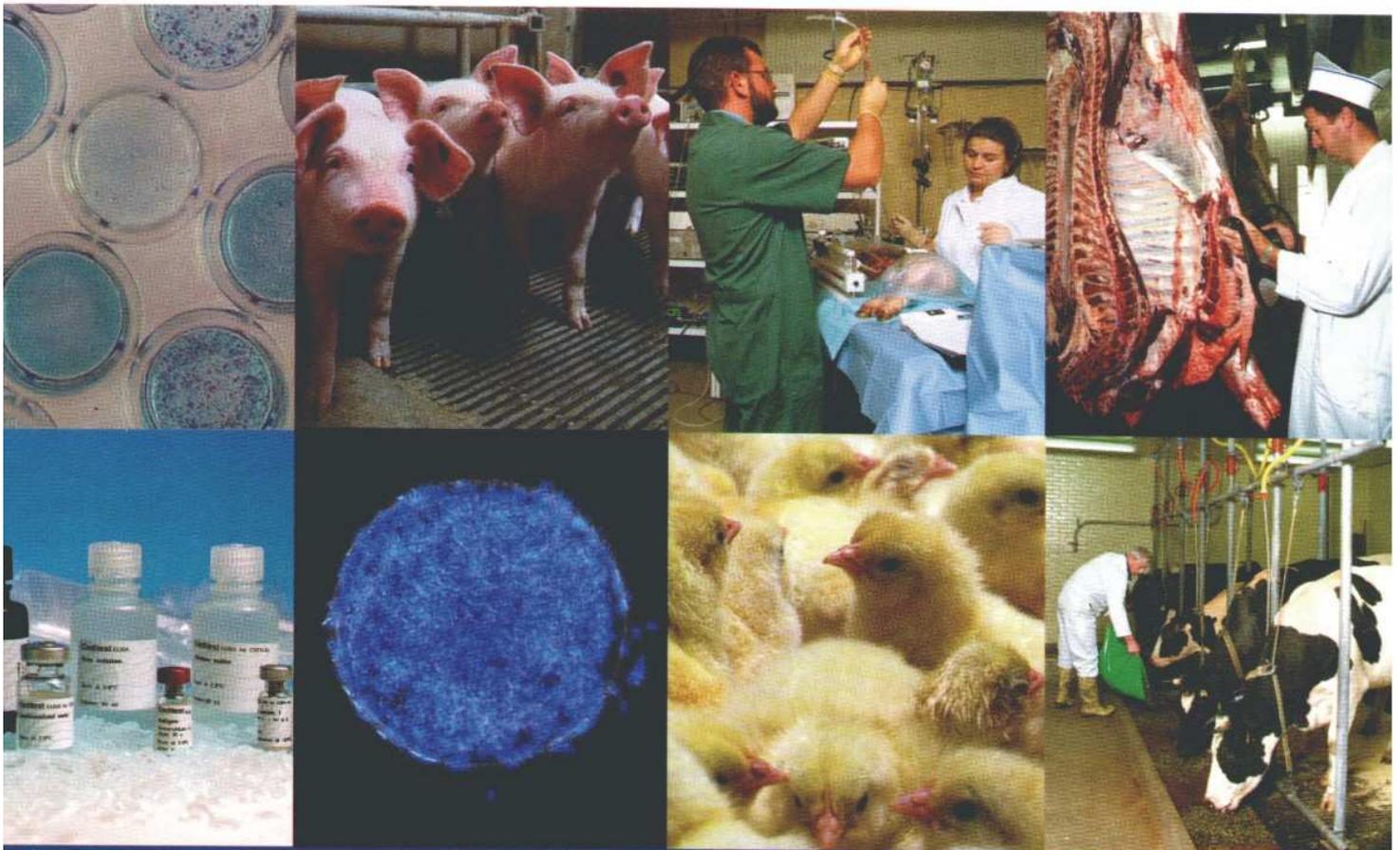


# Anwendung Effektiver Mikroorganismen (EM®) als Silierhilfsmittel

P.G. van Wikselaar und S.J.W.H. Oude Elferink

Wissenschaftlicher Bericht Nr. 2165

Übersetzt aus dem Niederländischen von Frits van den Ham und Dipl. Ing. agr. Ernst Hammes



## Zusammenfassung

Die Studie beinhaltet zwei Teile:

Teil 1:

Bestimmung der minimalen Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur von EM-A als Impfung für Grassilage. Dabei wurde die Anzahl der Milchsäurebakterien in EM-A während 10 Tagen bei drei Temperaturstufen (15, 20 und 25°C ) bestimmt.

Teil 2:

Bestimmung des positiven Effektes von EM-A und EM-Silage im Silierungsprozess und bei der Lagerung von Grassilagen. Hierbei wurden Laboratoriumssilagen angefertigt und die Wirkung von EM-A und EM-Silage auf den Verlauf der Fermentation (pH-Absenkung nach 6 Tagen nach der Impfung) und auf das Endprodukt (Zusammensetzung der Mikroflora, Fermentationsprofil und aerobe Stabilität der Silage nach 2 Monaten Lagerung)

Zu 1:

Die übliche Dosierung für Milchsäurebakterien als Silierhilfsmittel ist minimal  $1 \cdot 10^5$  KbE (Kolonie bildende Einheiten) Milchsäurebakterien pro Gramm Silage. Die empfohlene Dosierung für EM-A ist  $1 \cdot 10^8$  KbE/g. Die von Agriton vorgeschriebene Inkubationszeit von 7 Tagen reicht für alle erprobten Temperaturbereiche aus, die notwendige Anzahl von Milchsäurebakterien zu kultivieren. Nach 7 Tagen hatten alle EM-A Ansätze mehr als  $5 \cdot 10^8$  KbE/g. Bei Temperaturen von 20 und 25 Grad C war eine Inkubationszeit von 2 bis 3 Tagen ausreichend, um ca.  $1 \cdot 10^8$  KbE Milchsäurebakterien pro Gramm Silierhilfsmittel zu züchten. Eine längere als 10 Tage dauernde Inkubationszeit war nicht sinnvoll, da dann die Zahl der Milchsäurebakterien in EM-A schon wieder abnahm (Absterbungsphase).

Zu 2:

Sowohl EM-A wie auch EM-Silage hatten eine positive Wirkung auf die Fermentation und die aerobe Stabilität der Grassilage. Nach 2 Monaten war der pH-Wert in den behandelten Silagen im Vergleich mit den Kontrollsilagen ca. 0,7 Einheiten niedriger (pH 4,4 zu pH 5,1). Nur EM-A hatte auch eine positive Wirkung auf den Beginn des Säuerungsprozesses. Nach 6 Tagen war der pH der mit EM-A behandelten Silage im Vergleich zu den mit EM-Silage behandelten und den Kontrollen schon um 1 pH-Einheit niedriger (pH 5,5 zu pH 6,5/6,6). Die schnellere Wirkung von EM-A auf den Säuerungsprozess erklärt sich möglicherweise durch die höhere Anzahl von Milchsäurebakterien in EM-A im Verhältnis zu EM-Silage. Durch EM-A wurden  $2 \cdot 10^5$  KbE Milchsäurebakterien und durch EM-Silage  $3 \cdot 10^4$  KbE/g Gras zugegeben.

Milchsäure, Essigsäure und Ethanol waren in allen Silagen nach 2 Monaten Lagerung die dominierenden Fermentationsprodukte. Der Gehalt an wertbestimmender Milchsäure und Essigsäure war in den mit EM-A und EM-Silage behandelten Silagen wesentlich höher als in den Kontrollen. Darüber hinaus wurden in den Silagen mit den beiden zu prüfenden Zusätzen hohe Gehalte an 1,2-Propanediol und 1-Propanol gemessen, was die Aktivität von *Lactobacillus buchneri* und/oder anverwandten Milchsäurebakterien bedeuten könnte. Diese Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der aeroben Stabilität von Silagen.

EM-A und EM-Silage erhöhten beide die aerobe Stabilität der Silagen nach zwei Monaten Prüfzeit. Die Kontrollen erwärmten sich schon nach 60 Stunden, während die behandelten Silagen länger als 3 Wochen stabil blieben.

Es kann daraus geschlossen werden, dass in dieser Studie sowohl EM-A als auch EM-Silage die Fermentationsqualität der Grassilagen förderten und die aerobe Stabilität stark verbesserten.

## **EINLEITUNG**

Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit Agriton angefertigt. Agriton ist ein Unternehmen, das sich mit der Einführung einer nachhaltigen Landwirtschaft beschäftigt. Effektive Mikroorganismen (EM®) spielen dabei eine wichtige Rolle. EM® ist ein von Prof. Dr. Higa (Professor an der Universität Ryukyus, Okinawa, Japan) entwickeltes Produkt. EM® beinhaltet eine Mischung von 5 Gruppen von Mikroorganismen: Milchsäurebakterien, photosynthetisierende Bakterien, Hefen, Actinomyceten und Pilze.

Milchsäurebakterien spielen bei der Einsäuerung von Grassilage die Hauptrolle. In EM1 sind circa  $1,10^6$  KBE Milchsäurebakterien pro ml. EM1 ist das Ausgangsprodukt, das Agriton in Plastikflaschen von 1l und Kanister von 5, 10 und 25 Litern verkauft. Um dies als Silierhilfsmittel anzuwenden, muss man EM1 aktivieren. Dies geschieht mit Melasse (oder Zucker) unter Zugabe von EM1 und Wasser. Diese Lösung wird unter Luftabschluss während 7 Tagen bei Temperaturen von 20 bis 35 Grad C fermentiert. Dieses aktivierte EM1 wird EM-Aktiv (EM-A) genannt und ist 14 Tage haltbar.

Neben EM1 hat Agriton noch ein fertiges Produkt, bei dem keine Aktivierung nötig ist, nämlich EM-Silage. EM-Silage ist ein Mittel, das die Silierung von Mais und Gras fördert. EM-Silage besteht aus einer Mischung von Mikroben, unter anderem aus Bakterien und Hefen, die während des Silierungsprozesses nicht nur die pH-Absenkung beschleunigt (Milchsäurebakterien), sondern auch eine Anzahl bioaktive Substanzen produziert. Diese bioaktiven Substanzen haben laut Agriton unter anderem auch eine appetitanregende und temperatursenkende Wirkung.

Im ersten Teil der Studie wurde die optimale Fermentationszeit und Fermentationstemperatur von EM-A als Silierhilfsmittel untersucht. Es wurde davon ausgegangen, dass die Milchsäurebakterien in EM-A die wichtigste Rolle beim Silierungsprozess spielen.

Im zweiten Teil wurde die positive Wirkung von EM-A und EM-Silage auf den Silierungsprozess und die Lagerung von Silage getestet.

## MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Teil 1 Optimale Aktivierung

EM-1 wurde wie folgt aktiviert: 0,6 L EM1 (wie geliefert von Agriton) plus 0,6 L Zuckerrohrmelasse (auch geliefert von Agriton) und 18,8 Liter Wasser, vermischt und aufgeteilt in 6 gleiche Teile. Diese Teile wurden bei 3 Temperaturbereichen (15, 20 und 25 Grad C) mit einfacher Wiederholung in gläsernen 5-Liter-Flaschen fermentiert. Zum Zeitpunkt t=0 und nach 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Tagen Fermentationszeit wurde jeder Flasche eine Probe entnommen, um die Zahl der Milchsäurebakterien zu bestimmen.

### 3.2 Teil 2 Wirkung von EM-A und EM-Silage auf Grassilage

#### 3.2.1 Silierung

Das Silierexperiment wurde mit Gras, hauptsächlich bestehend aus englischem Raigras von der Dauerweide des Versuchsbetriebes der ID-Lelystad, Parzelle 122, durchgeführt. Das Gras wurde mit einem Rotormäher am 7. Mai 2001 geschnitten und vorgetrocknet während ca. 40 Stunden auf einen Trockensubstanzgehalt von ca. 50%. Das vorgetrocknete Gras wurde mit einem Hächsler geerntet und in 3 Teile zu je ca. 15 kg aufgeteilt. Jedes Teil bekam eine andere Behandlung. Das Siliermittel wurde mit dem Gras sorgfältig vermischt. Folgende Behandlungen wurden vollzogen:

Kontrolle (25 ml Wasser pro kg Gras)

Empfohlene Dosierung von EM-A (0,80 ml EM-A aufgefüllt bis 25 ml mit Wasser pro kg Gras) (a)

Empfohlene Dosierung EM-Silage (0,08 ml EM-Silage aufgefüllt bis 25 ml Wasser pro kg Gras) (b)

a) EM1 wurde wie folgt aktiviert: 0,6 L EM-1 (wie geliefert von Agriton) plus 0,6 L Zuckerrohrmelasse (auch geliefert von Agriton) und mit 18,8 Liter Wasser vermischt, dann während 15 Tagen in einem luftdicht verschlossenen Kanister fermentiert bei 20 Grad C (Nach der Gebrauchsanweisung reichen 7 Tage aus zu einer starken Vermehrung der Mikroorganismen. Das so entstandene EM-A ist dann noch 14 Tage haltbar.)

EM-A wurde sofort in das Gras eingebracht gemäß der empfohlenen Dosierung. Diese ist für EM-A in der Silage 33,3 Liter pro 100 m<sup>2</sup>. Ein m<sup>3</sup> Silage ist ca. 200 kg Trockensubstanz (IKC, 1993). Das vorgetrocknete Gras hatte einen Trockensubstanzgehalt von 50%. Es waren also 33,3 L EM-A pro 40 t Silagegras nötig (=0,8 l EM-A pro t Silagegras).

b) EM-Silage wurde sofort in einer Dosierung wie empfohlen in die Silage eingebracht (=0,08 l EM-Silage pro t Silagegras).

Von jeder Behandlung wurde in vierfacher Wiederholung ein 1 l Weckglas und ein 2 kg Plastikbeutel (zweischichtig) gefüllt. Die „Silos“ wurden bei 20 plus minus 1 Grad C im Dunkeln gelagert. Nach einer Woche Silierung wurde pro Behandlung 2 Weckgläser für die ph-Bestimmung geleert. Nach 2 Monaten Fermentation wurden pro Behandlung 2 Weckgläser geleert für die Bestimmung von ph, Trockensubstanz, Gehalte an flüchtigen Fettsäuren, Milchsäuren und Ammoniak und die Anzahl der in der Silage vorhanden Hefen und Pilze. Gleichzeitig wurden pro Behandlung zwei Beutel zur Bestimmung der aeroben Stabilität geleert.

### 3.2.2 Analysen

#### 3.2.2.1 Chemische Analysen

Die Trockensubstanz wurde bestimmt gemäß Vorgehensweise NEN 3332 des niederländischen Normalisatie Instituut. Milchsäure, flüchtige Fettsäuren und Alkohole wurden mit HPLC (Oude Elferink et. al., 2001) bestimmt. Ammoniak wurde bestimmt gemäß der modifizierten Methode von Berthelot (Robinson et al. 1986). Der pH wurde in einem wässrigen Extrakt gemessen, der auch für mikrobiologische Analysen angewandt wird.

#### 3.2.2.2 Mikrobiologische Analysen

Mikrobiologische Analysen wurden mit einem wässrigen Extrakt von 30 g Silage und 270 g destilliertem Wasser, das 5 Minuten in einem „stomacher“ (Seward, London) durchgeführt. Es wurden dezimale Verdünnungsreihen in PFZ (Pepton 1,0 g/l, NaCl 8,5 g/l) angefertigt. Milchsäurebakterien wurden auf doppelt gegossenen Platten mit MRS Agar (Oxoid). Hefen und Pilze wurden auf doppelt gegossenen Platten mit Malz Extrakt Agar gemessen, angesäuert mit Milchsäure auf einen pH von 3,5. Die Platten wurden bei 30 Grad C drei Tage bebrütet.

#### 3.2.3 Aerobe Stabilität

Die Silageproben (100 g) wurden in Polyethylenschaumschalen bei 20 Grad plus minus 1 Grad C bebrütet. Deckel und Boden der Schalen wurden perforiert, um Sauerstoff ein und CO<sub>2</sub> heraus zu lassen. Die Temperatur im Material wurde kontinuierlich mit Hilfe eines Koppelthermometers gemessen. Die aerobe Stabilität wurde definiert als Zeit, die nötig ist, die Temperatur 1 Grad C über die der Referenzsilage steigen zu lassen. Die Referenzsilage wurde mit einer Mischung aus Ameisen- und Propionsäure (6,6 und 10,7 g/kg Silage) hergestellt.

## RESULTATE UND DISKUSSION

### 4.1 Teil 1

Die Wirkung der Fermentationstemperatur auf die Anzahl von Milchsäurebakterien während der Fermentationszeit ist in Abbildung 1 aufgezeigt. Während der gesamten Messperiode (10 Tage) war bei allen drei Fermentationstemperaturen (15, 20 und 25 Grad C) eine Zunahme der Anzahl der Milchsäurebakterien zu verzeichnen (von plus minus  $3,10^6$  KbE/ml am Tag 0 bis plus minus  $1,10^9$  KbE/ml am Tag 10). Bei der höchsten Temperatur (25 Grad C) war die Zunahme am schnellsten. Aber ab Tag 2 war der Unterschied bei der Zunahme zwischen 20 Grad C und 25 Grad C verschwunden. Die Zunahme der Anzahl der Milchsäurebakterien bei 15 Grad C blieb bis Tag 7 zurück. Danach blieb die Zunahme gleich mit der Zunahme bei den anderen Temperaturbereichen. Nach 7 Tagen Fermentation war kein Unterschied mehr in der Anzahl der Milchsäurebakterien (plus minus  $5,10^8$  KbE/ml) zwischen den drei Temperaturstufen. Nach 10 Tagen war die Zahl der Milchsäurebakterien auf plus minus  $1,10^9$  KbE/ml gestiegen. Das war wahrscheinlich die höchste Konzentration von Milchsäure, weil eine Sonderzählung am Tag 15 bei 20 Grad C eine niedrigere Anzahl zeigte (Milchsäurebakterien gesunken auf ca.  $2,10^8$  KbE/ml). Gemäß der Gebrauchsanweisung soll EM-A nach der Fermentation von 7 Tagen noch 14 Tage brauchbar sein. Es ist deutlich, dass die Anzahl der Milchsäurebakterien somit niedriger sein wird, als nach 7 Tagen (am Tag 15 ungefähr um einen Faktor 2 niedriger als am Tag 7). Es ist sicher nicht optimal EM-A, 21 Tage nach der Zubereitung erst bei der Silierung zu verwenden, da die Milchsäurebakterien sich dann schon in der Absterbungsphase befinden.

Wenn man davon ausgeht, dass eine schnelle Absenkung des pH-Wertes eine Konzentration von mindestens  $1,10^5$  KbE/g Gras erfordert, bedeutet das, dass in EM-A mindestens  $1,10^8$  KbE/ml sein sollen (bei einer Konzentration von 0,80 ml EM-A pro kg Gras). Bei 20 und 25 Grad C wurde dies schon nach 2 Tagen Fermentation erreicht und bei 15 Grad C nach 5 Tagen. Die Fermentationszeit für die Bereitung von EM-A könnte somit auf 2 bis 5 Tage gegenüber der bisherigen Gebrauchsanweisung (7 Tage) reduziert werden.

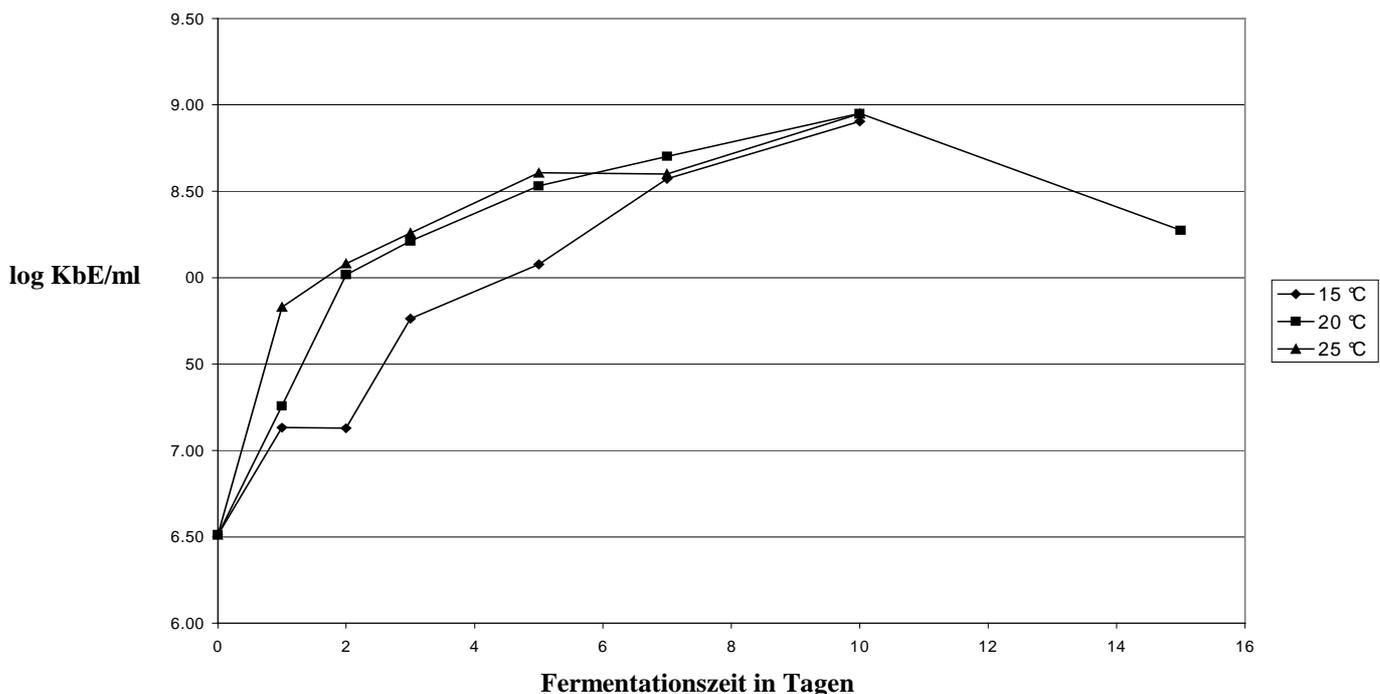


Abbildung 1: Wachstum der Milchsäurebakterien in EM-A bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen

## 4.2 Teil 2

### 4.2.1 Dosierung der Milchsäurebakterien

Die zugeführte Menge der Milchsäurebakterien bei Gras, behandelt mit EM-A war  $2 \times 10^5$  KbE/ g Gras und bei Gras behandelt mit EM-Silage  $3 \times 10^4$  KbE/g Gras.

### 4.2.2 Trockensubstanz

Der Trockensubstanzgehalt des Grases vor der Silierung lag bei 480 g/kg.

### 4.2.3 ph

Die Wirkung von EM-A und EM-Silage auf den ph war nach zwei Monaten Lagerung gleich. Der ph-Wert in den behandelten Silagen war im Vergleich zu den Kontrollsilagen ca. 0,7 Einheiten niedriger (ph 4,4 zu ph 5,1). Dies gilt für die Silagen in den Weckgläsern (Tabelle 2). Was die Silagen in den Beuteln (Tabelle 1) betrifft, so war der Unterschied im ph-Wert zwischen den behandelten und den Kontrollsilagen noch größer, nämlich ca. 1,4 Einheiten (ph 4,4 zu ph 5,8).

Die Wirkung von EM-A und EM-Silage nach 6 Tagen Fermentation auf den ph-Wert war nicht gleich. Nur bei der Anwendung mit EM-A war der ph-Wert auf 5,5 statt 6,5 bei den Kontrollsilagen. Wahrscheinlich wurde dies durch die hohe Anzahl Milchsäurebakterien zu Beginn der Fermentation bewirkt. EM-A (ca.  $2,10^5$  KbE/g Gras) führt dem Siliergut eine um den Faktor 7 höhere Milchsäurebakterienmenge zu als EM-Silage ( $3,10^4$  KbE/g Gras). Der Unterschied zwischen EM-A und EM-Silage hat keinen Einfluss auf den endgültigen ph-Wert am Ende des Prozesses, wohl aber auf die Geschwindigkeit der ph-Absenkung. Eine schnelle ph-Absenkung in der Silage vermindert das Risiko auf unerwünschte Fehlgärungen.

Tabelle 1: Wirkung der Silierhilfsmittel EM-A und EM-Silage auf den Gewichtsverlust, ph und die aerobe Stabilität der Grassilagen in 1-kg-Beuteln nach 2 Monaten Fermentationszeit. Die Zahlen sind die Durchschnitte von 2 Messungen aus 2 Proben.

Nach 2 Monaten Fermentation			
	Kontrolle	EM-Silage	EM-A
Gewichtsverlust in g/kg	39,0(a)	25,8(b)	23,9(b)
ph-Wert	5,88 (a)	4,36 (b)	4,29 (b)
aerobe Stabilität (Stunden)	60(a)	>525 (b)	>525 (b)

Die Werte in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstabenkennzeichnungen sind signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ )

### 4.2.5 Aerobe Stabilität und Fermentationsprodukte

EM-A und EM-Silage erhöhten die aerobe Stabilität der Grassilagen nach zwei Monaten Lagerzeit. Die Kontrollsilagen erwärmten sich schon nach 60 Stunden, während die behandelten Silagen 3 Wochen stabil blieben (Tabelle 1). Der aerobe Stabilitätstest wird standardmäßig nach drei Wochen abgebrochen, weil der Test danach nicht mehr repräsentativ ist. Das Material trocknet zu sehr aus. Bei der Erklärung der aeroben Stabilität spielt die Anzahl der Fäulnisorganismen (Hefen und Pilze) und die Gehalten an organischen Säuren (unter anderem Milchsäure, Essigsäure) eine wichtige Rolle.

Die Anzahl der Fäulnisorganismen war für alle Silagen sehr niedrig unter der Nachweisgrenze. (>100 KbE/g ) oder gerade etwas darüber (Tabelle 2).

Milchsäure, Essigsäure und Ethanol waren in allen Silagen die dominanten Fermentationsprodukte nach 2 Monaten Lagerung (Tabelle 2). Der Gehalt an Milchsäure und Essigsäure war in den mit EM-A und EM-Silage behandelten Silagen viel höher als in den Kontrollsilagen. Daneben wurden in beiden Behandlungsstufen hohe Gehalte an 1,2-Propandiol und 1-Propanol gemessen. Das deutet auf eine Stimulation der Aktivität von *Lactobacillus buchneri* und/oder anverwandte Milchsäurebakterien. Diese Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der aeroben Stabilität der Silagen (Oude Elferink et al., 2001). Die höheren Ammoniakgehalte in den mit EM behandelten Silagen können sowohl durch Milchsäurebakterien als auch durch andere Mikroben in EM bewirkt werden.

Die positive Wirkung von EM-A und EM-Silage auf die aerobe Stabilität der behandelten Silagen im Vergleich mit den Kontrollsilagen stimmt überein mit den viel höheren Konzentrationen konservierender Säuren in den mit EM behandelten Silagen.

Tabelle 2. Die Wirkung der Silierhilfsmittel EM-A und EM-Silage auf die Charakteristiken von Grassilagen in 1-Liter Weckgläsern nach 6 Tagen und 2 Monaten Fermentationszeit. Die Werte sind Durchschnitte aus 2 Messungen aus zwei Proben.

	nach 6 Tagen Fermentation			nach 2 Monaten Fermentation		
	Kontr.	EM-Sil.	EM-A	Kontr.	EM-Sil.	EM-A
Trockensubstanz g/kg	nb	nb	nb	451	440	436
Gewichtsverlust g/kg	2,73 (a)	3,00(a)	6,70(b)	11,5(a)	24,0(b)	21,2(b)
ph	6,55(a)	6,50(a)	5,49(b)	5,11(a)	4,42(b)	4,36(b)
Hefen (log KbE/g)	nb	nb	nb	2,15	< 2	< 2
Pilze (log KbE/g)	nb	nb	nb	< 2	< 2	< 2
Milchsäure (g/kg TS)	nb	nb	nb	41,9	79,3	85,2
Essigsäure (g/kg TS)	nb	nb	nb	7,6	36,2	39,2
Ethanol (g/kg TS)	nb	nb	nb	11,2	17,7	11,7
1,2-Propandiol (g/kg TS)	nb	nb	nb	0	10,0	9,0
2,3-Butandiol (g/kg TS)	nb	nb	nb	0,3	0,3	0,3
Propionsäure (g/kg TS)	nb	nb	nb	2,2	2,4	2,7
1-Propanol (g/kg TS)	nb	nb	nb	0	2,3	2,9
Ammoniak (g/kg TS)	nb	nb	nb	2,5	3,5	3,6

Die Werte in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstabenkennzeichnungen und der selben Fermentationszeit sind signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ), nb = nicht bestimmt

## 5. Schlussfolgerungen

Die Behandlung von Grassilage mit EM-A und EM-Silage während der Silierung hatte in dieser Untersuchung einen sehr deutlichen Einfluss auf den pH-Wert am Ende des Prozesses und die aerobe Stabilität im Vergleich mit nicht behandelten Silagen. EM-A hatte darüber hinaus auch eine auf die anfängliche Geschwindigkeit der pH-Absenkung deutlich positive Wirkung.

Aktivierung von EM1 nach der Gebrauchsanweisung von Agriton war zur Herstellung des Silierhilfsmittels sehr geeignet, aber diese Methode kann verbessert werden (die empfohlene Aktivierungszeit kann bei höheren Temperaturen möglicherweise verkürzt werden).

## 6. Literaturliste

**Informatie en Kenniscentrum Veehouderij (IKC)** (1993) Handboek voor de rundveehouderij. IKC, Lelystad. **Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, F., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F.** (2001).

Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 125-132.

**Robinson, B.H., Tamminga, S., van Vuuren, A.M.** (1986) Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate of rumen fermentation in dairy cows. Livestock Prod. Sci. 15: 173-189.