,345	0,396	acd	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.11: Amoniak

Vliv	Varianta	Amoniak v g/kg		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	4,992	0,670	a
	20	4,515	0,963	b
	40	5,014	0,590	a
Ošetření	K	5,490	0,244	c
	B	5,090	0,267	b
	CH	3,941	0,597	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	5,720	0,228	a
	B0	5,000	0,229	ab
	CH0	4,257	0,337	b
	K20	5,249	0,100	a
	B20	5,037	0,220	ab
	CH20	3,257	0,392	c
	K40	5,502	0,091	a
	B40	5,234	0,345	a
CH40	4,308	0,320	b	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.12: Proteolýza

Vliv	Varianta	Proteolýza v %		
		Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	10,18	1,230	a
	20	9,664	1,925	a
	40	10,99	1,228	b
Ošetření	K	11,45	0,507	a
	B	10,89	0,791	a
	CH	8,49	1,210	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	11,41	0,373	a
	B0	10,33	0,651	abc
	CH0	8,806	0,660	cd
	K20	10,97	0,256	ab
	B20	10,86	0,637	ab
	CH20	7,164	0,775	d
	K40	11,98	0,210	a
	B40	11,49	0,757	a
CH40	9,527	0,646	bc	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.1.13: Vyživná hodnota jednotlivých variant v g/kg (výsledky jsou uvedeny ve 100% sušině)

Varianta	Sušina původní v %	Popel	NL	Tuk	Vláknina	ADF	NDF	BE (MJ/kg)	OH	BNLV
K0	21,00	131,91	230,31	80,27	169,50	164,03	244,14	18,14	868,1	388,0
K20	20,96	155,35	220,96	73,22	161,76	222,22	243,96	18,06	844,6	388,7
K40	20,00	174,48	209,66	79,86	165,03	235,45	238,55	17,49	825,5	371,0
B0	21,00	133,80	224,92	74,50	165,29	234,11	240,48	18,03	866,2	401,5
B20	21,34	159,65	214,38	75,15	161,38	223,33	244,69	17,59	840,4	389,4
B40	20,08	192,90	209,08	77,01	156,20	226,47	233,32	16,92	807,1	364,8
CH0	19,98	142,88	227,98	72,73	166,62	247,06	263,08	18,06	857,1	389,8
CH20	21,50	166,02	217,84	63,27	169,33	203,30	259,58	17,20	834,0	383,5
CH40	22,07	190,26	211,66	60,97	162,02	193,58	247,33	16,66	809,7	375,1

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, NL – dusikáté látky, ADF – acidodetergentní vláknina, NDF – neutrálně detergentní vláknina, BE – brutto energie, OH – organická hmota, BNLV – bezdusikáté látky výtažkové

Modelový pokus II. – Ukazatele kvality fermentačního procesu jednotlivých variant siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté konzervované s rozdílným obsahem sušiny

Tab. P1.2.1: Obsah sušiny

Vliv	Varianta	Sušina v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	326,05	13,672	a	351,23	11,836	a
	20	329,43	18,195	a	361,82	16,774	b
	40	339,33	14,392	b	351,99	17,239	a
Ošetření	K	323,55	16,880	a	350,09	12,411	a
	B	330,37	10,973	a	363,89	21,485	b
	CH	340,90	16,140	b	351,06	7,259	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	310,74	8,679	b	363,19	1,425	c
	B0	332,51	6,931	ac	335,65	1,184	b
	CH0	334,90	9,195	a	354,86	2,711	ac
	K20	315,04	6,460	bc	352,80	4,154	a
	B20	328,77	12,723	abc	381,80	10,095	d
	CH20	344,50	19,379	a	350,85	10,977	a
	K40	344,87	5,977	a	334,28	1,742	b
	B40	329,82	12,847	abc	374,21	5,429	d
CH40	343,30	17,580	a	347,48	3,181	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.2.2: Hodnota pH

Vliv	Varianta	pH					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	4,658	0,113	b	4,575	0,132	a
	20	4,838	0,193	a	4,775	0,131	b
	40	4,901	0,208	a	4,851	0,150	c
Ošetření	K	4,894	0,093	a	4,848	0,230	c
	B	4,886	0,185	a	4,717	0,036	b
	CH	4,618	0,179	b	4,635	0,144	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	4,772	0,028	bd	4,535	0,038	e
	B0	4,688	0,039	ab	4,748	0,011	a
	CH0	4,515	0,031	a	4,442	0,007	d
	K20	4,965	0,041	c	4,952	0,007	f
	B20	4,900	0,166	cd	4,668	0,007	b
	CH20	4,650	0,169	ab	4,705	0,052	bc
	K40	4,945	0,012	cd	5,058	0,007	g
	B40	5,068	0,019	c	4,735	0,005	ac
CH40	4,688	0,234	ab	4,758	0,011	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.3: Hodnota KVV

Vliv	Varianta	KVV v mg KOH/100 ml					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	1570,9	118,4	b	1729,7	171,9	c
	20	1384,7	230,8	a	1522,0	184,1	b
	40	1313,6	211,2	a	1381,4	214,2	a
Ošetření	K	1331,5	100,0	a	1457,7	316,8	b
	B	1367,1	220,7	a	1576,7	173,7	a
	CH	1570,6	235,1	b	1598,8	173,7	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	1439,8	48,4	c	1860,0	46,3	c
	B0	1604,5	90,6	ab	1496,2	43,3	ab
	CH0	1668,5	60,4	a	1833,0	19,7	c
	K20	1254,8	90,0	ab	1409,5	20,1	a
	B20	1329,7	197,1	ab	1625,5	285,3	b
	CH20	1569,7	252,0	ab	1531,0	20,6	ab
	K40	1299,9	32,6	ab	1103,5	27,3	d
	B40	1167,1	35,1	bc	1608,5	43,4	b
CH40	1473,8	296,8	ab	1432,3	7,5	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.4: Kyselina mléčná

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	94,60	13,81	b	72,58	6,08	b
	20	88,58	8,89	a	80,51	4,02	a
	40	91,49	6,40	ab	78,09	7,14	a
Ošetření	K	96,55	12,21	a	73,87	5,89	a
	B	84,50	7,77	b	76,36	3,52	a
	CH	93,62	6,23	a	80,95	8,02	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	106,65	10,06	b	68,05	3,23	b
	B0	83,28	12,31	a	75,53	3,35	ac
	CH0	93,87	7,45	ab	74,15	7,83	ab
	K20	88,96	12,90	a	80,32	3,91	acd
	B20	83,77	3,69	a	79,12	3,02	ac
	CH20	93,01	4,98	a	82,09	4,69	cd
	K40	94,03	5,08	ab	73,24	1,38	ab
	CH40	93,99	6,52	ab	86,60	5,91	d

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.5: Kyselina octová

Vliv	Varianta	Kyselina octová v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	37,71	30,873	a	21,14	4,826	b
	20	34,49	10,043	a	30,44	6,756	a
	40	39,13	9,395	a	29,08	4,753	a
Ošetření	K	47,53	26,863	b	29,07	8,118	a
	B	35,92	10,890	a	28,49	3,543	a
	CH	27,89	10,634	a	23,10	6,532	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	67,14	39,353	c	19,87	1,576	ed
	B0	25,06	5,628	ab	27,16	1,425	af
	CH0	20,94	5,103	a	16,39	1,905	c
	K20	38,09	7,680	ab	36,80	1,647	g
	B20	34,23	6,379	ab	33,04	1,341	bg
	CH20	31,14	13,957	ab	21,48	1,315	de
	K40	37,36	7,666	ab	30,55	6,680	ab
	CH40	31,58	7,735	ab	31,43	1,671	ab

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.6: Suma kyselin

Vliv	Varianta	Suma kyselin v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	132,3	41,42	a	93,7	8,93	a
	20	123,1	10,20	a	111,0	6,93	c
	40	130,6	10,09	a	107,2	10,10	b
Ošetření	K	144,1	34,70	b	102,9	13,37	a
	B	120,4	14,92	a	104,8	6,09	a
	CH	121,5	13,35	a	104,0	13,45	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	173,8	47,34	b	87,9	4,00	d
	B0	108,3	15,45	a	102,7	3,36	a
	CH0	114,8	11,88	a	90,5	9,53	de
	K20	127,1	8,29	a	117,1	5,16	c
	B20	118,0	7,25	a	112,2	2,73	bc
	CH20	124,2	12,78	a	103,6	4,00	ab
	K40	131,4	8,08	a	103,8	7,73	ab
	CH40	125,6	13,72	a	118,0	7,49	c

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.2.7: Poměr kyseliny mléčné k TMK

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná/těkávé MK					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	3,497	1,435	b	3,589	0,771	b
	20	2,852	1,113	a	2,809	0,787	a
	40	2,499	0,699	a	2,739	0,385	a
Ošetření	K	2,486	1,033	a	2,714	0,654	a
	B	2,605	0,937	a	2,712	0,279	a
	CH	3,757	1,164	b	3,711	0,795	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	2,375	1,582	ab	3,442	0,269	d
	B0	3,499	0,950	ac	2,789	0,204	ab
	CH0	4,617	0,638	c	4,536	0,278	e
	K20	2,463	0,741	ab	2,184	0,086	c
	B20	2,531	0,517	ab	2,399	0,155	ac
	CH20	3,562	1,517	ac	3,842	0,408	d
	K40	2,619	0,559	ab	2,516	0,596	abc
	CH40	3,093	0,523	ab	2,755	0,074	ab

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.2.8: Etanol

Vliv	Varianta	Etanol v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	0,923	0,912	b	2,171	0,511	b
	20	1,701	1,362	a	1,457	0,737	a
	40	1,721	1,322	a	1,496	0,855	a
Ošetření	K	1,087	1,025	a	2,006	0,423	b
	B	2,560	1,217	b	2,315	0,265	c
	CH	0,697	0,586	a	0,804	0,554	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	1,027	1,080	a	2,432	0,385	c
	B0	1,254	0,865	a	2,533	0,159	c
	CH0	0,487	0,628	a	1,550	0,144	a
	K20	1,157	1,220	a	1,841	0,276	ab
	B20	3,119	0,829	b	2,053	0,194	be
	CH20	0,826	0,611	a	0,477	0,147	d
	K40	1,076	0,824	a	1,745	0,210	ab
	B40	3,307	0,679	b	2,360	0,177	ce
CH40	0,778	0,504	a	0,384	0,144	d	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.9: Amoniak

Vliv	Varianta	Amoniak v g/kg					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	3,320	0,455	a	3,178	0,152	a
	20	3,402	0,342	a	3,247	0,281	a
	40	3,433	0,351	a	3,370	0,262	b
Ošetření	K	3,594	0,273	b	3,384	0,221	a
	B	3,244	0,359	a	3,072	0,162	b
	CH	3,317	0,424	a	3,340	0,238	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	3,810	0,239	b	3,166	0,144	a
	B0	2,884	0,174	c	3,128	0,160	a
	CH0	3,267	0,313	ac	3,241	0,141	ac
	K20	3,490	0,197	ab	3,544	0,171	a
	B20	3,405	0,304	abc	3,015	0,185	a
	CH20	3,312	0,473	abc	3,182	0,170	a
	K40	3,483	0,256	ab	3,440	0,151	bc
	B40	3,443	0,271	ab	3,073	0,128	a
CH40	3,372	0,496	abc	3,597	0,148	b	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.10: Proteolýza

Vliv	Varianta	Proteolýza v %					
		S1			S2		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	7,505	1,035	b	7,442	0,274	a
	20	8,191	0,737	a	7,703	0,521	b
	40	8,372	0,840	a	7,889	0,662	c
Ošetření	K	8,481	0,523	b	8,014	0,495	b
	B	7,823	1,010	a	7,250	0,352	a
	CH	7,764	1,063	a	7,769	0,454	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	8,771	0,463	a	7,402	0,298	ab
	B0	6,663	0,378	c	7,523	0,369	ab
	CH0	7,080	0,576	bc	7,402	0,050	ab
	K20	8,174	0,358	ab	8,256	0,103	c
	B20	8,427	0,728	a	7,120	0,349	a
	CH20	7,973	0,978	ab	7,732	0,159	bd
	K40	8,498	0,577	a	8,385	0,240	c
	B40	8,378	0,611	a	7,108	0,121	a
CH40	8,239	1,225	ab	8,172	0,549	cd	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.2.11A: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg (výsledky jsou uvedeny ve 100% sušině)

Varianta	Sušina původní v %		Popel		NL		Tuk		Vláknina	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
K0	31,07	36,32	87,95	86,73	204,89	204,83	25,992	27,953	330,37	335,89
K20	31,50	35,28	103,24	97,46	202,60	203,71	27,375	26,412	329,86	323,46
K40	34,49	33,43	111,90	117,26	193,86	194,27	24,743	25,314	315,25	331,75
B0	33,25	33,57	85,83	91,07	208,54	198,70	25,011	26,564	337,99	333,16
B20	32,88	38,18	104,51	111,43	191,29	203,08	26,352	25,300	335,06	325,51
B40	32,98	37,42	120,49	95,47	194,62	207,55	25,256	25,029	318,13	317,09
CH0	33,49	35,49	88,22	82,40	221,71	210,79	28,091	26,964	309,54	323,81
CH20	34,45	35,09	94,65	103,34	208,19	196,15	24,933	24,498	328,54	333,61
CH40	34,33	34,75	111,03	110,24	194,92	209,34	21,629	25,082	318,88	315,63

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, NL – dusíkaté látky, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg

Tab. P1.2.11B: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg (výsledky jsou uvedeny ve 100% sušině)

varianta	ADF		NDF		BE (MJ/kg)		OH		BNLV	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
K0	414,41	412,06	457,40	431,01	17,946	17,583	912,05	913,27	350,80	344,59
K20	400,25	406,62	431,77	427,45	17,706	17,587	896,76	902,54	336,92	348,96
K40	406,54	409,05	423,44	438,89	17,256	17,407	888,10	882,74	354,24	331,41
B0	407,92	408,82	437,79	443,12	17,732	17,540	914,17	908,93	342,63	350,51
B20	425,07	407,59	435,02	433,54	17,607	17,205	895,49	888,57	342,78	334,67
B40	399,70	410,13	427,40	429,44	17,342	17,428	879,51	904,53	341,50	354,87
CH0	391,17	400,90	407,04	441,21	17,646	17,724	911,78	917,60	352,44	356,04
CH20	405,09	413,87	431,41	446,18	17,678	17,408	905,35	896,66	343,69	342,41
CH40	400,70	393,80	427,33	424,30	17,013	17,405	888,97	889,76	353,54	339,72

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, ADF – acidodetergentní vláknina, NDF – neutrálně detergentní vláknina, BE – brutto energie, OH – organická hmota, BNLV – bezdušikaté látky výtažkové, S1 – vojtěška setá s obsahem sušiny 331,60 g/kg, S2 – vojtěška setá s obsahem sušiny 355,01 g/kg

Modelový pokus III. – Ukazatele kvality fermentačního procesu jednotlivých variant siláží v první a druhé seči

Tab. P1.3.1: Obsah sušiny

Vliv	Varianta	Sušina v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	327,67	6,782	a	311,78	9,038	a
	20	334,80	5,912	b	312,85	8,452	a
	40	342,74	6,934	c	315,59	5,787	a
Ošetření	K	333,13	8,271	a	317,74	5,972	b
	B	338,87	7,078	b	312,46	8,956	a
	CH	333,21	10,255	a	310,02	6,829	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	324,88	6,278	a	314,47	5,726	ab
	B0	332,48	6,972	ab	309,50	11,872	ab
	CH0	325,64	4,485	a	311,39	8,510	ab
	K20	337,02	3,947	bc	318,25	5,180	a
	B20	339,27	3,960	bcd	315,78	8,985	ab
	CH20	328,13	2,045	a	304,52	1,689	b
	K40	337,51	7,140	bcd	320,50	5,795	a
	B40	344,86	3,364	cd	312,12	3,435	ab
CH40	345,85	6,738	d	314,15	4,409	ab	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.2: Hodnota pH

Vliv	Varianta	pH					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	4,567	0,281	c	4,578	0,450	b
	20	4,465	0,090	a	4,531	0,261	a
	40	4,525	0,127	b	4,624	0,281	c
Ošetření	K	4,742	0,166	c	5,025	0,147	c
	B	4,433	0,053	b	4,413	0,119	b
	CH	4,383	0,018	a	4,295	0,051	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	4,958	0,019	f	5,205	0,039	f
	B0	4,378	0,007	ab	4,265	0,023	a
	CH0	4,365	0,010	a	4,265	0,016	a
	K20	4,588	0,014	d	4,875	0,052	d
	B20	4,418	0,011	b	4,452	0,030	b
	CH20	4,388	0,007	ab	4,265	0,016	a
	K40	4,678	0,077	e	4,995	0,060	e
	B40	4,502	0,007	c	4,522	0,071	b
CH40	4,395	0,018	ab	4,355	0,045	c	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.3: Hodnota KVV

Vliv	Varianta	KVV v mg KOH/100 ml					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	1393,3	132,0	a	1312,2	284,7	a
	20	1481,4	79,5	b	1324,4	161,5	a
	40	1416,9	90,8	a	1307,9	159,1	a
Ošetření	K	1388,2	132,5	a	1037,4	87,9	a
	B	1525,7	49,5	b	1470,3	64,0	c
	CH	1377,7	47,3	a	1436,8	38,2	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	1270,5	81,5	c	919,0	16,7	d
	B0	1539,8	59,1	b	1545,5	39,3	e
	CH0	1369,7	69,4	ac	1472,0	15,8	b
	K20	1523,8	34,7	b	1103,2	25,1	c
	B20	1540,0	29,5	b	1434,7	46,9	ab
	CH20	1380,3	34,6	a	1435,5	6,8	ab
	K40	1370,3	111,7	ac	1090,0	25,6	c
	B40	1497,3	46,0	b	1430,8	7,2	ab
CH40	1383,0	31,4	a	1402,8	41,6	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.3.4: Kyselina mléčná

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	111,29	15,42	b	82,63	12,79	a
	20	117,41	28,57	a	85,52	13,55	a
	40	118,43	25,70	a	85,05	14,06	a
Ošetření	K	128,43	15,80	a	88,44	5,92	a
	B	132,33	9,07	a	91,73	17,03	a
	CH	86,37	8,80	b	73,03	4,46	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	113,16	10,55	e	86,91	4,36	abcd
	B0	125,87	9,62	be	90,88	15,20	bc
	CH0	94,85	4,71	d	70,12	2,41	d
	K20	132,50	6,48	ab	89,10	8,72	abc
	B20	140,95	4,50	a	95,38	13,33	c
	CH20	78,79	7,42	c	72,07	3,69	ad
	K40	139,64	15,23	a	89,31	3,54	abc
	B40	130,17	4,12	ab	88,93	22,15	abc
CH40	85,47	5,23	cd	76,90	4,17	abd	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.3.5: Kyselina octová

Vliv	Varianta	Kyselina octová v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	19,75	6,176	a	18,38	6,029	a
	20	17,42	4,364	b	20,86	7,202	b
	40	20,77	6,192	a	24,45	8,795	c
Ošetření	K	26,24	3,712	c	26,44	2,626	a
	B	16,88	3,130	b	24,93	7,089	a
	CH	14,81	1,302	a	12,31	1,903	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	27,78	1,864	c	24,12	1,189	ad
	B0	16,57	3,249	ab	20,12	3,463	de
	CH0	14,90	0,560	ab	10,88	1,306	c
	K20	22,81	2,765	d	26,67	1,512	ab
	B20	15,78	1,468	ab	24,37	4,145	ab
	CH20	13,66	0,886	a	11,55	0,900	c
	K40	28,14	3,653	c	28,54	2,738	ab
	B40	18,30	3,850	b	30,31	8,581	b
CH40	15,86	1,285	ab	14,49	0,995	ce	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.3.6: Suma kyselin

Vliv	Varianta	Suma kyselin v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	131,0	16,87	a	101,0	16,15	b
	20	134,8	30,87	ab	106,4	17,94	a
	40	139,2	30,13	b	109,5	15,41	a
Ošetření	K	154,7	15,76	c	114,9	5,79	a
	B	149,2	8,19	b	116,7	12,31	a
	CH	101,2	9,03	a	85,3	6,01	b
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	140,9	9,47	a	111,0	3,95	a
	B0	142,4	6,90	ab	111,0	12,11	a
	CH0	109,8	4,98	f	81,0	3,57	b
	K20	155,3	4,77	bcd	115,8	7,68	a
	B20	156,7	4,37	cd	119,7	9,85	a
	CH20	92,5	7,13	e	83,6	3,50	b
	K40	167,8	16,85	d	117,9	2,32	a
	B40	148,5	5,86	abc	119,2	13,63	a
CH40	101,3	4,52	ef	91,4	5,14	b	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tab. P1.3.7: Poměr kyseliny mléčné/TMK

Vliv	Varianta	Kyselina mléčná/těkavé MK					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	6,136	1,948	a	4,951	1,486	a
	20	6,911	1,751	b	4,582	1,503	a
	40	5,951	1,463	a	3,933	1,324	b
Ošetření	K	5,018	1,092	a	3,380	0,433	a
	B	8,110	1,605	c	4,053	1,470	b
	CH	5,870	0,722	b	6,032	0,714	c
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	4,107	0,619	b	3,615	0,299	ab
	B0	7,930	1,884	de	4,734	1,405	bc
	CH0	6,371	0,294	acd	6,504	0,576	d
	K20	5,923	1,029	acd	3,363	0,484	ab
	B20	9,006	0,926	e	4,103	1,238	abc
	CH20	5,803	0,803	abc	6,280	0,633	d
	K40	5,025	0,747	abc	3,163	0,402	a
	B40	7,393	1,523	cde	3,322	1,508	ab
CH40	5,436	0,665	ab	5,313	0,112	cd	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.8: Etanol

Vliv	Varianta	Etanol v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	4,551	3,925	b	3,265	3,136	a
	20	2,497	1,840	a	2,350	1,832	b
	40	2,592	1,798	a	3,145	2,601	a
Ošetření	K	5,601	2,775	c	6,179	1,244	c
	B	3,991	0,524	b	2,367	0,365	b
	CH	0,484	0,148	a	0,216	0,075	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	9,385	0,644	e	7,371	0,683	f
	B0	4,267	0,649	b	2,425	0,169	bc
	CH0	0,000	0,000	a	0,000	0,000	a
	K20	3,314	0,333	c	4,661	0,436	d
	B20	4,177	0,230	b	2,062	0,333	b
	CH20	0,000	0,000	a	0,328	0,002	a
	K40	4,103	0,450	bd	6,504	0,298	e
	B40	3,528	0,214	cd	2,614	0,335	c
CH40	0,145	0,233	a	0,318	0,004	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.9: Amoniak

Vliv	Varianta	Amoniak v g/kg					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	1,882	0,659	b	2,204	1,381	a
	20	1,638	0,438	a	2,311	0,956	b
	40	1,673	0,507	a	2,508	1,124	c
Ošetření	K	2,158	0,366	c	3,779	0,342	c
	B	1,983	0,183	b	2,186	0,337	b
	CH	1,052	0,157	a	1,058	0,240	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	2,617	0,172	c	4,030	0,194	c
	B0	1,955	0,149	a	1,778	0,164	e
	CH0	1,075	0,160	b	0,804	0,171	d
	K20	1,930	0,166	a	3,406	0,248	f
	B20	1,916	0,156	a	2,378	0,189	b
	CH20	1,067	0,160	b	1,149	0,172	a
	K40	1,926	0,154	a	3,902	0,189	c
	B40	2,078	0,211	a	2,403	0,163	b
CH40	1,013	0,159	b	1,221	0,126	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.10: Proteolýza

Vliv	Varianta	Proteolýza v %					
		1S			2S		
		Průměr	Sm.odch.	Index	Průměr	Sm.odch.	Index
Povrchová vrstva půdy	0	3,022	0,916	b	3,448	1,962	a
	20	2,557	0,586	a	3,531	1,285	ab
	40	2,501	0,625	a	3,664	1,427	b
Ošetření	K	3,204	0,610	a	5,474	0,533	c
	B	3,065	0,289	a	3,353	0,426	b
	CH	1,810	0,272	b	1,816	0,394	a
Kombinace ošetření a povrchové vrstvy půdy	K0	3,984	0,252	d	6,014	0,273	g
	B0	3,204	0,238	b	2,921	0,263	d
	CH0	1,877	0,275	c	1,409	0,297	c
	K20	2,867	0,268	ab	4,958	0,397	e
	B20	2,968	0,297	ab	3,661	0,362	b
	CH20	1,836	0,274	c	1,975	0,293	a
	K40	2,762	0,215	a	5,451	0,251	f
	B40	3,022	0,298	ab	3,477	0,229	b
CH40	1,718	0,265	c	2,064	0,210	a	

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, Sm.odch. – směrodatná odchylka, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč, průměry a směrodatné odchylky s rozdílnými indexy jsou statisticky průkazné (P<0,05)

Tab. P1.3.11A: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg (výsledky jsou uvedeny ve 100% sušině)

Varianta	Sušina původní v %		Popel		NL		Tuk		Vláknina	
	1S	2S	1S	2S	1S	2S	1S	2S	1S	2S
K0	32,49	31,45	101,98	80,98	194,56	189,48	49,725	39,137	263,56	315,55
K20	33,70	31,83	92,50	74,72	215,09	195,60	51,813	45,053	269,97	269,71
K40	33,75	32,05	88,56	80,05	194,27	198,16	38,005	40,386	253,99	270,71
B0	33,25	30,95	115,28	101,29	189,97	191,29	43,682	44,973	269,91	299,60
B20	33,93	31,58	114,85	102,88	208,02	195,03	55,752	40,535	256,73	270,27
B40	34,49	31,21	109,79	103,29	189,41	194,31	35,463	39,007	232,64	267,40
CH0	32,56	31,14	148,30	113,79	199,90	187,39	51,749	44,778	255,08	282,52
CH20	32,81	30,45	127,88	128,92	203,42	204,50	45,209	41,422	259,56	265,86
CH40	34,59	31,42	128,42	118,81	182,44	191,83	35,649	36,246	232,76	253,51

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s povrchovou vrstvou půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, NL – dusíkaté látky, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč

Tab. P1.3.11B: Výživná hodnota jednotlivých variant v g/kg (výsledky jsou uvedeny ve 100% sušině)

Varianta	ADF		NDF		BE (MJ/kg)		OH		BNLV	
	1S	2S	1S	2S	1S	2S	1S	2S	1S	2S
K0	288,89	344,52	349,71	423,76	18,03	18,28	898,02	919,02	390,18	374,86
K20	277,85	327,26	341,00	394,18	17,42	18,08	884,72	898,71	381,16	362,86
K40	285,55	314,06	358,56	383,68	18,58	17,84	851,70	886,21	344,97	371,52
B0	293,35	293,07	374,92	381,96	19,29	18,08	907,50	925,28	370,63	414,91
B20	298,42	301,79	361,61	363,01	18,89	17,97	885,15	897,12	364,65	391,29
B40	282,52	309,02	335,41	365,37	18,38	18,29	872,12	871,08	363,93	359,30
CH0	283,92	284,66	353,79	367,45	17,98	17,97	911,44	919,95	425,17	410,69
CH20	264,20	299,05	333,73	361,59	17,60	17,61	890,21	896,71	432,69	396,00
CH40	258,04	291,99	317,13	355,62	17,06	17,48	871,58	881,19	420,73	399,60

K – kontrola, B – biologické silážní aditivum, CH – chemický silážní přípravek, 0 – bez povrchové vrstvy půdy, 20 a 40 – s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 20 a 40 g/kg sušiny hmoty, ADF – acidodetergentní vláknina, NDF – neutrálně detergentní vláknina, BE – brutto energie, OH – organická hmota, BNLV – bezdušikaté látky výtahkové, 1S – vojtěška setá první seč, 2S – vojtěška setá druhá seč

Mikrobiologická analýza vzorků z provozních podmínek

Provoz A

Tab. P2.1.1: Bachorová tekutina v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Enterobact.	SP	Klostridie
1	$6,82 \times 10^5$	$8,82 \times 10^4$	$1,16 \times 10^2$	$3,84 \times 10^2$	$1,71 \times 10^3$	$7,27 \times 10^3$	ND
2	$5,91 \times 10^5$	$5,06 \times 10^4$	$1,30 \times 10^2$	$8,44 \times 10^2$	$8,36 \times 10^2$	$1,36 \times 10^4$	ND
3	$1,23 \times 10^6$	$5,87 \times 10^4$	$1,02 \times 10^2$	$1,28 \times 10^3$	$6,80 \times 10^3$	$7,27 \times 10^3$	ND
4	$2,86 \times 10^6$	$1,41 \times 10^5$	$4,29 \times 10^2$	$3,13 \times 10^3$	$7,32 \times 10^2$	$1,45 \times 10^4$	ND
5	$7,73 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$3,05 \times 10^2$	$1,26 \times 10^4$	$8,05 \times 10^2$	$1,73 \times 10^4$	$3,60 \times 10^1$
6	$8,18 \times 10^5$	$3,54 \times 10^4$	$4,95 \times 10^2$	$1,91 \times 10^3$	$6,86 \times 10^2$	$1,14 \times 10^4$	$1,80 \times 10^1$
7	$5,45 \times 10^5$	$5,59 \times 10^4$	$3,98 \times 10^2$	$2,42 \times 10^3$	$4,95 \times 10^2$	$5,45 \times 10^3$	ND
8	$1,00 \times 10^6$	$1,45 \times 10^5$	$1,63 \times 10^2$	$6,25 \times 10^2$	$8,22 \times 10^3$	$7,73 \times 10^3$	ND
Průměr	$1,06 \times 10^6$	$9,25 \times 10^4$	$2,67 \times 10^2$	$2,90 \times 10^3$	$2,53 \times 10^3$	$1,06 \times 10^4$	7

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, Enterobact. – bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, SP – sporulující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.1.2: Výkaly v KTJ/g

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Enterobact.	SP	Klostridie
1	$8,64 \times 10^6$	$6,09 \times 10^4$	$2,39 \times 10^3$	$1,65 \times 10^3$	$2,31 \times 10^6$	$6,32 \times 10^5$	$4,45 \times 10^2$
2	$1,59 \times 10^7$	$1,36 \times 10^6$	$8,14 \times 10^2$	$1,89 \times 10^3$	$3,27 \times 10^5$	$1,14 \times 10^5$	$1,82 \times 10^2$
3	$1,86 \times 10^7$	$1,45 \times 10^5$	$1,55 \times 10^3$	$2,98 \times 10^3$	$1,40 \times 10^6$	$3,55 \times 10^5$	$1,91 \times 10^2$
4	$5,00 \times 10^6$	$3,72 \times 10^5$	$1,79 \times 10^3$	$1,19 \times 10^3$	$8,22 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$6,40 \times 10^1$
5	$2,55 \times 10^7$	$3,38 \times 10^4$	$3,45 \times 10^3$	$4,45 \times 10^3$	$4,95 \times 10^6$	$7,73 \times 10^4$	$1,90 \times 10^3$
6	$3,32 \times 10^7$	$8,33 \times 10^6$	$1,73 \times 10^3$	$2,62 \times 10^3$	$3,32 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$8,45 \times 10^3$
7	$2,73 \times 10^6$	$2,72 \times 10^5$	$1,53 \times 10^3$	$9,77 \times 10^2$	$2,36 \times 10^5$	$1,68 \times 10^5$	$9,10 \times 10^1$
8	$1,36 \times 10^6$	$3,61 \times 10^6$	$1,50 \times 10^3$	$4,18 \times 10^3$	$8,70 \times 10^5$	$2,45 \times 10^5$	$4,77 \times 10^2$
Průměr	$1,39 \times 10^7$	$1,77 \times 10^6$	$1,84 \times 10^3$	$2,49 \times 10^3$	$1,37 \times 10^6$	$2,19 \times 10^5$	$1,48 \times 10^3$

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, Enterobact. – bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, SP – sporulující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g

Tab. P2.1.3A: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísňe	Kvasinky	SP	Klostridie
1	$2,45 \times 10^5$	$2,20 \times 10^1$	1	7	$4,80 \times 10^1$	ND
2	$7,01 \times 10^3$	$6,70 \times 10^1$	9	$5,20 \times 10^1$	9	ND
3	$1,33 \times 10^3$	$4,50 \times 10^1$	1	$2,50 \times 10^1$	5	ND
4	$2,51 \times 10^4$	$4,20 \times 10^1$	5	$2,10 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	ND
5	$6,45 \times 10^3$	$7,50 \times 10^1$	2	$3,60 \times 10^1$	7	ND
6	$6,95 \times 10^3$	$6,70 \times 10^1$	1	$5,40 \times 10^1$	5	ND
7	$1,05 \times 10^5$	$2,30 \times 10^1$	8	$3,00 \times 10^1$	$9,40 \times 10^1$	ND
8	$4,79 \times 10^3$	$1,18 \times 10^2$	5	$6,00 \times 10^1$	2	ND
Průměr	$5,02 \times 10^4$	$5,70 \times 10^1$	4	$3,56 \times 10^1$	$2,30 \times 10^1$	ND

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, SP – sporující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.1.3B: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Číslo vzorku	Enterokoky	Psychrotrofní mikroorganismy	Koliformní bakterie	Ostatní Enterobac.
1	1	$5,00 \times 10^1$	4	ND
2	3	$6,40 \times 10^1$	$1,40 \times 10^1$	ND
3	ND	7	$5,00 \times 10^1$	ND
4	3	7	$2,10 \times 10^1$	$9,22 \times 10^3$
5	1	$1,27 \times 10^2$	6	ND
6	ND	2	ND	ND
7	ND	4	$1,90 \times 10^1$	ND
8	$1,27 \times 10^2$	$2,48 \times 10^2$	5	ND
Průměr	$1,70 \times 10^1$	$6,40 \times 10^1$	$1,50 \times 10^1$	$1,15 \times 10^3$

ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.1.4: Stěry z povrchu struků v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	Enterobacterie	SP
1	$4,12 \times 10^2$	ND	6
2	$1,01 \times 10^3$	2	ND
3	$5,16 \times 10^2$	ND	ND
4	$6,95 \times 10^2$	ND	1
5	$1,08 \times 10^3$	1	ND
6	$1,01 \times 10^3$	1	ND
7	$1,48 \times 10^3$	ND	ND
8	$4,39 \times 10^3$	3	3
Průměr	$1,33 \times 10^3$	1	1

CPM – celkový počet mikroorganismů, SP – sporující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Provoz B

Tab. P2.2.1: Bachorová tekutina v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Enterobac.	SP	Klostridie
1	$5,18 \times 10^7$	$1,16 \times 10^6$	$1,49 \times 10^3$	$4,15 \times 10^4$	$3,15 \times 10^5$	$6,49 \times 10^6$	ND
2	$3,27 \times 10^7$	$1,66 \times 10^6$	$1,93 \times 10^3$	$4,64 \times 10^4$	$8,32 \times 10^4$	$6,82 \times 10^6$	ND
3	$2,77 \times 10^7$	$1,83 \times 10^6$	$1,29 \times 10^3$	$8,23 \times 10^4$	$3,45 \times 10^5$	$4,00 \times 10^6$	3
4	$5,23 \times 10^7$	$5,16 \times 10^6$	$8,18 \times 10^2$	$1,36 \times 10^5$	$3,77 \times 10^4$	$4,49 \times 10^6$	ND
5	$1,86 \times 10^7$	$7,77 \times 10^5$	$1,40 \times 10^3$	$9,37 \times 10^4$	$1,35 \times 10^5$	$5,27 \times 10^6$	ND
6	$7,50 \times 10^7$	$5,35 \times 10^6$	$7,64 \times 10^2$	$1,28 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$2,75 \times 10^6$	ND
Průměr	$4,30 \times 10^7$	$2,66 \times 10^6$	$1,28 \times 10^3$	$8,79 \times 10^4$	$1,80 \times 10^5$	$4,97 \times 10^6$	1

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, Enterobact. – bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, SP – sporulující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.2.2: Výkaly v KTJ/g

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	Enterobac.	SP	Klostridie
1	$2,64 \times 10^7$	$2,27 \times 10^5$	$1,17 \times 10^3$	$3,90 \times 10^4$	$8,67 \times 10^4$	$1,63 \times 10^6$	ND
2	$2,27 \times 10^7$	$4,73 \times 10^5$	$2,20 \times 10^3$	$3,84 \times 10^4$	$2,59 \times 10^4$	$4,04 \times 10^6$	ND
3	$1,14 \times 10^7$	$1,55 \times 10^5$	$1,47 \times 10^3$	$4,20 \times 10^4$	$4,28 \times 10^4$	$3,23 \times 10^6$	ND
4	$3,45 \times 10^7$	$1,64 \times 10^5$	$1,28 \times 10^3$	$2,92 \times 10^4$	$3,73 \times 10^4$	$6,69 \times 10^6$	ND
5	$7,27 \times 10^6$	$1,09 \times 10^5$	$1,40 \times 10^3$	$3,39 \times 10^4$	$3,70 \times 10^5$	$2,45 \times 10^6$	ND
6	$2,05 \times 10^7$	$6,36 \times 10^4$	$1,62 \times 10^3$	$1,73 \times 10^4$	$5,89 \times 10^4$	$5,67 \times 10^6$	$6,40 \times 10^1$
Průměr	$2,05 \times 10^7$	$1,98 \times 10^5$	$1,52 \times 10^3$	$3,33 \times 10^4$	$1,04 \times 10^5$	$3,95 \times 10^6$	$1,10 \times 10^1$

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, Enterobact. – bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, SP – sporulující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/g

Tab. P2.2.3A: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	BMK	Plísně	Kvasinky	SP	Klostridie
1	$4,27 \times 10^2$	1	2	3	$1,60 \times 10^1$	ND
2	$7,18 \times 10^2$	ND	6	5	$5,00 \times 10^1$	ND
3	$3,05 \times 10^3$	ND	1	2	$4,00 \times 10^1$	ND
4	$4,36 \times 10^3$	ND	1^0	5	$4,40 \times 10^1$	ND
5	$3,25 \times 10^3$	ND	ND	1	$1,00 \times 10^1$	ND
6	$2,04 \times 10^3$	1		4	$4,00 \times 10^1$	ND
Průměr	$2,31 \times 10^3$	1	2	3	$3,30 \times 10^1$	ND

CPM – celkový počet mikroorganismů, BMK – bakterie mléčného kvašení, SP – sporulující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.2.3B: Syrové kravské mléko v KTJ/ml

Číslo vzorku	Enterokoky	Psychrotrofní mikroorganismy	Koliformní bakterie	Ostatní Enterobac.
1	1	ND	$6,20 \times 10^1$	1
2	2	$1,00 \times 10^1$	2	1
3	2	1	$3,70 \times 10^1$	ND
4	3	$3,31 \times 10^2$	$2,35 \times 10^2$	$2,90 \times 10^1$
5	1	1	1	ND
6	2	1	$2,40 \times 10^1$	3
Průměr	2	$5,70 \times 10^1$	$6,00 \times 10^1$	6

ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

Tab. P2.2.4: Stěry z povrchu struků v KTJ/ml

Číslo vzorku	CPM	Enterobacterie	Klostridie	SP
27	$1,60 \times 10^1$	ND	ND	1
28	$3,50 \times 10^1$	ND	ND	1
29	$2,10 \times 10^1$	ND	ND	ND
30	$1,90 \times 10^1$	ND	ND	1
31	$2,40 \times 10^1$	ND	ND	1
32	$4,20 \times 10^1$	1	ND	1
Průměr	$2,60 \times 10^1$	1	ND	1

CPM – celkový počet mikroorganismů, SP – sporující mikroorganismy, ND – nedetekováno v 10^1 a 10^2 KTJ/ml

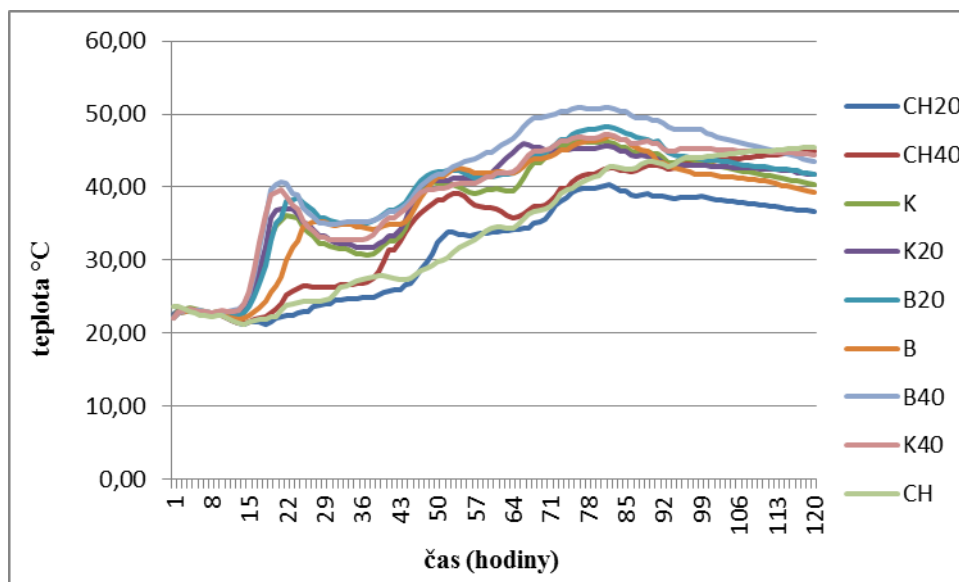
Tab. P 2.2.5: Živinné složení TMR a separátu ve 100% sušině v g/kg

Stanovené živiny	Provoz A		Provoz B	
	TMR	Separát	TMR	Separát
Popel	7,11	8,75	5,49	10,72
NL	15,53	10,10	14,19	10,40
Tuk	3,73	1,14	3,51	0,82
Vláknina	13,08	32,05	18,79	30,81
ADF	15,72	48,11	23,07	42,49
NDF	27,55	70,87	39,32	65,76

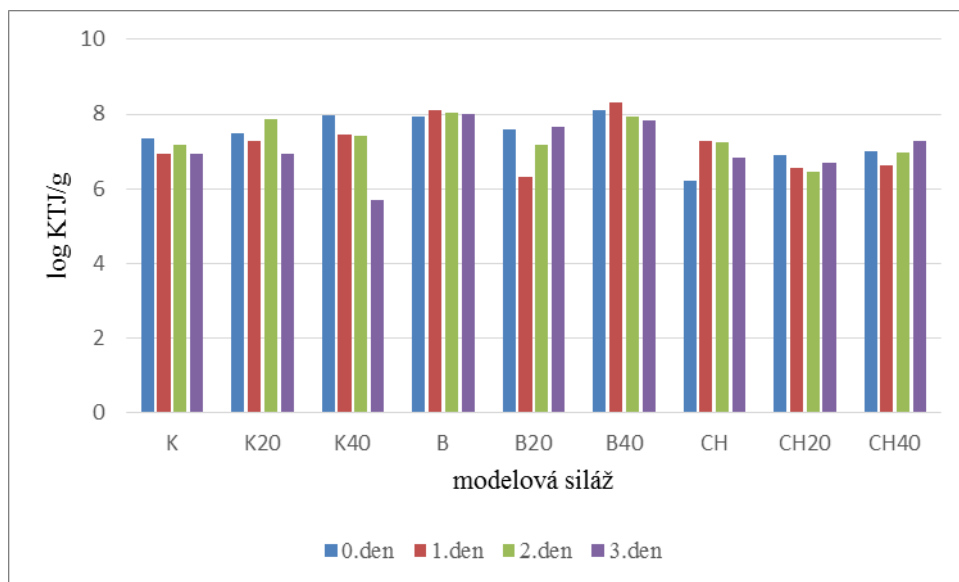
NL – dusíkaté látky, ADF – acidodetergentní vláknina, NDF – neutrálně detergentní vláknina, TMR – směsná krmná dávka

Obrázky

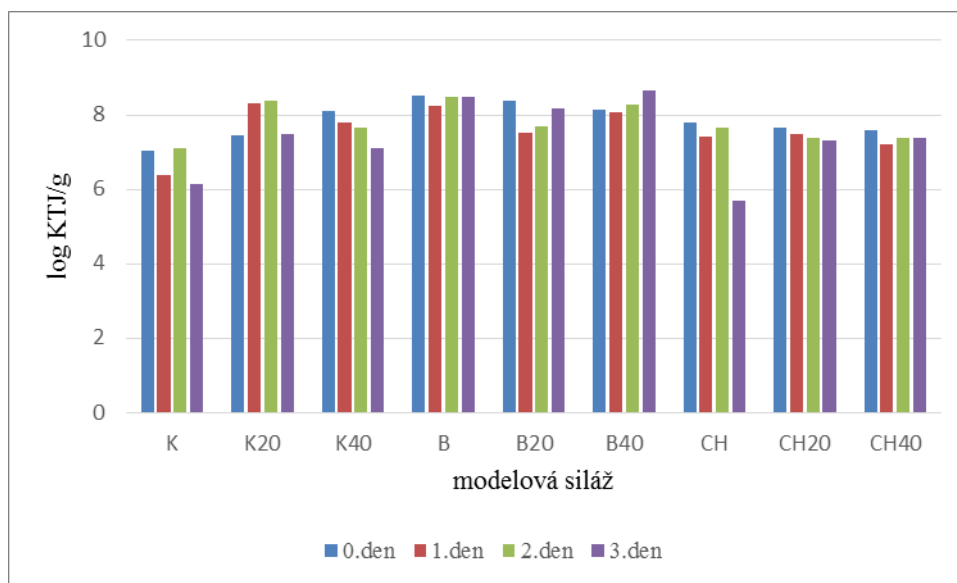
Modelový pokus v laboratorních podmínkách



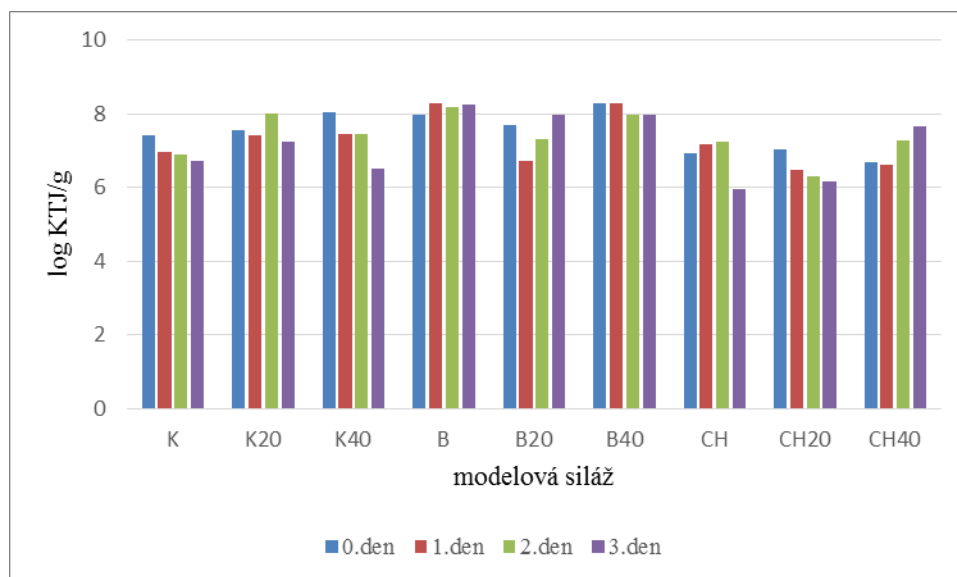
Obr. P1: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píče jetele lučního



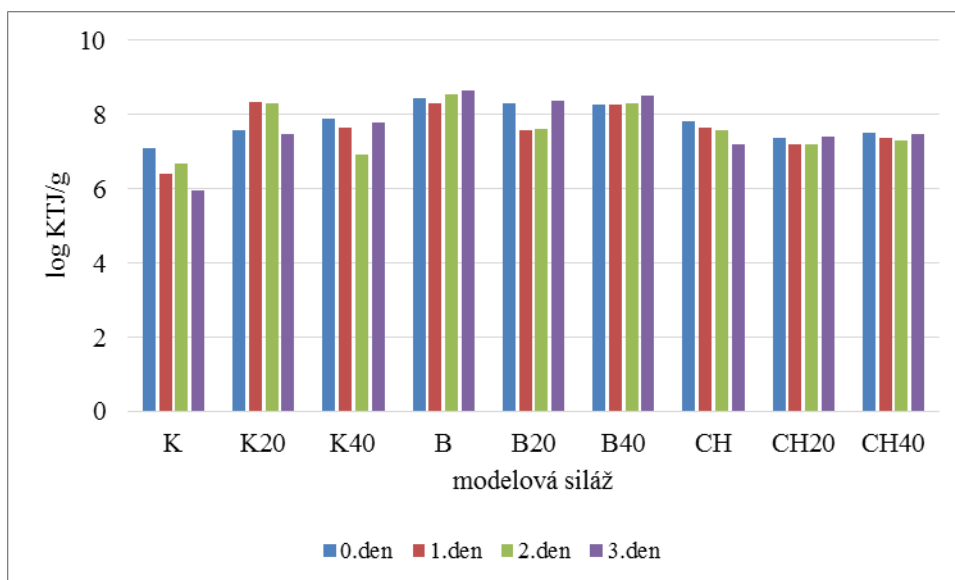
Obr. P2: Celkový počet mikroorganismů u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)



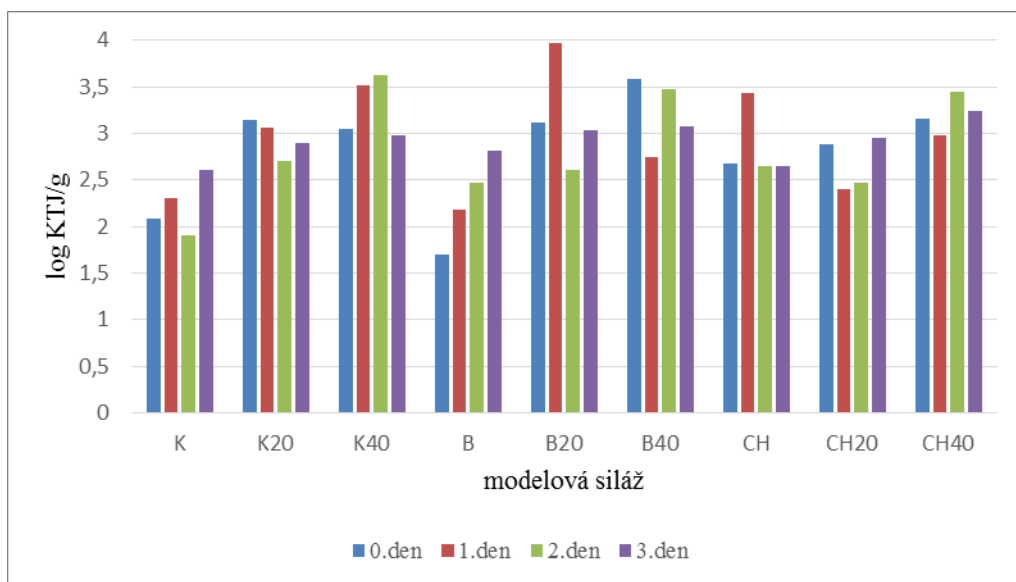
Obr. P3: Celkový počet mikroorganismů u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)



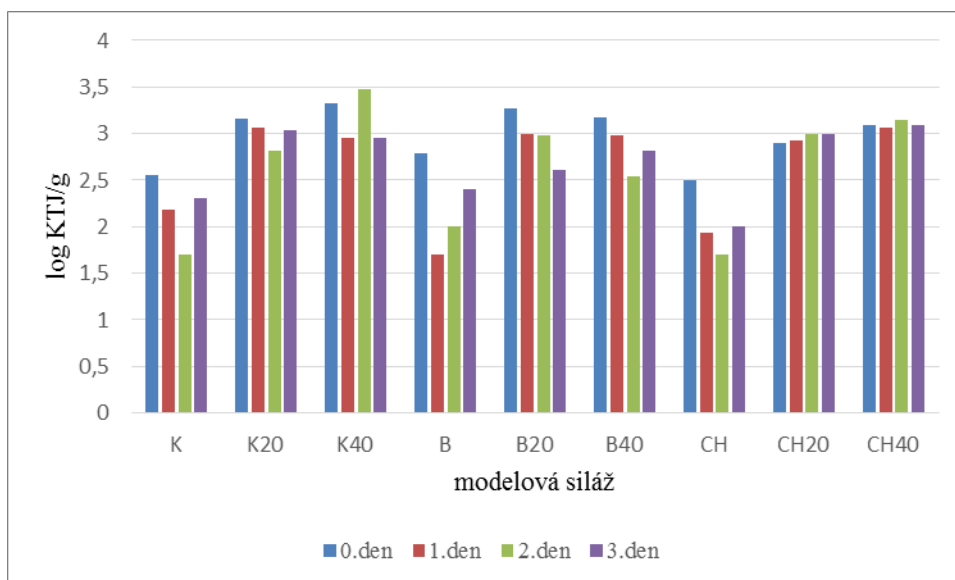
Obr. P4: Bakterie mléčného kvašení u siláží ze zavadlé píce vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)



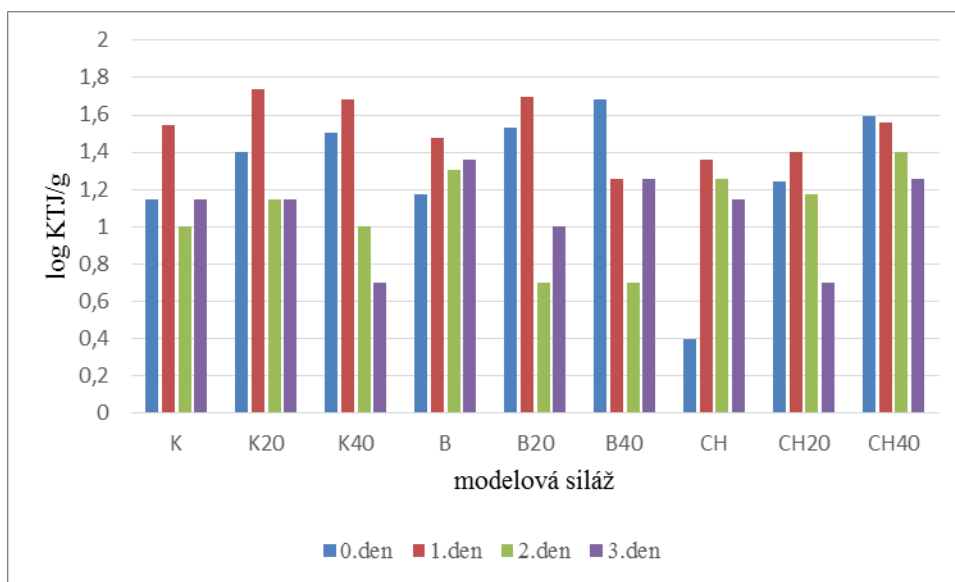
Obr. P5: Bakterie mléčného kvašení u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)



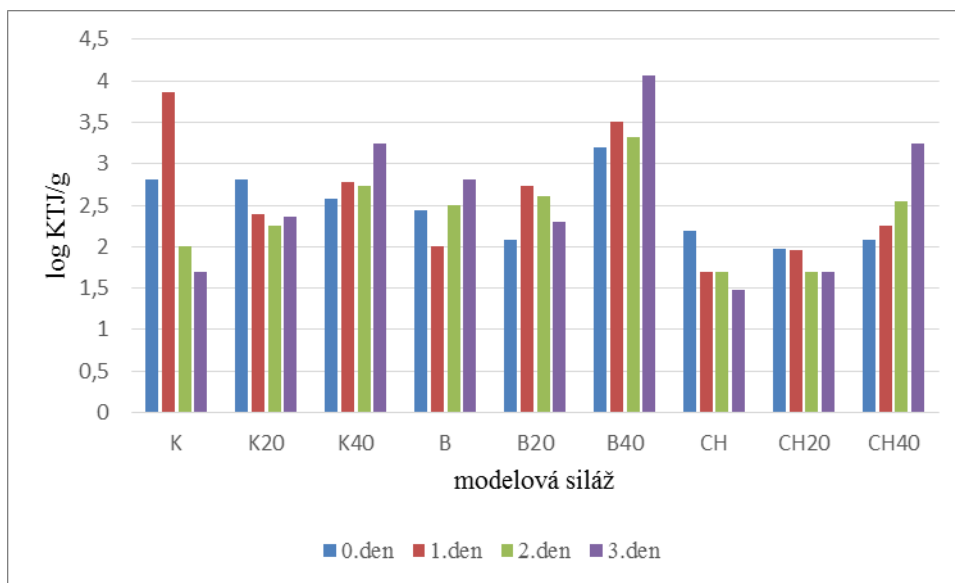
Obr. P6: Sporující mikroorganismy u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)



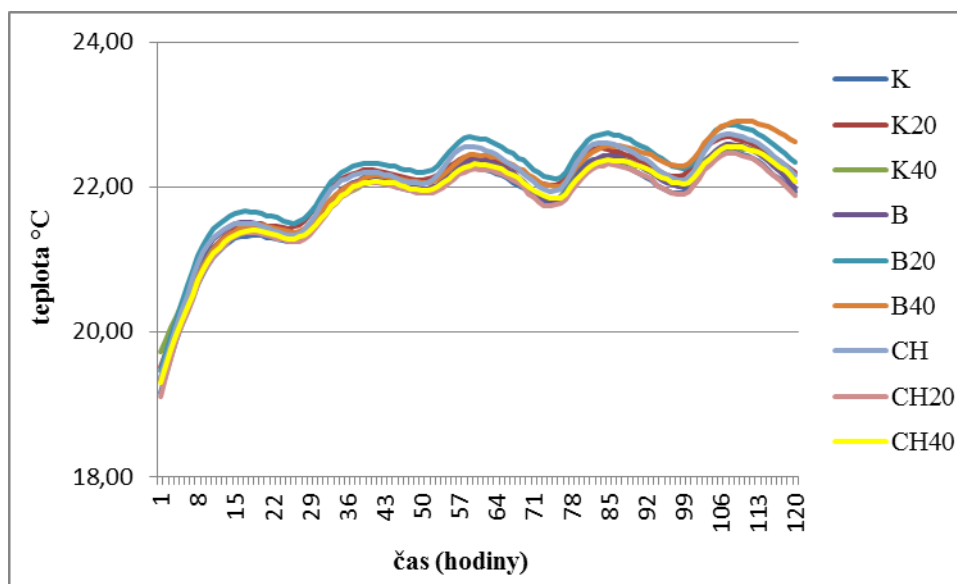
Obr. P7: Sporující mikroorganismy u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)



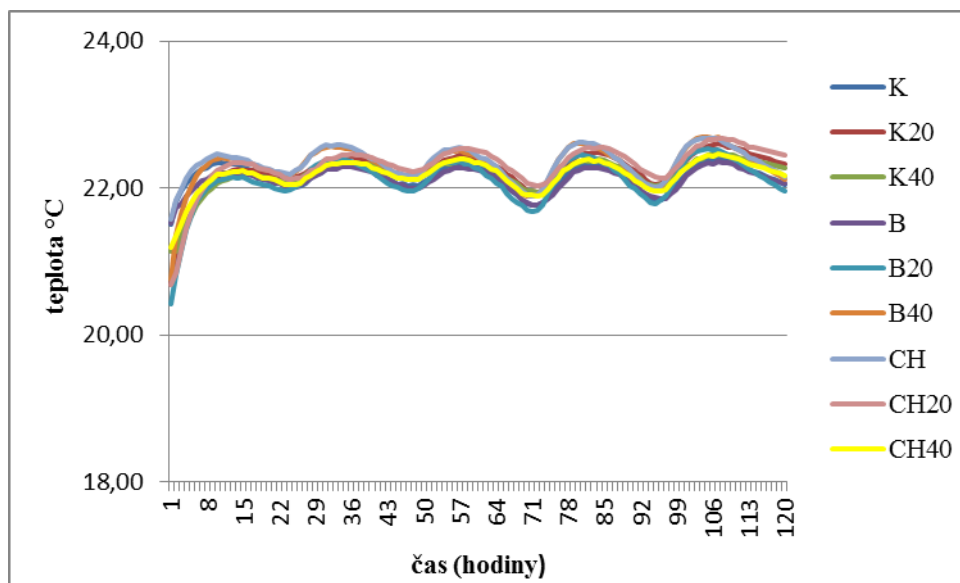
Obr. P8: Plísně u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)



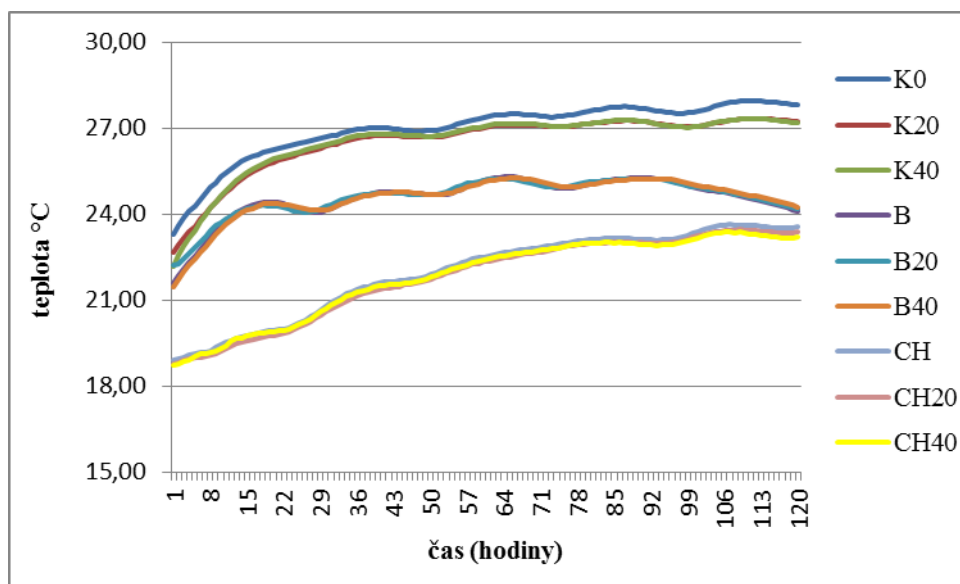
Obr. P9: Plísňe u siláží ze zavadlé píče vojtešky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)



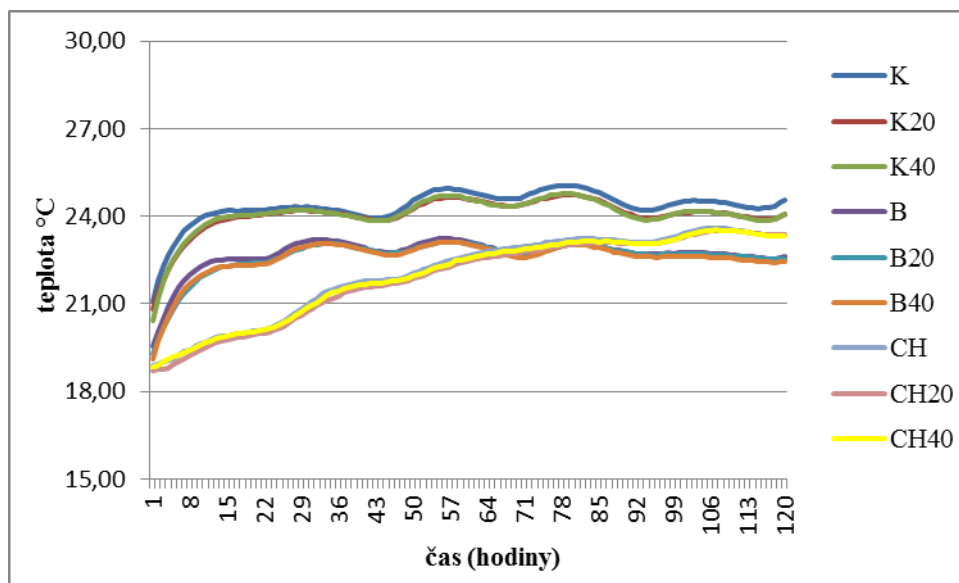
Obr. P10: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píče vojtešky seté s obsahem sušiny 331,60 g/kg (S1)



Obr. P11: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté s obsahem sušiny 355,01 g/kg (S2)

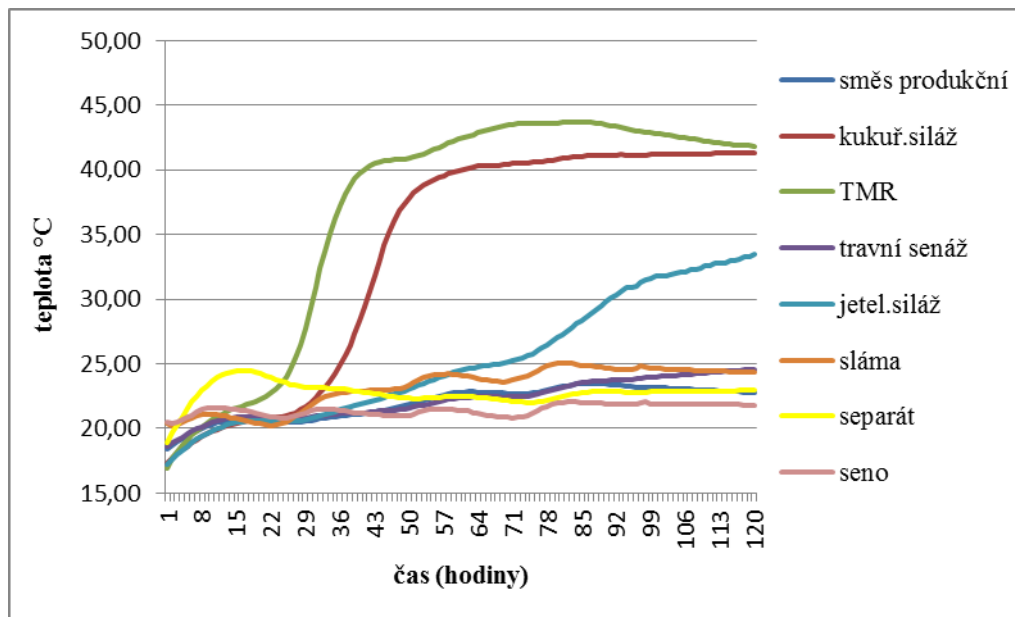


Obr. P12: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté v 1. seči

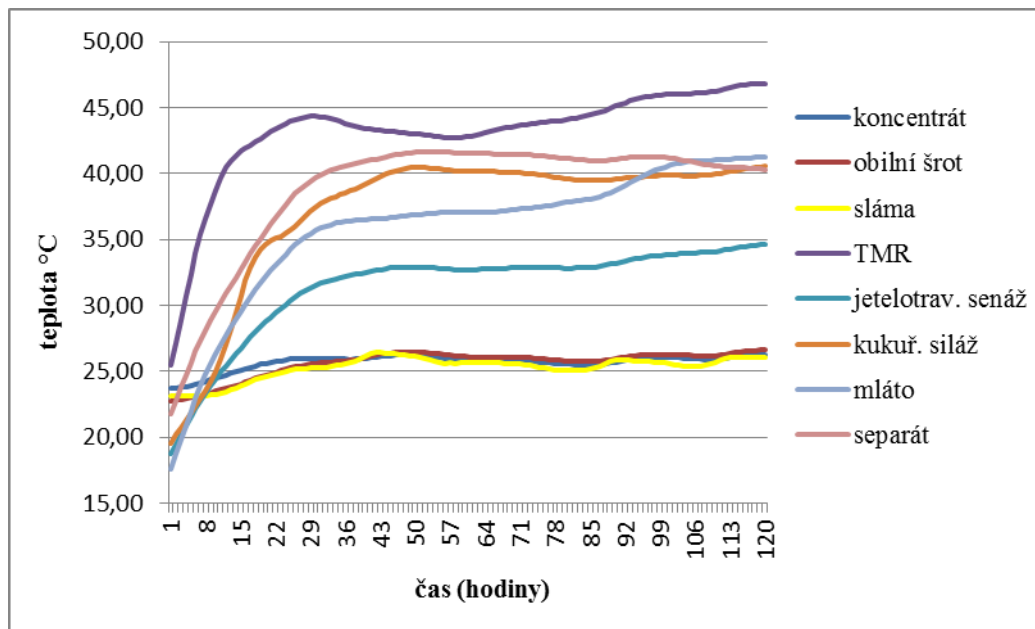


Obr. P13: Vývoj teplot u siláží ze zavadlé píče vojtěšky seté ve 2. seči

Provozní podmínky



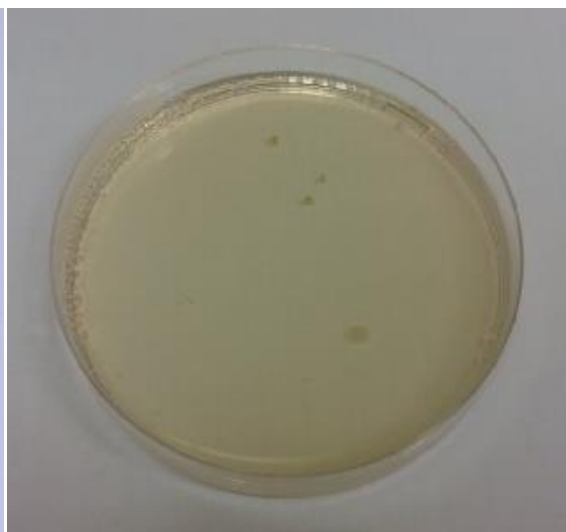
Obr. P14: Vývoj teplot v krmivech a v separátu u provozu A



Obr. P15: Vývoj teplot v krmivech a separátu u provozu B



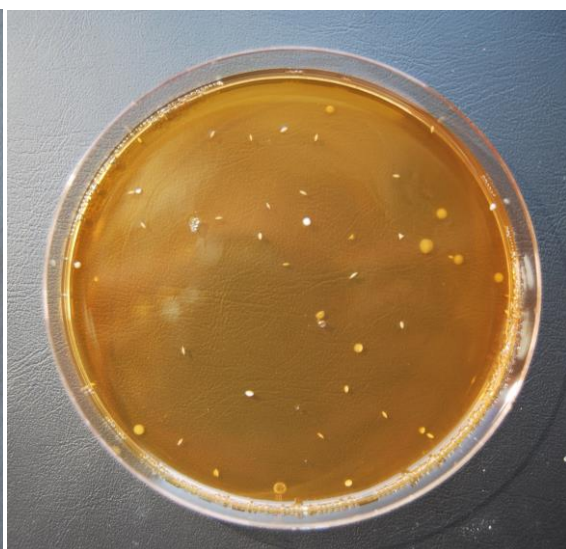
Obr. P16: *Clostridium perfringens*



Obr. P17: Sporující mikroorganismy



Obr. P18: CPM



Obr. P19: BMK



Obr. P20: Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*



Obr. P21: Plísňe a kvasinky



Obr. P22: Separát – výroba



Obr. P23: Směsná krmná dávka (TMR)



Obr. P24: Odběr bachorové tekutiny