

Aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der Humboldt-Universität

DISSERTATION

Untersuchungen zur Unterbindung von Buttersäuregärung und Clostridienaktivität in Silagen aus nitratarmem Grünfutter

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum agriculturalium
(Dr. rer. agr.)

Eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von Dipl.-Ing. agr. Polip Iv
Geb. am 18.08.1969 in Kompung Cham / Kambodscha

Präsident der
Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. J. Mlynek
Dekan der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. Lindemann

Gutachterin/Gutachter: 1. Prof. Dr. E. Kaiser
 2. Prof. Dr. H. Schenkel
 3. Prof. Dr. J. von Lengerken

Datum der mündlichen Prüfung: am 19. Juli 2001

Abstract

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Ermittlung des im Grünfutter notwendigen Mindest-Nitratgehaltes zur Erzielung buttersäurefreier Silagen, wobei TS-Gehalt und Z/PK-Quotient des Ausgangsmaterials sowie dessen Belastungsgrad mit Clostridien sporen berücksichtigt wurden. Dazu wurden zwei mehrfaktorielle Laborsiliverversuche durchgeführt, bei denen eine Variationsreihe des Nitratgehaltes (0,0...0,3 % Nitrat-N in TS) mit Variationsreihen des TS-Gehaltes (ca. 14...40 %) und des Z/PK-Quotienten (1,5...3,1) systematisch kombiniert wurden. Jede Wertekombination wurde sowohl mit sauber geerntetem Grünfutter als auch mit Clostridien sporen kontaminiertem Grünfutter geprüft. Die Silagen wurden nach 180 Tagen Lagerungsdauer untersucht. Zum anderen wurde die Dynamik der Clostridienentwicklung im Gärungsverlauf in Abhängigkeit von TS-Gehalt, Säuerungsintensität und Nitratgehalt geprüft. Jede Stufe des TS-Gehaltes (20, 30 40 und 50%) wurde mit Zusätzen von Nitrat, Milchsäurebakterien (MSB) bzw. MSB + Glucose und MSB + Nitrat angesetzt. Das Ausgangsmaterial (*Dac. glomerata*, nitratfrei) war durchgehend mit Clostridien sporen kontaminiert. Die Untersuchung der Silagen erfolgte 3, 7, 14, 28, 56 und 180 Tage nach dem Ansatz.

Der Konservierungserfolg bei der Silierung hängt nicht nur vom TS-Gehalt und Z/PK-Quotienten sondern auch vom Nitratgehalt und Clostridien sporen besatz des Ausgangsmaterials ab. Bei sehr niedrigem Nitratgehalt des Grünfutters liegt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Buttersäure in der Silage vor, auch bei dem als leicht vergärbare geltendem Grünfutter ($VK \geq 45$) und auch dann, wenn es im sauber geerntetem Zustand einsiliert worden ist. Bei weiter erhöhten VK-Werten, > 45 (durch Erhöhung des TS-Gehaltes und/oder Z/PK-Quotienten), wird die Höhe der Buttersäuregehalte zwar eingeschränkt. Zur sicheren Ausschaltung von Buttersäuregärung ist jedoch auch hier ein gewisser Nitratgehalt notwendig. Bei der Silierung nitratfreien/nitratarmen Grünfutters nimmt das Fehlgärungsrisiko mit dem Belastungsgrad an Clostridien sporen zu. Der notwendige Mindest-Nitratgehalt (MNG) hängt sowohl vom VK-Wert als auch vom Kontaminationsgrad des Grünfutters mit Clostridien sporen ab. Er ist um so niedriger, je höher der VK-Wert und geringer der Kontaminationsgrad ist, und umgekehrt.

- MNG (% Nitrat-N in TS) für sporenarmes Grünfutter = $0,24 - 0,0035 \cdot VK$
- MNG (% Nitrat-N in TS) für sporendreiches Grünfutter = $0,20 - 0,0021 \cdot VK$

Hohe Clostridien sporengehalte lagen vor allem in buttersäurehaltigen Silagen vor und insbesondere dann, wenn das Grünfutter sehr geringe Nitratgehalte ($\leq 0,02$ % N in DM) aufwies. Zwischen der Höhe der Buttersäuregehalte und dem Clostridien sporengehalt besteht jedoch kein direkter Zusammenhang. Erhöhung des TS-Gehaltes bewirkt eine Einschränkung der Clostridienentwicklung. Ein Rückgang des Sporengehaltes im Vergleich zum Ausgangsmaterial lag aber erst bei einem TS-Gehalt von etwa 50 % vor.

Durch Zusätze von MSB sowie MSB + Glucose konnte die Milchsäuregärung deutlich intensiviert werden. Ein sehr geringer pH-Wert war schon am 3. oder 7. Tag erreicht. Buttersäuregärung war aber erst bei TS-Gehalten ≥ 40 % ausgeschaltet. Eine Einschränkung der Sporenbildung lag ebenfalls erst bei TS-Gehalten über 40 % vor.

Bei Nitratzusatz blieben die Silagen aller TS-Stufen bis zur Auslagerung buttersäurefrei. Die Sporengehalte gingen in allen TS-Stufen während des Gärungsverlaufes kontinuierlich zurück. Bei steigenden TS-Gehalten war der Rückgang der Sporengehalte verlangsamter. Durch die Kombination von MSB und Nitrat konnte nicht nur ein sicherer Erfolg bei der Unterbindung von Buttersäurebildung und Laktatabbau sondern auch eine starke Verminderung der Sporengehalte erreicht werden.

Schlagwörter: Silage, Nitrat, Azidität, Trockenmasse, Clostridien, Sporen

Abstract

The first aim of this work was to determine the minimum content of nitrate (MCN) which is required to get silage free of butyric acid. For it, two multi-factorial experiments with orchardgrass were carried out under laboratory condition. In this experiments, nitrate content (0.01 ... 0.3 % N in DM) was systematically combined with staggered levels of the dry matter (DM) content (14 ... 40 %) and of the ratio of water-soluble carbohydrate to buffering capacity (WSC/BC: 1.5 ... 3.1). All variants were tested with forage without or with addition of clostridial spores. The silages were analysed after 180 days of incubation.

The second aim of this study was to explain the dynamic of clostridial development during ensilage, depending on DM content, intensity of lactic acid formation, and nitrate content. orchardgrass (free of nitrate) with 4 levels of DM (20, 30, 40, and 50 %) was firstly contaminated with clostridial spores about 10^4 / g FM. Then it was ensilaged with following treatments: without additives, with inoculation of lactic acid bacteria (LAB) alone or in combination with 2 % Glucose in FM (LAB+G), with nitrate addition (0.1 and 0.15 % N in DM), and with LAB plus nitrate 0.1 % N in DM. The silages were analysed 3, 7, 14, 28, 56, and 180 days after ensiling.

Results showed that silage quality not only depends on DM content and ratio of WSC to BC, but also depends on nitrate content and extent of clostridial spores in forage. With an extremely low content of nitrate a high risk of butyric acid formation is given in silages, even if the ensiling material had a high ensilability ($FC \geq 45$) and a very low content of clostridial spores. The butyric acid concentration decreased with increasing DM content from 14 to 40 % or with increasing WSC/BC-ratio. But to get the silages free of butyric acid, a certain amount of nitrate was required. By adding clostridial spores in fodder the risk of butyric acid formation was increased, especially in case of material lacking in nitrate.

The value of MCN depends on ensilability of the forage, as measured by DM-content and WSC/BC-ratio or by fermentability coefficient ($FC = DM + 8WCS/BC$), as well as depends on content of clostridial spores in the material used. The higher the FC-value and the lower the spores content is, the less nitrate is required to get silage free of butyric acid.

- MNC (% N in DM) for very low contaminated forage = $0.24 - 0.0035.FC$
- MNC (% N in DM) for high contaminated forage = $0.20 - 0.021.FC$

High content of clostridial spores was especially found in silages containing butyric acid, which were made from forage with very low nitrate content (≤ 0.02 % N in DM). But a strong relationship was not found between butyric acid and spores content.

By increasing DM content the development of clostridia during ensiling was limited. A continuous decrease of spores content, in comparison with the forage before ensiled, was observed at first by increasing DM content to 50 %.

By inoculation with LAB or LAB+G the lactic acid formation was strongly stimulated. A very low pH was reached 3 or 7 days after ensiling. But the butyric acid formation could be firstly prevented by increasing DM content to over 40 %.

For all levels of DM, by nitrate addition the silages remained no butyric acid during the whole period of incubation. The concentration of clostridial spores decreased continuously during ensilage. This decrease was slower with increasing DM content. By combination of LAB with nitrate a reliable prevention of butyric acid formation and a fast decrease in spores concentration were reached.

Keywords: silage, nitrate, acidity, dry matter, clostridia, spores

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	7
2	Literatur	9
2.1	Clostridienaktivität in Silagen	9
2.1.1	Vorkommen und Stoffwechsel	9
2.1.2	Bildung von Endosporen	11
2.2	Hemmfaktoren für die Clostridienaktivität in Silagen	14
2.2.1	Säuerungsintensität; kritischer pH-Wert	14
2.2.2	Nitratreduktion	17
2.3	Bedeutung des Nitratgehaltes im Grünfutter für die Silierung	21
2.3.1	Silierung von nitratfreiem Grünfutter	21
2.3.2	Notwendiger Nitratgehalt im Grünfutter für die Silierung	22
2.4	Zum Nachweis von Clostridienaktivität	24
3	Material und Methode	27
3.1	Versuche zur Ermittlung des notwendigen Mindest-Nitratgehaltes (mehrfaktorielle Versuche)	27
3.2	Versuch zur Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung	29
3.3	Chemische Analysen	30
3.3.1	Grünfutter	30
3.3.2	Silagen	31
3.4	Mikrobiologische Analyse	31
3.4.1	Grünfutter	31
3.4.2	Silagen	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Mehrfaktorielle Versuche	33
4.1.1	Gärqualität der Silagen	33
4.1.1.1	Versuch GV 1	33
4.1.1.2	Versuch GV 2	40

4.1.2	Merkmale der Gärqualität in Abhängigkeit von den Parametern des Ausgangsmaterials	46
4.1.2.1	Gärsäuren	46
4.1.2.2	Ammoniak und pH-Wert	56
4.1.3	Einfluss des Nitrats auf die Beziehungen zwischen den Gärparametern	60
4.1.3.1	Buttersäure und Essigsäure	60
4.1.3.2	Buttersäure und Ammoniak	63
4.1.3.3	Buttersäure und pH-Wert	65
4.1.4	Einfluss des Nitrats auf den Gehalt an Clostridien sporen in der Silage	68
4.1.5	Ableitung von Grenzwerten für den Mindest-Nitratgehalt zur Unterbindung von Buttersäuregärung	76
4.2	Versuch zur Dynamik der Clostridienentwicklung	86
4.2.1	Zur Wirkung des Trockensubstanzgehaltes	87
4.2.2	Zur Wirkung der Säuerungsintensität	90
4.2.3	Zur Wirkung des Nitratgehaltes	95
4.2.4	Zur Wirkung von Säuerung und Nitrat in Kombination	100
5	Diskussion	104
5.1	Zum Mindestgehalt an Nitrat für die Erzielung buttersäurefreier Silagen	104
5.2	Zur Bedeutung des Nitrats für die Gärqualität der Silagen	107
5.3	Zur Bedeutung des Nitrats für den Clostridien sporeng Gehalt in Silagen	112
6	Zusammenfassung	117
7	Literaturverzeichnis	119

Abkürzungsverzeichnis

Alk	Alkohol
AM	Ausgangsmaterial
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a_w	Wasseraktivität
BS	Buttersäure
C.	Clostridium
CS	Capronsäure
ES	Essigsäure
FFS	Flüchtige Fettsäure
FM	Frischmasse
G	Glucose
GC	Graschromatographie
Gesamt-N	Gesamtstickstoff
GV1	Grenzwert-Versuch 1
GV2	Grenzwert-Versuch 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KbE	Koloniebildende Einheit
L	Liter
Log	Dekadischer Logarithmus (\log_{10})
M	molare Masse
MNG	Mindest-Nitratgehalt
MPN	Most probable number, oder Anzahl von Sporen, die mittels MPN-Verfahrens bestimmt worden ist
MS	Milchsäure
MSB	Milchsäurebakterien-Präparat (<i>Silabac</i>)
n.a.	nicht angestzt
n.b.	nicht bestimmt

n.n.	nicht nachweisbar
N	Stickstoff
NH ₃ -N	Stickstoff in Form von Ammoniak
NO ₃	Nitrat
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ -N	Stickstoff in Form von Nitrat
PK	Pufferkapazität
PS	Propionsäure
TS	Trockensubstanz
TS _{min}	Mindest-Trockensubstanzgehalt
VK	Vergärbarkeitskoeffizient (VK = TS [%] + 8 Z/PK)
VS	Valeriansäure
WLKH	wasserlösliche Kohlenhydrate
Z	Zucker (gleich WLKH)
Z/PK	Verhältnis von Zuckergehalt zur Pufferkapazität

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Silierung ist das Hauptkonservierungsverfahren für Grünfutterstoffe. Neben Maissilage stellen vor allem Silagen aus Gräsern und Gras-Leguminosengemeinde die Grundfutterkomponenten dar, die ganzjährig in der Rinderfütterung eingesetzt werden. Das Ziel des Verfahrens besteht darin, fehlgärungsfreie Silagen zu erzeugen. Gut konservierte Silagen, die zudem eine hohe Energiekonzentration aufweisen, stellen die Voraussetzung sowohl für die erforderliche hohe Grundfutteraufnahme als auch für die Einschränkung des Risikos für die Kontamination der Milch mit Clostridien sporen dar. Buttersäurefreie und zugleich clostridien sporenarme Silagen sind deshalb das Ziel aller siliertechnischen Maßnahmen.

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand wird angenommen, dass Clostridien, die in Form ihrer Endosporen in das Siliergut gelangen, eine langsame Anfangsentwicklung aufweisen, so dass ihr Übergang in die stoffwechselaktive Phase aufgrund ihrer Säureempfindlichkeit durch Beschleunigung der Milchsäuregärung zu Gärbeginn verhindert werden kann. Mit dem Auftreten von Stoffwechselaktivität der Clostridien wird deshalb nur dann gerechnet, wenn die Säuerungsgeschwindigkeit zu Gärbeginn nicht ausreichend war oder wenn der kritische pH-Wert infolge ungenügender Milchsäurebildung nicht erreicht werden konnte, wobei das Auftreten von Buttersäure in der Silage im allgemeinen als Ausdruck clostridialer Stoffwechselaktivität gilt. Da der notwendige Säuregrad zur Unterbindung von Clostridienaktivität um so geringer ist, je niedriger die Wasseraktivität im Gärmedium ist, gelten die Förderung der Milchsäuregärung zu Gärbeginn sowie die Erhöhung des Trockensubstanz(TS)-Gehaltes im Siliergut als die wichtigsten Maßnahmen zur Erzielung anaerob stabiler, buttersäurefreier Silagen.

Bei nitratarmem Siliergut, wie es unter den gegenwärtigen Produktionsbedingungen verbreitet zur Silierung gelangt, treten jedoch häufig Silagen auf, bei denen trotz hohen TS-Gehaltes und ausreichender Milchsäuregärung eine mehr oder weniger ausgedehnte Buttersäuregärung stattfindet (WEIßBACH und HAACKER, 1988; KAISER und WEIß, 1994; KAISER et al. 1997a). Von KAISER et al. (1994, 1995, 1997a) wurde festgestellt, dass bei der Silierung nitratarmen Grünfutters die Buttersäurebildung nahezu von Gärbeginn an, d.h. etwa parallel zur Milchsäuregärung, stattfindet. Clostridienentwicklung bei der Silierung beginnt demnach schneller als bisher angenommen wurde. Als Ursache für die frühzeitige Clostridienentwicklung in Silagen aus nitratarmem Grünfutter gilt die hier fehlende inhibitorische Wirkung von Nitrit (SPOELSTRA, 1983) und nitrosen Gasen (KAISER et al. 1987), die zu Gärbeginn durch Reduktion aus dem nativen Nitrat entstehen. Bei Zusatz von Nitrat zum Siliergut, bei ansonsten gleichen Gärungsbedingungen, konnte die frühzeitige Buttersäurebildung ausgeschaltet werden (HEIN, 1970; KAISER, 1981; ATAKU, 1982; WEIßBACH und HAACKER, 1988; KAISER und WEIß, 1997).

Wie neuere Ergebnisse ausweisen (KAISER, et al. 1999), ist bei Fehlen von Nitrat im Ausgangsmaterial auch mit einem veränderten Gärproduktmuster in der Silage zu rechnen. Auch ist das Verhältnis der Stoffabbauprodukte in den Silagen untereinander verändert.

Ungeklärt ist bisher, bis zu welchem unteren Grenzwert des Nitratgehaltes im Siliergut mit den negativen Auswirkungen auf die Buttersäuregärung während der Silierung gerechnet werden muss bzw. wie hoch der Mindestgehalt an Nitrat zur Unterbindung der Stoffwechselaktivität von Clostridien ist. Wie aus den Ergebnissen von KAISER (1981) hervorgeht, steht der Effekt des Nitratgehaltes auf den Gärungsverlauf im Zusammenhang mit den bisher bekannten Parametern der Vergärbarkeit, TS-Gehalt und Verhältnis von Zuckergehalt zur Pufferkapazität (Z/PK-Quotient). Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass ein allgemeingültiger Mindestgehalt an Nitrat vorliegt, sondern dass sein Wert sich nach den Vergärbarkeitsparametern richtet.

Das frühzeitige Auftreten von Buttersäure in Silagen aus nitratfreiem Grünfutter (KAISER et al. 1994, 1995, 1997a,b,c), wirft darüber hinaus die Frage auf, ob im Falle eines Mangels an Nitrat im Gärungsmedium die Förderung der Milchsäuregärung zu Gärbeginn bzw. die Erhöhung des TS-Gehaltes im Siliergut (Anwelken) ausreichend sind, um Clostridien am Wachstum zu hindern. In diesem Zusammenhang ist zudem unklar, welche Bedeutung der Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials mit Clostridien sporen für den Gärungsverlauf hat.

Die Aufklärung der bei der Silierung wirksamen Hemmfaktoren auf die Clostridienentwicklung ist für die praktische Silierung insofern von Bedeutung, als damit Schlussfolgerungen für siliertechnische Maßnahmen abgeleitet werden können, mit denen das Fehlen von Nitrat im Siliergut kompensiert werden kann. In der Literatur liegen zu den zuletzt genannten Fragen keine Ergebnisse vor.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist:

1. Die Ermittlung des notwendigen Mindestgehaltes an Nitrat im Grünfutter zur Unterbindung von Clostridienaktivität, wobei die bisher bekannten Parameter der Vergärbarkeit, TS-Gehalt und Z/PK-Quotient, sowie der Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials an Clostridien sporen mit berücksichtigt werden.
2. Die Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung, insbesondere zu Gärbeginn, und der bei der Silierung wirksamen Hemmfaktoren für Clostridienaktivität. Neben dem Nitrat werden der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes und der Säuerungsintensität geprüft.

2 Literatur

2.1 Clostridienaktivität in Silagen

2.1.1 Vorkommen und Stoffwechsel

Die Bakterien der Gattung *Clostridium* (*C.*) gehören zur Familie der Bacillaceae. Sie sind insbesondere durch die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen sowie einen obligat anaeroben Stoffwechsel gekennzeichnet (HIPPE et al., 1992). Die vegetativen Zellen sind stäbchenförmig und durch peripher angeordnete Geißeln gut beweglich (SCHLEGEL, 1992). Die Gattung *Clostridium* besteht zwar aus zahlreichen Spezies (HIPPE et al., 1992); in Silagen werden jedoch nur einige von ihnen nachgewiesen (McDONALD, 1991).

Nach dem bevorzugten Gärsubstrat können Clostridien in zwei physiologische Hauptgruppen, saccharolytische und proteolytische, unterteilt werden (GIBSON u.a., 1958; GIBSON, 1965; McDONALD et al., 1991). Zur Gruppe der saccharolytischen Clostridien gehören alle Spezies, die hauptsächlich Kohlenhydrate oder organische Säuren als Energiequelle verwenden und nur eine relativ beschränkte Fähigkeit zum Abbau von Proteinen bzw. Aminosäuren besitzen. Demgegenüber gehören zu den proteolytischen Clostridien alle Arten, die hauptsächlich Proteine oder Aminosäuren fermentieren (McDONALD, 1991).

Als saccharolytische Clostridien sind in Silagen hauptsächlich *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* und *C. paraputrificum* vorhanden (GIBSON et al., 1958; GIBSON, 1965; JONSSON, 1989; McDONALD et al. 1991). Daneben kommen aber noch weitere saccharolytische Clostridien, z.B. *C. sphenoides*, und andere nicht eindeutig identifizierbare Spezies vor, die eher unregelmäßig in Silagen nachgewiesen werden (GIBSON, 1965).

C. butyricum ist in der Lage, mehrere Kohlenhydrate, einschließlich Stärke sowie Pektin, zu fermentieren, wobei Buttersäure, Essigsäure, CO₂ und H₂ als Endprodukte gebildet werden. Einige Stämme von *C. butyricum* bilden bei der Fermentation von Kohlenhydraten beachtliche Mengen an iso-Propanol und Butanol (Hippe et al., 1992). Laktat wird durch *C. butyricum* ebenso wie durch *C. tyrobutyricum* zu Buttersäure, CO₂ und H₂ abgebaut (GIBSON, 1965). Im Unterschied zu *C. butyricum* kann *C. tyrobutyricum* jedoch nur wenige Monosaccharide, z.B. Glucose und Fructose, aber nicht Disaccharide oder Stärke vergären (HIPPE et al. 1992), wobei jedoch ebenfalls Buttersäure entsteht.

Da Buttersäure eine schwächere Säure ist als Milchsäure und zudem aus zwei Mol Milchsäure nur ein Mol Buttersäure gebildet wird, führt der Abbau von Milchsäure durch saccharolytische Clostridien zum Anstieg des pH-Wertes im Gärmedium (McDONALD et al., 1991). Damit werden die Silagen instabil, und es wird der Verderb des Gärfutters eingeleitet.

Nach Angaben in der Literatur (JONSSON, 1989) stellt *C. tyrobutyricum* die dominierende Clostridienart in Silagen dar. Im Vergleich zu den anderen Spezies weist diese Art die größte Säuretoleranz auf (JONSSON und LINDGREN 1989; THYLIN et al., 1995). Zudem ist bekannt, dass *C. tyrobutyricum* als der Haupterreger für das Auftreten der gefürchteten Buttersäuregärung bzw. der Spätblähung in der Hart- und Schnittkäsebereitung anzusehen ist (KUTZNER, 1966; DASGUPTA und HULL, 1989; BACHMANN, 1995).

Nach ISHIMOTO et.al. (1974) sowie KEITH et al. (1982) kann die Stoffumsetzung von Clostridien im Gärmedium durch Nitrateinsatz beeinflusst werden. Nitrat wird dabei als Wasserstoff- bzw. Elektronenakzeptor beim Kohlenhydratabbau verwendet. Dadurch werden mehr Acetat und weniger Butyrat gebildet. In Tabelle 1 werden die Ergebnisse von KEITH et al. (1982) wiedergegeben. Wie daraus hervorgeht, ist durch Nitratzusatz sowohl bei Zugabe von 10 g Saccharose/L als auch bei Beschränkung der Saccharosezufuhr auf 2 g die Acetatbildung erhöht und gleichzeitig die Butyratsynthese reduziert worden. Durch den Nitratzusatz wurde das molare Verhältnis von Acetat zu Butyrat auf das 5- bzw. 12-fache erhöht.

Tabelle 1: Gärprodukte beim Saccharose-Abbau durch *C. butyricum* SS6 in Abhängigkeit vom Nitratzusatz, nach KEITH et al. (1982)

Saccharose- Zufuhr (g/L)	Nitratzusatz	Gärprodukte (mM)		Molares Verhältnis
		Acetat	Butyrat	Acetat/Butyrat
10,0	ohne	3,63	14,52	0,25
	mit	14,78	4,62	3,19
2,0	ohne	3,25	6,86	0,47
	mit	10,23	4,18	2,45

Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von HEIN (1970) sowie HEIN und WEIßBACH (1977) überein, bei denen in Silagen mit Clostridienaktivität der Laktatabbau zur Essigsäurebildung geführt hat, solange Nitrat im Gärmedium vorhanden war. Bei Abwesenheit von Nitrat wurde das Laktat unmittelbar zu Buttersäure umgesetzt. Der veränderte Reaktionsverlauf während des Laktatabbaus in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Nitrat im Gärungsmedium dürfte ebenfalls auf die Wirkung des Nitrats als Wasserstoffakzeptor zurückzuführen sein.

In stabilen Silagen, in denen kein Laktatabbau nachzuweisen war, zeigte das Vorliegen von Nitrat im Ausgangsmaterial aber keinen Einfluss auf die Essigsäurebildung (POLIP et al. 1997). Demnach ist eine Wirkung von Nitrat auf die Essigsäurebildung nur dann zu erwarten, wenn in der betreffenden Silage aufgrund einer zu niedrigen Säuerungsintensität oder einer zu hohen Wasseraktivität trotz Vorliegens von Nitrat Clostridienaktivität nicht verhindert wurde.

Als proteolytische Clostridien kommen *C. sporogenes* und *C. bifermentans* gewöhnlich in Silagen vor (GIBSON et al., 1958; GIBSON, 1965; OHSHIMA und McDONALD, 1978; McDONALD et al., 1991). Von beiden Spezies werden sowohl Aminosäuren als auch einige Zuckerarten vergoren, wobei Glucose und Fructose durch *C. sporogenes* zu Butyrat, Acetat, Ethanol, CO₂ und H₂ abgebaut werden. Als bevorzugtes Gärsubstrat gelten jedoch Aminosäuren (HIPPE et al., 1992).

Im Allgemeinen erfolgt der Abbau von Aminosäuren durch proteolytische Clostridien auf dem Wege der Desaminierung, der Decarboxylierung sowie der Stickland-Reaktion (Oxidation/Reduktion). Dabei gilt die Stickland-Reaktion, bei der zwei Aminosäuren gleichzeitig fermentiert werden, als der am meisten verbreitete

Reaktionstyp. Im Verlauf dieser Reaktion werden neben den direkt aus den Aminosäuren gebildeten Fettsäuren Essigsäure, Ammoniak und CO₂ freigesetzt (OHSHIMA und McDONALD, 1978; McDONALD et al., 1991). Demgegenüber entstehen auf dem Wege der Desaminierung und Decarboxylierung Ammoniak und Fettsäuren bzw. Amine als Endprodukte des Aminosäureabbaus.

2.1.2 Bildung von Endosporen

Die wirtschaftliche Bedeutung von Clostridien bei der Grünfütterkonservierung steht sowohl mit deren unerwünschten Stoffabbauprodukten als auch mit ihrer Sporenvermehrung im Zusammenhang. Während Buttersäure in den Silagen als Leit- oder Indikatormittel des Verderbs gilt und buttersäurehaltige Silagen nicht nur erhöhte Nährstoffverluste erlitten haben, sondern auch schlecht gefressen werden, gelten Silagen mit erhöhten Clostridiensporengehalten als Hauptursache für die Kontamination der Milch mit Clostridiensporen. Die dadurch verursachte Spätblähung des Käses in der Hart- und Schnittkäseproduktion stellt neben dem Auftreten von Buttersäure in der Silage ein besonderes wirtschaftliches Problem dar (BÜHLER, 1985). Clostridien gelangen in Form ihrer Endosporen in den Futterstapel zur Silierung. Kontaminationsquelle ist der Boden.

Unklar ist bisher, warum Clostridien im Gärungsverlauf sporulieren und ob die Prozesse der Sporulation durch die Anwendung einer der bisher bekannten siliertechnischen Maßnahmen verhindert werden können.

Zur Frage nach den Ursachen für die Sporulation beschränken sich die bisherigen Untersuchungen auf eine kleine Gruppe von Clostridien, die für medizinische sowie industrielle Bereiche von besonderer Bedeutung sind (MACKEY und MORRIS, 1971; WOODS und JONES, 1986). Versuchsergebnisse über die Ursachen der Sporenbildung in Silagen liegen bisher kaum vor.

Die Sporen stellen kein obligat zu durchlaufendes Stadium im Lebenszyklus der Clostridien dar. Unter günstigen Bedingungen vermehren sich die Clostridien auf unbegrenzte Zeit durch Teilung als vegetative Zellen. Die Sporenbildung wird erst ausgelöst, wenn die Bedingungen für ihr Wachstum in der vegetativen Form durch Einwirkungen bestimmter Einflussfaktoren ungünstig werden.

Für die Annahme, dass die Sporenbildung von Clostridien durch das Fehlen von Nährstoffen im Gärmedium verursacht wird, gibt es bisher wenig Beweise (WOODS und JONES, 1986). Im Unterschied zu Bacilli benötigen Clostridien für den gesamten Verlauf der Sporulation eine exogene Quelle von Energie- und Kohlenstoff (HICKEY und JOHNSON, 1981; WOODS und JONES, 1986). Während die Anforderungen an den Bedarf von Energie und Kohlenstoff durch Vorhandensein von verwertbaren Kohlenhydraten im Gärungsmedium gewährleistet werden, scheint bei vielen Spezies von Clostridien auch die Anwesenheit einer Stickstoff-Quelle für die Produktion von Endosporen erforderlich zu sein (WOODS und JONES, 1986). In Kulturen von *C. acetobutylicum* stellten LONG und Mitarbeiter (1984) fest, dass bei einer starken Einschränkung des Stickstoff-Angebotes das Zellwachstum eingeschränkt war und keine Sporen gebildet wurden.

Clostridien können demnach bei Fehlen von Nährstoffen nicht sporulieren. Das würde bedeuten, dass die clostridiale Sporenproduktion bei der Silierung vor der Erschöpfung des Vorrates an verwertbarem Gärsubstraten stattfindet.

Im Hinblick auf die Abhängigkeit der Clostridienentwicklung von der Verfügbarkeit bzw. Zusammensetzung des Gärsubstrats im Nährmedium besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Spezies (WOODS und JONES, 1986). Wasserlösliche Kohlenhydrate, z.B. Glucose und Fructose, können zwar als Energiequelle für die Sporenbildung von Clostridien dienen. Es gibt aber Spezies, deren Sporenbildung bei Anwesenheit einer hohen Konzentration an Glucose im Gärmedium durch den Mechanismus der katabolischen Repression limitiert oder gehemmt wird. Nur bei einem begrenzten Glucoseangebot können sie sporulieren (HSU und ORDAL, 1969, 1970; LABBE und DUNCAN, 1975; HICKEY und JOHNSON, 1981; WOODS und JONES, 1986). In der Natur kommen aber auch Spezies von Clostridien vor, bei denen keine katabolische Repression der Sporenbildung durch leicht verwertbare Substrate vorliegt, d.h. sie können trotz hohen Gehaltes an Glucose oder anderen Zuckern sporulieren. Das Fehlen der katabolischen Repression wurde bei einer Anzahl von saccharolytischen buttersäureproduzierenden Clostridien gefunden, z.B. *C. butyricum* (BERÈRE und HERMIER, 1965; zit. bei WOODS und JONES, 1986), *C. pasteurianum* (MACKEY und MORRIS, 1971) und *C. acetobutlicum* (LONG et al., 1984).

Die katabolische Repression der Sporenbildung durch Glucose wurde z.B. bei *C. perfringens*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. botulinum* und *C. sporogens (putrefactive_anaerobe 3679)* (LABBE und DUNCAN, 1975; HICKEY und JOHNSON, 1981; HSU und ORDAL, 1969, 1970; WOODS und JONES 1986) festgestellt. Bei diesen Organismen spielen die Konzentration und Zusammensetzung des Gärsubstrats eine wichtige Rolle bei der Auslösung und Regulierung der Sporenbildung (WOODS und JONES, 1986). Als Beweis dafür gelten zunächst die Ergebnisse von HSU und ORDAL (1969), die in Arbeiten mit *C. thermosaccharolyticum* gefunden haben, dass die Sporenbildung durch eine schnelle Glucosezufuhr reduziert oder gehemmt und durch eine langsame Zufuhr stimuliert worden ist. Über die Hemmwirkung von Glucose und anderen Zuckern auf die Sporenbildung wurde auch von LABBE und DUNCAN (1975) in Arbeiten mit *C. perfringens* berichtet. Es fehlt hier aber die Angabe, ab welcher Konzentration an Glucose die katabolische Repression ausgelöst wird. Nach HICKEY und JOHNSON (1981) ist diese Wirkung bei *C. perfringens* ab 20 mM Glucose zu erwarten.

Weiterhin haben LABBE und DUNCAN (1975) festgestellt, dass im Nährmedium mit Stärkezusatz bis 0,4 % eine höhere Ausbeute von thermoresistenten Sporen erreicht wurde als im Medium ohne Stärke. Außer bei Stärke wurde der stimulierende Effekt auf die Sporenbildung auch beobachtet, wenn im Gärungsmedium andere schwer verwertbare Substrate, z.B. Arabinose und Xylose, enthalten waren (WOODS und JONES, 1986).

Die Rolle von Stärke bei der Sporulation wurde auch von HICKEY und JOHNSON (1981) in Kulturen von *C. perfringens* geprüft. Es wurde gefunden, dass für eine gute Sporenproduktion sowohl Stärke als auch Glucose benötigt werden. Die Kombination von 0,4 % Stärke mit 4,4 mM Glucose hatte eine deutlich höhere Sporenausbeute zur Folge als 0,4 % Stärke allein. Der stimulierende Effekt von Stärke auf die Sporenbildung ist nach HICKEY und JOHNSON (1981) sowie WOODS und JONES (1986) in erster Linie auf die langsame Freisetzung von Glucose-

Einheiten beim Stärkeabbau durch die Aktivität bakterieller Amylase zu erklären, was als günstig für die Sporenproduktion bei bestimmten Clostridien gilt.

Außerdem vertreten HICKEY und JOHNSON (1981) die Meinung, dass Stärke die Sporulierungsprozesse dadurch befördern kann, dass sie kleine Moleküle, die inhibitorisch auf diese Prozesse wirken, aus dem Gärungsmedium adsorbiert.

Nach den beschriebenen Zusammenhängen kann geschlussfolgert werden, dass die Sporenbildung von Clostridien sowohl von der Konzentration an Gärsubstrat, insbesondere leicht verwertbaren Kohlenhydraten (Zucker), als auch von der Zusammensetzung des Gärsubstrats (Verhältnis von leicht zu schwer verwertbaren Substraten) im Gärungsmedium abhängt.

Außer der Konzentration und Zusammensetzung des Gärsubstrats wird die clostridiale Sporenbildung auch durch die Akkumulation von Gärprodukten und die damit verbundene pH-Absenkung bestimmt (LONG et al., 1984; WOODS und JONES, 1986). Nach HERRERO (1983) wirken die Gärsäuren, die im Verlauf der Stoffwechselaktivität von Clostridien entstanden sind, inhibitorisch auf ihre Zellen. Dies wurde durch die Ergebnisse von LONG et al. (1984) bestätigt, die in Kulturen von *C. acetobutylicum* gefunden haben, dass die Zellteilung inhibiert wurde, wenn 4 - 5 g Gärsäuren (Essig- und Buttersäure) pro Liter Nährlösung akkumuliert worden sind. Die Inhibierung der Zellteilung durch die akkumulierten Säuren, die durch die gleichbleibende Anzahl von Zellen nachweisbar war, wurde bei *C. acetobutylicum* bei Auftreten von Aceton, Butanol und Ethanol mit dem Beginn der Sporenbildung beobachtet. Die Rolle von Acetat und Butyrat bei der Auslösung von Aceton- und Alkoholproduktion sowie bei der Sporenbildung wurde durch Ergebnisse von zwei weiteren Versuchen bestätigt, bei denen Essig- und Buttersäure in nicht sporulierende Kulturen zugesetzt wurden bzw. bei denen die am Ende der exponentiellen Phase geernteten Zellen in das Nährmedium mit gestaffelter Konzentration an den genannten Säuren resuspendiert worden sind (LONG et al., 1984). Nach Angaben von WOODS und Jones (1986) wurde die Rolle von Gärsäuren bei der Sporenbildung auch bei *C. botulinum* nachgewiesen.

Die Akkumulation von Gärsäuren führt im allgemeinen zu einem Rückgang des pH-Wertes im betreffenden Gärungsmedium. Bei saccharolytischen Clostridien liegt der optimale pH-Wert für die Sporenbildung normalerweise im Bereich zwischen 5,8 - 5,0 (MACKEY und MORRIS, 1971; WOODS und JONES, 1986). Bei proteolytischen und anderen Spezies, die sowohl proteolytische als auch saccharolytische Stoffwechselaktivität besitzen, liegt der günstige pH-Wert für die Sporenbildung in einem höheren Bereich (nahe des Neutralpunktes) als bei saccharolytischen Clostridien. Ungünstige Bedingungen für die clostridiale Sporenbildung sind demnach gegeben, wenn durch die Akkumulation von Gärsäuren ein pH-Wert niedriger als 5,0 erreicht ist (MACKEY und MORRIS, 1971; WOODS und JONES, 1986). Das bedeutet, dass außer der erreichten Menge an Gärsäuren, die von der Verfügbarkeit der Gärsubstrate abhängt, die Pufferkapazität des betreffenden Gärmediums auch eine wichtige Rolle für die Sporenproduktion spielt.

In Verlaufsversuchen von MÜLLER et al. (1989) wurden bei der Prüfung von Silierzusätzen neben dem pH-Wert und den Gärprodukten auch der Besatz an Clostridien sporen in den Silagen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Vermehrung von Clostridien sporen nahezu zeitgleich mit dem Beginn der Buttersäurebildung auftrat. Diese Erscheinung war in allen Silagen mit Buttersäurebildung nachzuweisen.

Nach den oben beschriebenen Zusammenhängen und den von MUELLER u.a. (1989) erzielten Ergebnissen ist damit zu rechnen, dass die Sporenbildung bei der Silierung eher durch die Akkumulation von Gärssäuren als durch den Mangel an Nährstoffen ausgelöst wird.

Nach Angaben in der Literatur variiert der Gehalt der Silagen an Clostridiensporen sehr stark: $0,2 \times 10^1$ bis $5,2 \times 10^5$ Sporen (MPN) /g Silage (ALI YRKKÖ und ANTILA, 1975); $0,38 \times 10^2$ bis $1,5 \times 10^5$ Sporen (KbE) je g Silage (BÜHLER, 1985); $0,25 \times 10^2$ bis $1,1 \times 10^6$ Sporen (MPN)/g Silage (KALZENDORF, 1994). Im Allgemeinen sind Silagen mit hohen Buttersäure- oder Ammoniakgehalten reicher an Clostridiensporen als buttersäurefreie Silagen (KÖLLER und WEIßBACH, 1989; SPOELSTRA, 1990; KALZENDORF, 1994). Nach SPOELSTRA (1990) konnten in Laborsilagen sogar 65 % der Variation des Clostridiensporenbesatzes durch die Gehalte an Buttersäure oder Ammoniak erklärt werden. In Praxissilagen lag der Grad dieser Beziehung jedoch nur bei 20 %. Durch den Autor wird dieser Befund mit der Inhomogenität des Materials im Silo und die damit im Zusammenhang stehenden Unzulänglichkeiten der Probenahme erklärt, wobei auch dem Verschmutzungsgrad des Siliergutes ein besonderer Einfluss zugeschrieben wird.

2.2 Hemmfaktoren für die Clostridienaktivität in Silagen

2.2.1 Säuerungsintensität; kritischer pH-Wert

Aufgrund der Säureempfindlichkeit von Clostridien gilt die Förderung der Milchsäuregärung, insbesondere zu Gärbeginn, als eine der wichtigsten Maßnahmen zur Unterbindung von Clostridienaktivität (GIBSON, 1958; GIBSON et al., 1958; McDONALD et al. 1991). Da Clostridien in Form ihrer Endosporen in den Silo gelangen, wird angenommen, dass sie eine langsame Anfangsentwicklung aufweisen, so dass deren Übergang in die stoffwechselaktive Phase durch Beschleunigung der Milchsäuregärung und damit verbundene schnelle pH-Absenkung zu Gärbeginn unterbunden werden kann (McDONALD et al., 1991; WEIßBACH und HONIG, 1996). Mit dem Auftreten von Clostridienaktivität bzw. Buttersäuregärung im Gärungsverlauf wird deshalb dann gerechnet, wenn die Säuerungsintensität in der Hauptgärungsphase nicht ausreichend war (WOOLFORD, 1984; MÜLLER et al., 1989; FENLON et al., 1995; McDONALD et al., 1991).

Als kritischer Säuregrad zur Unterbindung von Clostridienaktivität in Silagen wird in diesem Zusammenhang für Frischmaterial ein pH-Wert von $\leq 4,2$ angesehen (WIERINGA, 1966; CARPINTERO et al., 1969; WEIßBACH et al., 1974; McDONALD et al., 1991).

WIERINGA hat jedoch bereits 1958 festgestellt, dass der notwendige pH-Wert für die Unterbindung von Clostridienwachstum mit der Wasseraktivität des Mediums im Zusammenhang steht. Je niedriger die Wasseraktivität ist, um so säureempfindlicher sind Clostridien. Da bei erhöhtem TS-Gehalt die Wasseraktivität vermindert ist, ist hier eine weniger starke Absenkung des pH-Wertes erforderlich, um Clostridienaktivität auszuschalten. Diese "kritischen pH-Werte" in Abhängigkeit vom TS-Gehalt des Siliergutes wurden von WEIßBACH (1968) experimentell ermittelt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kritische pH-Werte zur Unterbindung der Buttersäuregärung in Silagen (WEIßBACH, 1968)

Trockensubstanzgehalt	Wasseraktivität	kritische pH-Werte
%	a_w	
15	0,985	4,10
20	0,980	4,20
25	0,975	4,35
30	0,971	4,45
35	0,966	4,60
40	0,961	4,75
45	0,956	4,85
50	0,952	5,00

Neben der direkten Wirkung des Säuregrades auf die Clostridienaktivität ist auch die pH-abhängige antimikrobielle Wirkung der in der Silage vorkommenden organischen Säuren für die inhibitorische Wirkung auf Clostridien von Bedeutung. Dabei geht die antimikrobielle Wirkung von der undissoziierten Säure aus, da nur dieser Anteil infolge seiner Lipidlöslichkeit die semipermeable Zellwand der Mikroben durchwandern kann (LÜCK, 1985). Im Zellinneren entfaltet er entweder eine enzymhemmende Wirkung oder stört er aufgrund der pH-Änderung im Plasma das Transportsystem der Zelle (BLOCHER und BUSTA, 1983).

Der Anteil undissoziierter Säure kann nach SOFOS und BUSTA (1981) aus der Menge an Säure, dem pH-Wert und der Säurekonstanten (pK_a) berechnet werden:

$$\text{Undissoziierte Säure (mmol/L)} = \frac{\text{gesamte Säuremenge (mmol/L)}}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

In Untersuchungen von JONSSON und LINDGREN (1989) wurden sowohl die kritischen pH-Werte als auch die kritischen Gehalte an undissoziierter Säure (MIC_{undiss} = minimal inhibitory concentration of the undissociated acids) für *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* und *C. sporogenes* in einer Pepton-Hefeextrakt-Glucose-Nährlösung ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass *C. tyrobutyricum* im Vergleich zu den anderen Spezies die höchste Säuretoleranz aufweist. Das Wachstum von *C. tyrobutyricum* wurde bei einem pH-Wert von 4,4 - 4,6 gehemmt, wenn zur Einstellung des Säuregrades eine anorganische Säure (HCL) eingesetzt wurde. Bei Verwendung von organischen Säuren, z.B. Milchsäure und Essigsäure, trat die Hemmwirkung bei einem höheren pH-Niveau ein. Offensichtlich hat hier zusätzlich zur Säureeinwirkung eine direkte Hemmwirkung der organischen Säuren vorgele-

gen. Bei *C. tyrobutyricum* lagen die Werte für MIC_{undiss} bei 32 - 105 mmol für Essigsäure, bei 4,6 - 11,0 mmol für Milchsäure und bei 1,0 - 1,8 mmol für Ameisensäure.

Nach THYLIN et al. (1995) beträgt der Wert von MIC_{undiss} , bei dem das Wachstum von *C. tyrobutyricum* unterbunden wird, bei einem pH-Wert von 4,6 für Milchsäure 8,9 mmol/l, bei einem pH-Wert von 5,0 5,2 mmol/l.

Für die Unterbindung von Clostridienaktivität sind demnach sowohl der pH-Wert als auch der Gehalt an undissoziierter Säure, der ebenfalls vom pH-Wert abhängig ist, entscheidend. Inwieweit diese in vitro ermittelten Ergebnisse auf das Verhalten von Clostridien in Silagen anwendbar sind, ist bisher nicht geklärt.

Als entscheidende Voraussetzung für die Milchsäuregärung ist die Verfügbarkeit von Gärsubstrat (Zucker) im Grünfütter anzusehen, damit die notwendige Milchsäuremenge für die Aziditätsabsenkung gebildet werden kann (Weißbach und Honig, 1996). Unter dem Begriff "Zucker (Z)" wird in diesem Zusammenhang die Gesamtmenge an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WLKH) verstanden, die als vollständig in Milchsäure umsetzbar gilt. Da die Veränderung des Aziditätsgrades im Grünfütter aber nicht nur von der Menge an gebildeter Säure abhängig ist sondern auch von der Pufferkapazität des Materials, die der pH-Absenkung entgegen wirkt, dient das Verhältnis von Zuckergehalt zu Pufferkapazität (Z/PK-Quotient) als Maß für das Säuerungspotential des verwendeten Grünfütters.

Wie aus den vorangegangenen Darlegungen hervorgeht, ist der notwendige Aziditätsgrad zur Unterbindung von Clostridienaktivität jedoch auch vom TS-Gehalt des Gärmediums abhängig. Aus dem Z/PK-Quotient allein können deshalb noch keine Schlussfolgerungen für den Gärungsverlauf abgeleitet werden. Hierfür ist der TS-Gehalt des Ausgangsmaterials mit einzubeziehen.

Der in Abhängigkeit von dem im Grünfütter gegebenen Z/PK-Quotient notwendige Mindesttrockengehalt (TS_{min}) im Ausgangsmaterial zur Unterbindung von Clostridienaktivität wird nach WEIßBACH et al. (1974) durch die Gleichung

$$TS_{min} [\%] = 45 - 8Z / PK$$

beschrieben. Zur Erzeugung einer stabilen Silage bzw. zur Unterbindung von Clostridienaktivität muss demnach der TS-Gehalt des Grünfütters um so höher sein, je niedriger der Z/PK-Quotient ist. Umgekehrt braucht das Grünfütter um so weniger angewelkt zu werden, je höher das Säuerungsvermögen des Materials ist.

In Abbildung 1 ist das notwendige Verhältnis von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient im Grünfütter für die Erzeugung einer buttersäurefreien Silage schematisch dargestellt. Danach wird der Bereich, in dem der Konservierungserfolg unsicher ist, nach oben durch die Linie TS_{min} begrenzt. Bei TS-Gehalten des Grünfütters, die oberhalb dieser "Grenzwert"-Linie liegen, werden buttersäurefreie Silagen erwartet. Derartiges Grünfütter gilt als "leicht vergärbare". Mit dem Begriff "Vergärbare" wird in diesem Zusammenhang die Eignung des Materials für die Erzeugung einer buttersäurefreien Silage gekennzeichnet.

Nach SCHMIDT et al. (1971) können die Merkmale der Vergärbarkeit des Ausgangsmaterials bezüglich Zuckergehalt, Pufferkapazität und TS-Gehalt in einer Zahl, nämlich dem Vergärbarkeitskoeffizienten (VK), zusammengefasst und nach der Gleichung

$$VK = TS[\%] + 8Z / PK$$

berechnet werden. In Anlehnung an die von WEIßBACH et al. (1974) aufgestellte Gleichung zur Kennzeichnung der Vergärbarkeit von Grünfütter wird Material mit einem $VK \leq 35$ als schwer, mit einem VK von 35 - 45 als mittelschwer und mit einem $VK > 45$ als leicht vergärbar angesehen.

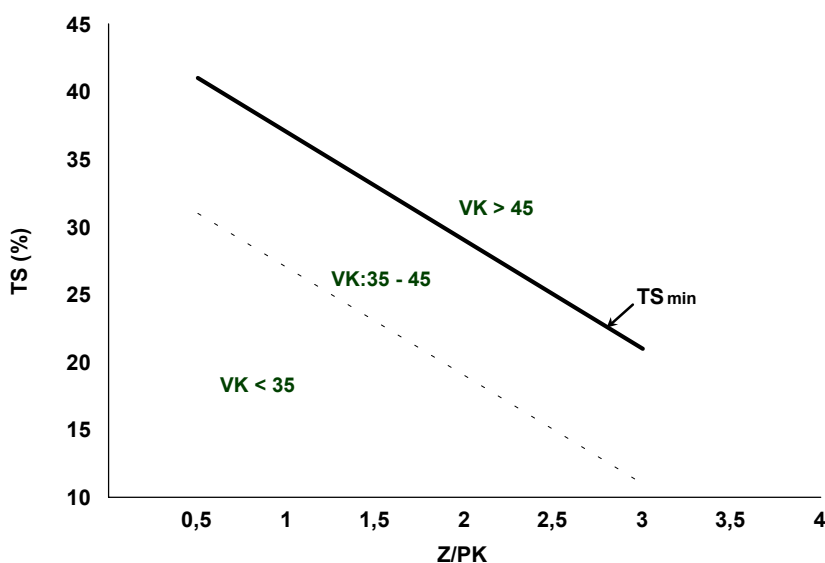


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Grenzwerte für die Beurteilung der Vergärbarkeit von Grünfütter nach WEIßBACH et al. (1974) sowie SCHMIDT et al. (1971)

2.2.2 Nitratreduktion

Das im Pflanzenmaterial enthaltene Nitrat ist chemisch eine neutrale Substanz und hat keinen inhibitorischen Effekt auf Bakterien (BARNETT, 1953; DUCAN und FOSTER, 1968; SPOELSTRA, 1984). Nitrat wird jedoch bereits von Gärbeginn an reduziert, wobei Nitrit (NO_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO) als Zwischenprodukte entstehen (WANG und BURRIS, 1960; HEIN, 1970; SPOELSTRA, 1983b, 1985, 1987; KAISER et al., 1987). Die Freisetzung von Distickstoffoxid (N_2O), über die von WANG und BURRIS (1960) berichtet wird, ist umstritten.

Indem Nitrat zu Nitrit und nitrosen Gasen reduziert wird, stellt es einen natürlichen Clostridieninhibitor dar. Nach LÜCK (1986) binden sich die Stickstoffoxide an die Aminogruppen des Dehydrogenasesystems der Mikrobenzelle, wodurch eine Hemmwirkung herbeigeführt wird. Weitere Angriffspunkte im Bakterienstoffwechsel, durch die eine Wachstumshemmung entsteht, sind darüber hinaus Reaktionen mit Hämoproteinen und SH-Enzymen.

In einem Modellversuch mit *C. tyrobutyricum* in autoklaviertem Grünfutter wurde von SPOELSTRA (1984) festgestellt, dass die H₂-Bildung in der Kultur durch Zugabe von Nitrit und Stickstoffmonoxid gehemmt wurde, während Nitrat und Stickstoffdioxid keinen signifikanten Effekt auf die H₂-Bildung hatten. Dieser Befund wird indirekt durch die Ergebnisse von WOODS et al. (1981) mit *C. sporogenes* bestätigt. Sie fanden, dass der Zusatz von Nitrit zur Bakterienkultur eine schnelle Abnahme der intrazellulären Konzentration an ATP und gleichzeitig eine Zunahme der Konzentration an Pyruvat im Medium verursacht. Aus der zunehmenden Akkumulation von Pyruvat wurde von den Autoren die Schlussfolgerung abgeleitet, dass das phosphoroklastische System von *C. sporogenes* durch die Einwirkung von Nitrit blockiert wurde.

Nach SPOELSTRA (1983a, 1985) liegt die maximale Akkumulation von Nitrit bei frischem Grünfutter am 1. - 2. Tag, bei angewelktem Material am 2. - 3. Tag, nach der Einsilierung vor. Sie dauerte bei frischem Material bis zum 3. Tag an, bei gewelktem Material war sie noch bis zum 10. Tag nachzuweisen. HEIN (1970) sowie KAISER et al. (1987a) fanden, dass die Bildung von nitrosen Gasen (NO und NO₂) nur unmittelbar nach der Einlagerung des Grünfutters (1.- 3. Tag) stattfindet, wobei Stickstoffdioxid sekundär durch Reaktion des NO mit dem Luftsauerstoff gebildet wurde. Das Ausströmen nitroser Gase aus dem Silo, zusammen mit den übrigen Gärgasen, konnte aber auch noch nach dem 3. Tag beobachtet werden.

Als Ursache für die Bildung von nitrosen Gasen wurde von HEIN (1970) die Aktivität epiphytischer Mikroorganismen nachgewiesen. Außer durch Mikroorganismen soll die Bildung von NO aber auch auf pflanzeigene Nitratreduktasen (WANG und BURRIS, 1960) oder chemische, nicht an Enzyme gebundene Reaktionen, (SPOELSTRA, 1985) zurückzuführen sein.

Von SPOELSTRA (1985, 1987) sowie McDONALD et al. (1991) wurde festgestellt, dass Enterobakterien die wichtigsten Verursacher der Nitratreduktion zu Gärbeginn darstellen. BARNETT (1953) fand, dass aus der Gruppe der Enterobakterien vor allem die in der Silage aktiven *Escherichia (E.) coli* Nitrat zu Nitrit reduzieren können. Einige von ihnen sollen in der Lage sein, die Nitritreduktion bis zur Bildung von Ammoniak durchzuführen. SPOELSTRA (1987) hat in Laborsilivertuschen nachgewiesen, dass außer *E. coli* auch *Hafnia alvei* zur Nitratreduktion befähigt ist. Die Behandlung des Ausgangsmaterials mit *E. coli* sowie *Hafnia alvei* führte zu einem deutlichen Anstieg des Nitratabbaus, verbunden mit einer erhöhten Akkumulation von Nitrit und NO. Da Enterobakterien zu Beginn der Gärung aktiv sind und ihre Aktivität mit sinkendem pH-Wert ebenso zurückgeht wie das gefundene Ausmaß der Nitratreduktion, wurde von SPOELSTRA (1984 u. 1985) angenommen, dass die zu Gärbeginn stattfindende Nitratreduktion in erster Linie durch die Aktivität von Enterobakterien verursacht wird.

Ergebnisse von in vitro-Versuchen weisen aus, dass auch viele in der Silage vorkommende Clostridienarten, z.B. *C. butyricum* und *C. tyrobutyricum*, zum Nitratabbau befähigt sind (ROUX u. BERGÈRE, 1977; KEITH et al., 1982). Als Zwischenprodukt der Nitratreduktion durch Clostridien wurde ebenfalls Nitrit nachgewiesen (ISHIMOTO et al., 1974; HASAN u. HALL, 1975; KEITH et al., 1982), als Endprodukt Ammoniak (CASKEY u. TIEDJE, 1979, 1980; KEITH et al., 1982).

Wie die Ergebnisse von DUNCAN und FOSTER (1968) ausweisen, hängt der inhibitorische Effekt des Nitrits auf das Bakterienwachstum sowohl vom Nitritgehalt als

auch vom Säuregrad im betreffenden Medium ab. Er ist um so stärker, je höher die Nitritkonzentration und je höher der Säuregrad ist. Die Kombination eines erhöhten Nitritgehaltes mit niedrigem pH-Wert kann zu einer vielfachen Verstärkung der Hemmwirkung führen.

HASAN und HALL (1975) sowie KEITH et al. (1982) gingen in ihren Untersuchungen von definierten Gärungsbedingungen aus, bei denen die Nitratdosis limitiert und der pH-Wert etwa auf neutralem Niveau gehalten wurde. Die Limitierung der Nitratdosierung hatte zum Ziel, die Akkumulation von Nitrit möglichst gering zu halten, weil keine Hemmwirkung auf Clostridienwachstum eintreten sollte. Dennoch ist ein solch inhibitorischer Effekt eingetreten, wenn Nitrat in einer Konzentration von mehr als 3,5 mmol/L dosiert worden ist. Die Nitritakkumulation wurde weiter erhöht, wenn im Medium das Zuckerangebot limitiert war.

Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Bedingungen der Silierung ist nicht ohne weiteres möglich. Mit diesen Ergebnissen ist jedoch der Nachweis erbracht, dass auch die in der Silage vorkommenden Clostridien zur Nitratreduktion befähigt sind. Die Anreicherung von Nitrit in der Silage während der Nitratreduktion durch Clostridien ist jedoch wenig wahrscheinlich. Es ist eher anzunehmen, dass Nitrit zwar im ersten Schritt der Nitratreduktion gebildet wird, dass es im Substrat aber nicht als freies Nitrit in Erscheinung tritt, sondern, enzymgebunden, sofort weiter reduziert wird bis zur Stufe Ammoniak.

Darüber hinaus wird in der Literatur berichtet, dass auch eine Reihe von Milchsäurebakterien zum Nitratabbau befähigt sind, z.B. *L. plantarum*, *L. fermentei* u.a. (ROGOSA, 1961; OSHIMA u. McDONALD, 1978; McDONALD et al., 1991). Nach ROGOSA (1961) gelten ein limitiertes Angebot von Kohlenhydraten sowie ein relativ höher pH-Wert im Gärmedium als wichtige Bedingung für die Nitratreduktion durch *L. plantarum* und *L. fermentei*.

Es ist demnach davon auszugehen, dass die meisten in der Silage vorkommenden Bakteriengruppen Nitrat reduzieren können.

Für die Silierung ist jedoch vor allem von Interesse, in welchem Gärungsabschnitt und unter welchen Bedingungen Nitrat reduziert wird, und welche Stoffwechselprodukte dabei entstehen, um daraus Schlussfolgerungen für eine mögliche Hemmwirkung auf Clostridien ableiten zu können.

HEIN (1970) hat nach ihren umfangreichen Untersuchungen zum Einfluss des Nitrats auf den Gärungsverlauf zwei Phasen des Nitratabbaus während der Silierung angenommen: einen partiellen Nitratabbau bis zur Erreichung des kritischen Aziditätsniveaus sowie ein Wiedereinsetzen des Nitratabbaus im Zusammenhang mit dem Abbau von Laktat. In diesen Arbeiten wurde festgestellt, dass in stabilen, milchsäuren Silagen nur ein geringer Anteil des im Grünfutter enthaltenen Nitrats abgebaut worden ist. Der überwiegende Anteil des im Grünfutter enthaltenen Nitrats ist am Ende der Lagerung in den Silagen wiedergefunden worden. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von UCHIDA et al. (1979), ATAKU et al. (1983), sowie MASUKO et al. (1981) überein, die in Silagen mit starker Säuerungsintensität bzw. hohem TS-Gehalt nur einen geringen Umfang des Nitratabbaus feststellen konnten.

HEIN (1970) sowie KAISER u.a. (1987) haben nachgewiesen, dass unabhängig vom späteren Gärungsverlauf zu Gärbeginn immer nitrose Gase freigesetzt werden. Der zu nitrosen Gasen umgesetzte Anteil des Nitrats lag zwischen 0,5 und 16 %. In der Literatur wird für diesen Gärungsabschnitt auch eine Nitratreduktion zu Ammoniak angenommen (WANG und BURRIS, 1960; SPOELSTRA, 1985; McDONALD et al., 1991). Ergebnisse von POLIP et al. (1997) deuten aber eher darauf hin, dass in der Gärungsphase bis zur Erreichung des kritischen Aziditätsniveaus keine nennenswerte Nitratreduktion bis zum Ammoniak stattfindet.

Demnach kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass unmittelbar nach Gärbeginn das im Ausgangsmaterial vorhandene Nitrat als natürlicher Clostridieninhibitor wirksam wird. Eine Erhöhung des Pufferungsvermögens im Gärsubstrat infolge NH_3 -Freisetzung aus dem Nitrat ist in diesem Gärungsabschnitt offensichtlich weniger zu erwarten.

Eine NH_3 -Bildung aus Nitrat ist aber bei Wiedereinsetzen des Nitratabbaus im Zusammenhang mit dem Laktatabbau zu verzeichnen, wodurch der pH-Wert im Substrat stärker ansteigt als aus dem Abbau von Laktat zu erwarten ist (HEIN, 1970; KAISER und WEIßBACH, 1988). Dem positiven Effekt des Nitrats auf die Unterbindung von Clostridienaktivität zu Gärbeginn stehen demnach negative Auswirkungen auf den Gärungsverlauf während der anaeroben Nachgärung gegenüber, da mit dem Wiederanstieg des pH-Wertes im Gärsubstrat Clostridienaktivität begünstigt wird.

Wodurch die Prozesse der anaeroben Nachgärung, die sich zunächst sowohl auf den ggf. noch vorhandenen Zucker als auch auf das Laktat erstrecken (WEIß, 2000), ausgelöst werden, ist bisher nicht eindeutig geklärt, zumal sie häufig erst beginnen, nachdem über einen mehr oder weniger langen Zeitraum nach Abschluss der Milchsäuregärung ein niedriger pH-Wert vorgelegen hat. Im Allgemeinen wird angenommen, dass der Laktatabbau durch saccharolytische Clostridien eingeleitet wird. Bereits BUCHER (1970) konnte jedoch in Versuchen mit ^{14}C -markierter Milchsäure den Nachweis erbringen, dass bestimmte heterofermentative Milchsäurebakterien, z.B. *L. buchnerie* und *L. brevis* sowie einzelne Pediokokkenarten, nicht aber homofermentative Lactobazillen, ihr eigenes Stoffwechselprodukt, die Milchsäure, weiter zu Essigsäure umsetzen. Da es sich hierbei um einen oxidativen Vorgang handelt, wurde lange Zeit angenommen, dass dieser Prozess in Silagen keine besondere Rolle für die Essigsäurebildung spielt.

In jüngster Zeit werden allerdings die genannten heterofermentativen Lactobacillus-Arten in der praktischen Silierung eingesetzt, um im Hinblick auf die Sicherung der aeroben Stabilität der Silagen gezielt erhöhte Essigsäuregehalte zu erreichen (DRIEHUIS et al., 1999; ELFERINK et al., 1999).

Es ist demnach nicht auszuschließen, dass der Laktatabbau durch heterofermentative Milchsäurebakterien eingeleitet wird, wodurch im weiteren Gärungsverlauf die Bedingungen für Clostridienaktivität geschaffen werden.

Aufgrund der größeren Säuretoleranz der saccharolytischen Gruppen dürfte davon auszugehen sein, dass zunächst die saccharolytischen, später die proteolytischen Gruppen aktiv werden. Es ist bekannt, dass nach Einsetzen der anaeroben Nachgärung sowohl Kohlenhydrate als auch Proteine abgebaut werden können.

Wie die Untersuchungen zum Nitratabbau gezeigt haben (HEIN, 1970), kann es in diesem Gärungsabschnitt, je nach Substratbedingungen und Lagerungszeit, zum vollständigen Abbau von Nitrat kommen, wobei ausschließlich Ammoniak als Reaktionsprodukt entsteht. Da die Reduktion von Nitrat zu Ammoniak biochemisch eine Aufnahme von Elektronen darstellt, dient das Nitrat während des Laktatabbaus als Elektronen- bzw. Wasserstoffakzeptor. Nach HEIN (1970) sowie HEIN und WEIßBACH (1977) sind Nitratreduktion und Laktatabbau zwei direkt miteinander verknüpfte Prozesse. Während des Laktatabbaus wurde Essigsäure gebildet, solange Nitrat im Gärmedium vorhanden war. Nach vollständiger Nitratreduktion entstand aus dem Laktat direkt Buttersäure. Demnach wurde der beim Laktatabbau frei werdende Wasserstoff zunächst vom Nitrat aufgenommen, wodurch es selbst reduziert wurde. Danach wurde der Wasserstoff zur Butyratsynthese verwendet.

Diese Hypothese wird auch durch neuere Ergebnisse zum Gärungsverlauf in nitratfreiem Grünfütter bestätigt (WEIß, 2000). In Silagen aus nitratfreiem Grünfütter entstand beim Laktatabbau keine Essigsäure. Es wurde direkt Buttersäure gebildet. Auch ISHIMOTO et al. (1974) und KEITH et al. (1982) haben festgestellt, dass Clostridien während des Kohlenhydratabbaus Nitrat als Wasserstoffakzeptor verwenden können.

Für die praktische Silierung folgt daraus, dass im Falle von Laktatabbau bzw. Fehlgärungen bei Vorhandensein von Nitrat im Gärsubstrat, d.h. bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial, die Butyratsynthese verzögert wird. Es entsteht zunächst Essigsäure. Buttersäure tritt erst in späteren Stadien der Fehlgärung auf. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass bei Vorliegen von Buttersäure das im Ausgangsmaterial vorhandene Nitrat vollständig zu Ammoniak umgesetzt worden ist.

Aus dem in der Literatur vorliegenden Kenntnisstand zu den beim Nitratabbau entstehenden Reaktionsprodukten sowie zum Verlauf des Nitratabbaus ist demnach abzuleiten, dass Gärungsverlauf und Nitratreduktion direkt im Zusammenhang stehen. Umgekehrt ist festzustellen, dass die Abbauprodukte des Nitrats direkt auf den Gärungsverlauf sowie die Clostridienaktivität Einfluss haben. Wie sich gezeigt hat, sind die Auswirkungen des Nitrats auf den Gärungsverlauf nicht nur davon abhängig, welche Abbauprodukte entstehen (NO oder Ammoniak) sondern auch von dem Zeitpunkt, zu dem sie im Gärungsverlauf auftreten.

2.3 Bedeutung des Nitratgehaltes im Grünfütter für die Silierung

2.3.1 Silierung von nitratfreiem Grünfütter

Wie sich gezeigt hat, liegt zur Wirkung von Nitrat auf den Gärungsverlauf in der Literatur ein umfassender Kenntnisstand vor. Systematische Untersuchungen zum Gärungsverlauf von nitratfreiem Grünfütter sind jedoch erst in der jüngsten Vergangenheit durchgeführt worden. Das kann damit erklärt werden, dass Nitrat als normaler Inhaltsstoff von Grünfütter angesehen wurde, mit dessen Vorhandensein immer gerechnet worden ist. Das Fehlen von Nitrat im Siliergut wurde eher als untypischer Sonderfall gewertet. Ergebnissen zum Gärungsverlauf, bei denen bei Fehlen von Nitrat bereits zu Gärbeginn Buttersäure nachgewiesen worden ist, wurde deshalb keine Bedeutung für die praktische Silierung von Grünfütter bei-

gemessen (HEIN, 1970; WEIßBACH und HAACKER, 1988). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass unter den gegenwärtigen Produktionsbedingungen in großem Umfang nitratfreies Grünfutter zur Silierung gelangt (RUTZMOSER, 1995; THAYSEN und KAISER, unveröffentlicht).

Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass bei weitgehend nitratfreiem Grünfutter bereits nahezu von Gärbeginn an Buttersäurebildung stattfindet, etwa zeitgleich mit der Milchsäuregärung (KAISER und WEIß, 1995; KAISER et al., 1997a,b; WEIß, 2000). Dabei hatte sich gezeigt, dass die frühzeitige Buttersäurebildung mit einer eingeschränkten Milchsäuregärung einherging, auch bei hohen Zuckergehalten im Ausgangsmaterial. Unter Berücksichtigung des Kenntnisstandes zur inhibitorischen Wirkung von Nitrat auf Clostridien wurden diese Effekte auf das Fehlen des natürlichen Clostridieninhibitors zurückgeführt. Offensichtlich wurden Clostridien auch als Nahrungskonkurrenten für Milchsäurebakterien wirksam. Aus diesen Ergebnissen ist aber auch die Schlussfolgerung abzuleiten, dass Clostridien eine viel schnellere Anfangsentwicklung aufweisen, als bisher angenommen wurde (KAISER et al., 1997a). Aus Untersuchungen von WEIß (2000) geht zudem hervor, dass durch die bei nitratfreiem Grünfutter frühzeitig auftretende Clostridienaktivität die Erreichung der stabilisierend wirkenden Aziditätsgrenze in Frage gestellt sein kann.

Wie im Zusammenhang mit der Wirkung des Nitrats als Elektronenakzeptor bereits erwähnt, hatte das Fehlen von Nitrat auch Auswirkungen auf die im Zusammenhang mit dem Laktatabbau auftretenden Reaktionsprodukte. Während des Laktatabbaus entstand keine Essigsäure sondern Buttersäure, so dass die Essigsäuregehalte am Ende des Gärungsverlaufes noch das zu Gärbeginn erreichte niedrige Niveau aufwiesen. Auch die Ammoniakgehalte nahmen in den ersten Stadien des Laktatabbaus nicht zu sondern erst, nachdem bereits beachtliche Buttersäuregehalte erreicht waren.

In den Frühstadien des Laktatabbaus fehlte demnach die Ammoniakbildung aus Nitrat. NH_3 wurde offensichtlich erst in den späteren Gärungsstadien aus dem Aminosäurenabbau freigesetzt. Entsprechend verlangsamt war auch der Anstieg des pH-Wertes während des Laktatabbaues.

Insgesamt ist demnach festzustellen, dass bei Fehlen von Nitrat im Grünfutter ein größeres Risiko für die Entstehung von Buttersäure vorliegt als bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial. Darüber hinaus ist zu beachten, dass bei Fehlen von Nitrat der Verlauf der Stoffumsetzungen in der Silage sowie das Gärproduktmuster am Ende der Lagerung wesentlich verschieden ist von dem in Gegenwart von Nitrat.

2.3.2 Notwendiger Nitratgehalt im Grünfutter für die Silierung

WIERINGA (1966) hat in seinen Silierversuchen mit unterschiedlichem Grünfutter, dessen Nitratgehalt von 1 bis 20 g NO_3/kgTS (entspricht etwa 0,023...0,45 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) betrug, festgestellt, dass bei mittleren Nitratgehalten von 4 bis 8 g $\text{NO}_3/\text{kg TS}$ (entspricht 0,09... 0,18 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) buttersäurefreie Silagen vorlagen, während bei geringen oder höheren Nitratgehalten im Grünfutter Buttersäure in den Silagen auftrat. Die Lagerungsdauer der Silagen betrug nur 60 Tage (2 Monate) (zit. bei SPOELSTRA, 1985). HEIN (1970) fand nach 10 monatiger Lagerungsdauer der Silagen verschiedener Futterpflanzen keine Beziehung zwischen

Buttersäurebildung und Nitratgehalt des Ausgangsmaterials. KAISER (1981) stellte jedoch fest, dass ein Zusammenhang zwischen Nitratgehalt des Ausgangsmaterials und Buttersäurebildung in den Silagen besteht, wobei aber eine Beziehung zu den übrigen Merkmalen der Vergärbarkeit vorlag. Die Gleichung für den notwendigen Mindesttrockensubstanzgehalt zur Erzielung buttersäurefreier Silagen (WEIßBACH et al., 1974) hat danach nur Gültigkeit, wenn das Grünfutter einen Nitratgehalt von 0,1 bis 0,3 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS (entspricht 4,4 bis 13,3 NO_3/kg TS) aufweist. Bei Nitratgehalten im Grünfutter ober- oder unterhalb dieses Bereiches traten negative Effekte auf die Gärqualität auf. Nach neueren Untersuchungen (KAISER und WEIß, 1997) ist anzunehmen, dass nicht mit einem generellen Grenzwert für den kritischen Nitratgehalt zu rechnen ist. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass der notwendige Mindestgehalt an Nitrat für die erfolgreiche Unterbindung von Clostridienaktivität mit den bisher bekannten Merkmalen der Vergärbarkeit, TS-Gehalt und Z/PK-Quotient, im Zusammenhang steht.

In der Literatur wird angenommen, dass Nitrat im Grünfutter vor allem deshalb notwendig ist, weil es als Clostridieninhibitor zu Gärbeginn wirksam ist. Nach Erreichen des kritischen Säuregrades wird die Hemmwirkung der Azidität als ausreichend zur Verhinderung von Clostridienentwicklung angesehen (SPOELSTRA, 1985; McDONALD et al., 1991; WEIßBACH und HONIG, 1996). Demnach müsste der notwendige Nitratgehalt sowohl mit der Intensität der Milchsäuregärung als auch mit der Dynamik der Clostridienentwicklung im Zusammenhang stehen. Wie die Untersuchungen zur Silierung nitratarmen Grünfutters gezeigt haben, ist zu Gärbeginn mit einer viel schnelleren Anfangsentwicklung von Clostridien zu rechnen, als bisher angenommen wurde. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von MARFART (1995) überein. In Kulturversuchen mit *C. tyrobutyricum* warm bei 27°C innerhalb von 80 Minuten 50% der Sporen ausgekeimt.

Ob und inwieweit zu Gärbeginn allein durch Säuerung ein inhibitorischer Effekt auf die Clostridienentwicklung erreicht werden kann und inwieweit hierfür zusätzlich Nitrat erforderlich ist, ist bisher ungeklärt. WEIßBACH und HONIG (1996) geben an, dass bei einem VK-Wert des Ausgangsmaterials von ≥ 35 buttersäurefreie Silagen entstehen, wenn das Ausgangsmaterial 0,5 g NO_3/kg TS oder 10^5 KBE Lactobazillen enthält. In Untersuchungen von KAISER et al. (1995 und 1997a) konnten diese Angaben aber nicht bestätigt werden. Es gibt bisher auch keinen experimentellen Beleg dafür, dass nach Absenkung des pH-Wertes auf das kritische Niveau die Silagen aus nitratfreiem Material auch tatsächlich anaerob stabil sind. In Verlaufsversuchen kann häufig die Beobachtung gemacht werden, dass es zum "Umkippen" der Gärung, d.h. zu Laktatabbau und Buttersäurebildung kommt, obwohl in den Silagen zuvor über mehrere Wochen hinweg ein pH-Wert unterhalb des kritischen Niveaus vorgelegen hatte.

Zu der Frage, inwieweit der Grad der Clostridienkontamination im Ausgangsmaterial mit dem notwendigen Mindestgehalt an Nitrat im Zusammenhang steht, liegen in der Literatur kaum Ergebnisse vor. In Silierversuchen mit Sporenzusatz von *C. tyrobutyricum* fand RAMMER (1996) im ersten Versuchsjahr, dass die Behandlung des Grünfutters mit Clostridien sporen negative Auswirkungen auf die Gärqualität hatte. Buttersäure- und Sporengehalt der Silagen waren bei erhöhtem Kontaminationsgrad des Grünfutters mit Clostridien sporen erhöht. Im 2. Versuchsjahr wurden jedoch keine negativen Wirkungen des Kontaminationsgrades auf die Gärqualität nachgewiesen. Nahezu alle Silagen waren buttersäurefrei; die Sporengehalte waren bis zum 100. Lagerungstag fast unverändert. Demgegenüber stiegen im 1.

Versuchsjahr die Clostridiensporengehalte nach dem 20. Tag auf 10^6 - 10^7 Sporen je g FM. Rammer führt den unterschiedlichen Befund auf die höhere Vergärbarkeit oder den höheren Nitratgehalt des Ausgangsmaterials im 2. Versuchsjahr zurück. Der durchschnittliche Nitratgehalt im Siliergut des 1. Jahres lag bei 0,0038 mol/kg Wasser (entspricht etwa 1,1 g NO_3 /kg TS), und der des 2. Jahres bei 0,013 mol/kg Wasser (entspricht etwa 2,8 g NO_3 /kg TS).

In eigenen Versuchen (KAISER et al., 1997b; POLIP und KAISER, 1998), in denen das Ausgangsmaterial sowohl im sauber geernteten Zustand als auch mit erhöhtem Clostridiensporengehalt zum Einsatz kam, wurde festgestellt, dass der Verschmutzungsgrad des Ausgangsmaterials nicht nur die Intensität der Clostridienentwicklung im Gärungsverlauf beeinflusst, sondern auch den notwendigen Mindestgehalt an Nitrat. Während bei sporenbarmem Grünfutter durch Zusatz von 0,10% N in Form von Nitrat oder Nitrit Buttersäuregärung unterbunden werden konnte, ist bei sporenbereichem Material die Buttersäurebildung nur graduell eingeschränkt worden.

Über die Sporengehalte von Silagen im Vergleich zum Ausgangsmaterial liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor. SPOELSTRA (1990) stellte fest, dass der Sporenbesatz in buttersäurefreien Laborsilagen mit dem des Ausgangsmaterials vergleichbar war. Demnach konnte durch Unterbindung von clostridialer Stoffwechselaktivität während des Gärungsverlaufes eine Erhöhung des Sporengehaltes in der Silage vermieden werden. Im Unterschied zu Laborsilagen, deren Sporengehalte mit ca. 10^2 Sporen/g FM relativ gering waren, wiesen Praxissilagen guter Gärqualität Sporengehalte bis zu 10^4 Sporen/g FM auf. Als Ursache dafür nimmt der Autor einen erhöhten Verschmutzungsgrad des Siliergutes an.

Sowohl in Laborsilagen als auch in Praxissilagen wiesen die Sporengehalte bei zunehmenden TS-Gehalten eine abnehmende Tendenz auf. Zwischen den TSgehalten des Grünfutters und den Sporengehalten der Silagen lag aber nur eine relativ schwache Beziehung von $r^2 = 0,23 \dots 0,46$ vor. Zwischen Labor- und Praxissilagen bestanden insofern Unterschiede, als bei Laborsilagen bereits ab 25 % TS keine Zunahme der Sporengehalte mehr nachweisbar war, während der entsprechende TS-Gehalt für Praxissilagen wesentlich höher lag (keine konkrete Angabe)

2.4 Zum Nachweis von Clostridienaktivität

Als Ausdruck von Clostridienaktivität in der Silage gilt das Auftreten von \geq -C₄-Fettsäuren: n-Buttersäure (n-BS), i-BS, n-Valeriansäure (n-VS), i-VS und Capronsäure (CS). Während das Auftreten von n-BS (meist dominierend) auf den Abbau von Kohlenhydraten oder Laktat zurückgeführt wird, ist bei Vorkommen der anderen Fettsäuren auf Aminosäureabbau zu schließen (MCDONALD u.a., 1991). Häufig wird auch für die Summe der genannten Säuren der Begriff "Buttersäure" verwendet, aus dem dann auf Clostridienaktivität geschlossen wird.

Jedoch ist auch ein Laktatabbau bekannt, der auf Clostridienaktivität zurückzuführen sein dürfte, bei dem nicht Buttersäure sondern Essigsäure entsteht (HEIN, 1970). Da das Auftreten von Essigsäure in der Silage aber unterschiedliche Ursachen haben kann, ist der Gehalt an Essigsäure kein geeignetes Kriterium für den Nachweis von Clostridienaktivität. HEIN (1970) stellte fest, dass der Laktatabbau

zu Essigsäure nur dann stattfindet, wenn Nitrat im Gärungsmedium vorhanden ist. In diesem Falle dient das Nitrat als Wasserstoffakzeptor beim Laktatabbau, wodurch Essigsäure entsteht und das Nitrat zu Ammoniak reduziert wird. Ist kein Nitrat im Gärungsmedium vorhanden, entsteht beim Laktatabbau direkt Buttersäure. Durch ISHIMOTO et al. (1974) konnte dieser Befund bestätigt werden.

Wie neuere Ergebnisse belegen (KAISER u.a., 1995), führt bei nitratfreiem Ausgangsmaterial auch der durch Clostridien verursachte Kohlenhydratabbau zu Gärbeginn unmittelbar zur Bildung von Buttersäure. Aus den extrem niedrigen Gehalten an Essigsäure und Ammoniak in diesen Silagen zu Gärbeginn (bei relativ hohen Buttersäuregehalten) wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der Reaktionsweg zur Buttersäurebildung aus dem Kohlenhydratabbau mit dem bei der Laktatvergärung vergleichbar ist bzw. übereinstimmt.

Als Ausdruck von Aminosäureabbau durch Clostridien wird das Auftreten erhöhter Ammoniakgehalte gewertet. Da der NH_3 -Gehalt des frischen Grünfutters normalerweise unter 1% des Gesamt-N liegt (OHSHIMA und McDONALD, 1978), können erhöhte Ammoniakgehalte in den Silagen nur auf Stoffumsetzungen im Gärungsverlauf zurückzuführen sein. In geringem Umfang sind an diesem Prozess offensichtlich auch pflanzeneigene Enzyme beteiligt (KEMBLE, 1956). Im Allgemeinen werden erhöhte Ammoniakgehalte aber als Indikator für die Stoffwechselaktivität von proteolytischen Clostridien im Gärungsverlauf gewertet (CARPITERO et al., 1969; McDONALD et al., 1991). HUGHES (1971) fand bei fortschreitendem Verderb der Silagen zunehmende Gehalte an Ammoniak. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch der Nitratabbau während des Gärungsverlaufes im wesentlichen zur Ammoniakbildung führt (HEIN, 1970; KAISER und WEIßBACH, 1988). Der zu nitrosen Gasen umgesetzte Anteil zu Gärbeginn beträgt etwa 5% des im Grünfutter enthaltenen Nitrats.

Die mögliche Nitratreduktion zu Ammoniak während der Phase der Milchsäuregärung ist umstritten. ATAKU et al. (1983), die in ihren Versuchen ^{15}N -Nitrat verwendet haben, wiesen nach, dass ein bestimmter Anteil des zu Gärbeginn abgebauten Nitrats, unabhängig von der Säuerungsintensität bis zum Ammoniak reduziert werden kann. In eigenen Untersuchungen (POLIP et al., 1997) war bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial im Vergleich zu nitratfreiem keine Zunahme der NH_3 -Gehalte nachweisbar, wenn Buttersäuregärung verhindert werden konnte.

Der Hauptanteil der Nitratreduktion zu Ammoniak erfolgt im Zusammenhang mit dem Laktatabbau. Im Allgemeinen wird unterstellt, dass bis zu einem Anteil von etwa 10% NH_3 am Gesamt-N noch kein nennenswerter Aminosäurenabbau vorliegt. Wie neuere Ergebnisse ausweisen (unveröffentlicht), kann mit diesem Grenzwert aber nur bei üblichem Niveau der Stickstoffdüngung des Grünfutters gerechnet werden. Bei eingeschränkter Stickstoffdüngung und demzufolge verminderten Rohproteingehalten und weitgehendem Fehlen von Nitrat, sind die Relationen zwischen Rohprotein- und Ammoniakgehalt verändert.

Als Ausdruck von Aminosäurenabbau durch Clostridien gilt auch das Vorliegen biogener Amine. Der Kenntnisstand über Art und Ausmaß der Aminbildung ist jedoch gering. Das dürfte nicht zuletzt auch darauf zurückzuführen sein, dass die analytische Bestimmung biogener Amine relativ schwierig ist.

Obwohl der Gehalt an Clostridiensporen von besonderer Bedeutung für den hygienischen Status der Silagen im Hinblick auf die Hartkäseproduktion ist, ist relativ wenig über Ausmaß und Ursachen der Sporenbildung bekannt (BACHMANN, 1995). Zu berücksichtigen ist auch, dass meist nur der Gesamtgehalt an Sporen erfasst wird, ohne Zuordnung zu bestimmten Stoffwechseltypen (PAHLOW, 1986). Bisher durchgeführte methodische Arbeiten zur Erfassung einzelner Clostridienarten in der Silage erstreckten sich hauptsächlich auf die Identifizierung von *C. tyrobutyricum*, das im Hinblick auf die mögliche Buttersäuregärung im Käse von besonderem Interesse ist (HEILMEIER, 1988).

Zur quantitativen Erfassung der Anzahl keimfähiger Clostridiensporen ist die Anwendung der auf statistischen Grundsätzen beruhenden MPN-(most probable number)-Methode gebräuchlich (PAHLOW, 1986). Hierbei wird das Gasbildungsvermögen der aus den Sporen auskeimenden vegetativen Keime zu deren Bestimmung genutzt, wobei die Anzahl aus der Häufigkeit der nachgewiesenen Gasbildung berechnet wird. Da nicht-selektive Nährmedien (Lactat-Acetat-Agar oder Reinforced Clostridia-Medium (RCM)) verwendet werden, wird damit die Summe der vorhandenen Clostridiensporen bestimmt. Zur Abtrennung fakultativ anaerober Begleitkeime, die ggf. mit erfasst werden, wird von JONSSON (1990) sowie von MÜLLER und PAHLOW (1991) der Zusatz eines speziellen Agar (TB-Bouillon oder Tyrobutyricum-Bouillon) verwendet, bei dem allerdings auch *C. butyricum* und *C. sporogenes* mit erfasst werden. Nach Ergebnissen von JONSSON (1990) liegt jedoch zwischen den tatsächlich vorhandenen Sporen von *C. tyrobutyricum* und dem mittels TB-Bouillon bestimmten Gehalt eine Korrelation von $R = 0,83$ vor. Trotzdem dürfte zu erwarten sein, dass unter Verwendung der genannten MPN-Methode für den Gesamtsporengehalt sowie für *C. tyrobutyricum* in Ergänzung zur chemischen Analyse zusätzliche Informationen zum Vorkommen und zur Aktivität von Clostridien gewonnen werden können.

3 Material und Methode

Zur Bearbeitung der genannten Aufgabenstellung wurden zwei Reihen von Labor-silivversuchen durchgeführt:

- Mehrfaktorielle Versuche zur Ermittlung des Mindest-Nitratgehaltes
- Verlaufsversuche zur Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung

3.1 Versuche zur Ermittlung des notwendigen Mindest-Nitratgehaltes (mehrfaktorielle Versuche)

Zur Ermittlung des notwendigen Mindest-Nitratgehaltes für die Unterbindung von Buttersäuregärung wurden im Jahre 1996 je ein mehrfaktorieller Versuch mit Knautgras (*Dac. glomerata*) vom ersten (GV 1) und dritten Aufwuchs (GV 2) durchgeführt.

Dabei wurden die Parameter der Vergärbarkeit, Trockensubstanz (TS)-Gehalt und Z/PK-Quotient, sowie der Nitratgehalt im Ausgangsmaterial so untereinander kombiniert, dass sowohl buttersäurehaltige als auch buttersäurefreie Silagen erwartet werden konnten. Im Interesse der Ermittlung eines "Grenzwertes" wurden bei allen Parametern die Abstufungen zwischen den Schritten gering gehalten. Jeder Block wurde sowohl mit sauber geerntetem Grünfutter als auch mit erhöhtem Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials an Clostridien sporen (Stresskeimzusatz) angelegt.

In den Übersichten 1 und 2 sind die erreichten Abstufungen in den Parametern wiedergegeben. Für den Nitratgehalt ist der Nitratzusatz genannt. Die Variante mit dem jeweils niedrigsten TS-Gehalt, Z/PK-Quotient und Nitratgehalt stellt das frische, unbehandelte Grünfutter dar.

Als Ausgangsmaterial für die Versuche wurde nahezu nitratfreies Grünfutter verwendet, das in der Versuchsstation Blumberg der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin gewonnen wurde. Das Grünfutter, das zum 1. Aufwuchs (GV 1) eine Stickstoffdüngergabe von etwa 60 kg N/ha erhalten hatte, ist etwa im Stadium des Schiebens der Blütenstände geerntet worden. Nach der Ernte des 2. Aufwuchses hatte der Bestand nochmals etwa 50 kg N/ha erhalten. Zum 3. Aufwuchs (GV 2) war das Material ebenfalls nahezu nitratfrei. Vor Versuchsbeginn wurde stets in den für die Versuche vorgesehenen Grünfutterpartien eine Voruntersuchung auf Nitrat, Trockensubstanz, Zucker und Pufferkapazität vorgenommen, um die für das Ausgangsmaterial vorgesehenen Parameter planmäßig einstellen zu können.

Die Einstellung der TS-Gehalte erfolgte durch Mischen von frisch geerntetem Grünfutter mit von derselben Partie gewonnenem Trockengut. Technisch wurde dabei so vorgegangen, dass etwa 4 Tage vor dem geplanten Siliertermin das Grünfutter mittels Parzellenmäher geerntet wurde. Anschließend wurde das Erntegut im Trockenschrank bei 60°C getrocknet und als Trockengut gehäckselt. Am Siliertag wurde dieses Material mit dem frisch geernteten Grünfutter in dem zuvor (nach dem TS-Gehalt) berechneten Mengenverhältnis per Hand gründlich ver-

mischt. Zur Abstufung des Z/PK-Quotienten wurde Glucose zugesetzt. Die Einstellung des Nitratgehaltes erfolgte durch Zugabe von Kaliumnitrat (KNO_3).

Übersicht 1: Versuchsanlage für den 1. Grenzwert-Versuch (GV 1)

		Grünfutter ohne Stresskeim Sporengehalt: ca.25Sporen/g FM						Grünfutter mit Stresskeim Sporengehalt: ca. 10^3 Sporen/g FM						
TS %	Z/PK	Nitratgehalt (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS)						Nitratgehalt (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS)						
		0,01 ¹⁾	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,01 ¹⁾	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	
13,5	1,9	X ²⁾	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17,5	1,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
22,5	1,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
28,1	1,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
39,4	1,5	X	X					X	X					
	2,0	X	X					X	X					
	2,5	X	X											

¹⁾: Natürlicher Gehalt (ohne Zusatz); ²⁾:Variantenbildung, 2 Gläser pro Variante angesetzt

Übersicht 2: Versuchsanlage für den 2. Grenzwert-Versuch (GV 2)

		Grünfutter ohne Stresskeim Sporengehalt: ca.20 Sporen/g FM						Grünfutter mit Stresskeim Sporengehalt: ca. 10^4 Sporen/g FM						
TS %	Z/PK	Nitratgehalt (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS)						Nitratgehalt (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS)						
		0,01 ¹⁾	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,01 ¹⁾	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	
20,8	1,6	X ²⁾	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	1,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
25,8	1,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	1,8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
31,2	1,4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	1,7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2,2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40,6	1,5	X	X					X	X	X	X	X		
	1,8	X	X					X	X	X	X	X		
	2,3	X	X					X	X	X	X	X		

¹⁾: Natürlicher Gehalt (ohne Zusatz); ²⁾:Variantenbildung, 2 Gläser pro Variante angesetzt

Als Stresskeimmaterial kam in GV 1 Erde zum Einsatz, die in der Nähe eines Praxiszillos gesammelt worden ist. Der Sporengehalt der Erde ist mit $4,3 \times 10^4$ Sporen

je g bestimmt worden. Um den angestrebten Kontaminationsgrad des Siliergutes von etwa 10^3 Sporen je g Frischmasse (FM) erreichen zu können, mussten davon 51 g je kg Siliergut zugesetzt werden. Mit dem Ziel, den Zusatz an Erde zum Siliergut zu verringern, wurde für GV 2 die im ersten Versuch verwendete Erde mit Clostridiensporen angereichert. Die Zusatzmenge an angereicherter Erde betrug bei GV 2 8 g je kg Siliergut. Der nachgewiesene Clostridiensporeng Gehalt im Ausgangsmaterial von GV 2 war mit 10^4 Sporen je g FM höher als im ersten Versuch.

Zur Herstellung der mit Sporen angereicherten Erde wurde zunächst eine Sporensuspension aus einer sporenen Silage gewonnen. Nachdem die Suspension für 15 min. bei 85°C pasteurisiert worden war, wurde sie auf Nährbodenplatten gesprüht. Dafür wurde der gleiche Nährboden verwendet, wie er bei der Sporenbestimmung zur Anwendung kommt. Die Inkubation erfolgte 25 Tage bei 37°C unter anaeroben Bedingungen. Danach wurde die sporene Suspension, deren Sporeng Gehalt mit 10^5 bis 10^6 Sporen je ml bestimmt worden ist, "geerntet" und mit der in Silonähe entnommenen sporenen Erde vermischt und bei 50°C getrocknet. Der Sporeng Gehalt der Erde wurde mit diesem Verfahren von $4,3 \times 10^4$ auf $6,0 \times 10^5$ Sporen/g erhöht.

Im Versuch GV 1 wurden 5 Stufen des TS-Gehaltes mit 3 Stufen des Z/PK-Quotienten untereinander kombiniert, wobei die niedrigsten Werte dem natürlichen Grünfütter entsprechen. Innerhalb jeder Wertekombination von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient unterscheiden sich die Varianten zusätzlich durch gestaffelte Nitratgehalte.

Der Versuch GV 2 war als Wiederholung und zugleich Erweiterung der Variationsbreite des ersten Versuches vorgesehen. Der Versuchsansatz von GV 2 beruhte auf vorläufigen Ergebnissen von GV 1, die aus der Analyse zusätzlicher Ansätze bei ausgewählten Varianten nach 90 Tagen Lagerung der Silagen ermittelt worden sind. Aufgrund der vorläufigen Ergebnisse von GV 1 wurde die Variationsbreite des Nitratgehaltes bei niedrigem Sporenbesatz des Grünfütters auf 0,20 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS gekürzt. Bei erhöhtem Sporenbesatz des Grünfütters wurde die Abstufung des Nitratgehaltes aus dem ersten Versuch beibehalten. Der Faktorenbereich wurde aber bei den oberen TS-Gehalten erweitert. Der erste Versuch (GV 1) umfasst insgesamt 150 Varianten mit je 2 Ansätzen, der zweite Versuch (GV 2) 120 Varianten mit ebenfalls je 2 Parallelansätzen.

Als Silo-Gefäße wurden in beiden Versuchen 1-L-Weckgläser verwendet. Die Ansätze wurden unter temperaturkonstanten Bedingungen bei 25°C gelagert. Die Untersuchung der Silagen erfolgte nach 180 Tagen Lagerungsdauer.

3.2 Versuch zur Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung

Im Versuchsjahr 1997 wurde ein umfangreicher Laborsilievierversuch durchgeführt, bei dem der Einfluss von TS-Gehalt, Säuerungsintensität und Nitratgehalt auf Gärqualität und Clostridiensporeng Gehalt einzeln und in Kombination im Gärungsverlauf geprüft worden ist. Als Ausgangsmaterial kam Knaulgras (*Dact. glomerata*) vom 1. Aufwuchs, nitratfrei im Stadium der Blütenbildung, zur Anwendung. Die Materialbereitung sowie die Einstellung der Varianten erfolgte wie für GV 1 und GV 2 beschrieben. Als Milchsäurebakterienpräparat (MSB) wurde das biologische Siliermittel "Sila-Bac" verwendet. Die Dosierung erfolgte dabei nach den Angaben

des Herstellers, wonach eine Impfdichte von mindestens 10^5 KbE je g FM erreicht werden soll. Um Effekte nachweisen zu können, ist das Ausgangsmaterial durchgehend mit Clostridien sporen von etwa 10^4 Sporen/g FM durch mit Sporen angereicherte Erde kontaminiert worden. Die Versuchsanlage geht aus der folgenden Übersicht 3 hervor.

Übersicht 3: Versuchsanlage zur Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung

Behandlungen	TS-Gehalt (%) im Ausgangsmaterial			
	21,7	32,5	41,6	51,5
Kontrolle (ohne Zusätze)	K	K	K	K
MSB ¹⁾ [Sila-Bac]	MSB	MSB	MSB	MSB
MSB+Glucose (2% in FM)	MSB+G	MSB+G	MSB+G	MSG+G
MSB+0,10% NO ₃ -N in TS	MSB+N1	MSB+N1	MSB+N1	MSB+N1
0,10% NO ₃ -N in TS	N1	N1	N1	N1
0,15% NO ₃ -N in TS	N2	N2	N2	N2

¹⁾ angestrebter Besatz: 10^5 KbE/g FM

Wie aus der Versuchsanlage hervorgeht, wurden als Einflussfaktoren der TS-Gehalt, die Säuerungsintensität sowie der Nitratgehalt geprüft, wobei die jeweiligen Faktoren getrennt oder kombiniert in die Prüfung einbezogen worden sind.

Der Versuch umfasst insgesamt 24 Varianten. In jeder Variante wurden von einem einheitlich behandelten Material mindestens 12 Silogefäße befüllt, von denen zu den geplanten Untersuchungsterminen je 2 Gläser geöffnet und die Silagen analysiert wurden. Die Untersuchung der Silagen erfolgte 3, 7, 14, 28, 56 und 180 Tage nach dem Ansatz. Als Silogefäße dienten 1-L-Weckgläser. Die Lagerung der Ansätze erfolgte unter temperaturkonstanten Bedingungen bei 25°C.

3.3 Chemische Analysen

3.3.1 Grünfutter

Die chemische Analyse des Grünfutters erfolgte generell im gefriergetrockneten Material. Sofern das Probenmaterial am Versuchstag (aus Kapazitätsgründen) nicht gefriergetrocknet werden konnte, erfolgte zwischenzeitlich eine Schnellfrostung bei

-36°C mit anschließender Lagerung bei -18°C.

Folgende Analysen wurden im Grünfutter durchgeführt:

- Trockensubstanz (TS): 12 h bei 60°C, anschließend 9 h bei 105°C (ohne Probenteilung zwischen den beiden Trocknungsschritten);

- Rohfaser (RFa): Fibertecsystem; Rohprotein (RP), Rohasche (RA): Standardverfahren;
- Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH): Anthronmethode; Durchflusskalorimeter (v. Lengerken und Zimmermann, 1991);
- Pufferkapazität (PK): Titration mit Milchsäure, ausgedrückt als Bedarf an Milchsäure (g/kg TS) zur Einstellung auf pH 4,0);
- Nitrat: Xylenolmethode (v. Lengerken und Zimmermann, 1991).

3.3.2 Silagen

Beim Öffnen der Versuchsansätze wurden die Silagen zunächst sensorisch geprüft. Bei Übereinstimmung der sensorischen Beschaffenheit der Parallelansätze erfolgte die Probenahme in der Mischprobe der Ansätze. Bei Nichtübereinstimmung wurden die Ansätze getrennt untersucht. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -18°C aufbewahrt. Vor dem Einfrieren wurden die Probenbeutel evakuiert.

Folgende Untersuchungen wurden im wässrigen Silageextrakt durchgeführt:

- Flüchtige Fettsäuren (FFS): Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), iso-Buttersäure (i-BS), n-Buttersäure (n-BS), iso-Valeriansäure (i-VS), n-Valeriansäure (n-VS) und Capronsäure (CS) und Alkohol: Gaschromatographisch, MGC 4000, Fa. Angetec, Kapillarsäule "Permabond" FFAP 25 x 0,32 mm; Doppel FID, Temperatur programmiert;
- Milchsäure (MS): mittels HPLC (Weiß und Kaiser, 1995)
- Ammoniak (NH_3): nach Conway
- pH-Wert: elektrometrisch
- Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH): Anthronmethode;
- Durchflusskolorimeter (v. Lengerken und Zimmermann, 1991)

3.4 Mikrobiologische Analyse

3.4.1 Grünfutter

Die mikrobiologische Analyse erfolgte stets im frischen Grünfutter. Dazu wurden 40 g Probenmaterial in einem sterilen Kunststoffbeutel mit 360 ml sterilem, entmineralisiertem Wasser 3 min mittels Stomacher extrahiert. Von diesem Extrakt (1:10), der die erste Verdünnungsstufe darstellte, wurden jeweils mindestens 4 weitere Verdünnungsstufen bereitet.

Für die Bestimmung von Clostridiensporen kam die MPN (most probable number)-Methode nach den Vorschriften von PAHLOW (1986) zur Anwendung. Als Nährmedium wurde Lactat-Acetat-Agar verwendet. Bezüglich der Zugabe des Antibiotikums D-Cycloserin zum Nährmedium sowie der Pasteurisation des Extraktes wurden in Abstimmung mit dem Autor geringfügige Modifikationen vorgenommen. Für die quantitative Erfassung der keimfähigen Endosporen wurde das miniaturisierte Hochschichtkulturröhrchen-Verfahren verwendet. Die Bebrütung erfolgte für 7 Tage bei 37°C unter anaeroben Bedingungen.

Die Keimzahlbestimmung von Milchsäurebakterien, hauptsächlich Gattung *Lactobacillus*, erfolgte mittels Koch`schem Plattengussverfahren nach der Arbeitsvorschrift von PAHLOW (1990). Als Selektivnährboden wurde Rogosa-Agar (Merk 15525) verwendet. Die Bebrütung erfolgte für 3 Tage bei 37°C unter anaeroben Bedingungen.

Die Keimzahlbestimmung von Enterokokken wurde durch Ausspateln auf der Agarroberfläche (Selektivagar nach SLANETZ und BARTLEY, 1957) und zwei- bis dreitägiger aeroben Bebrütung bei 37°C vorgenommen.

3.4.2 Silagen

In den Silagen erfolgte nur die Bestimmung von Clostridiensporen. Dafür kam das für Grünfütter beschriebene Analysenverfahren zur Anwendung. Für die Clostridiensporenbestimmung sind die Silagen beim Öffnen der Versuchsansätze gesondert eingefroren worden.

4 Ergebnisse

4.1 Mehrfaktorielle Versuche

Die beiden mehrfaktoriellen Versuche GV 1 und GV 2 hatten zum Ziel, den notwendigen Mindestgehalt an Nitrat für die Erzeugung buttersäurefreier Silagen in Abhängigkeit von der Vergärbarkeit sowie dem Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials mit Clostridiensporen zu ermitteln. Die Versuchsanlage ist in den Übersichten 1 und 2 dargestellt. Der Kombinationsbereich für die geprüften Einflussfaktoren TS-Gehalt, Z/PK-Quotient und Nitratgehalt stimmt in beiden Versuchen weitgehend überein. Im ersten Versuch liegt der TS-Gehalt des frischen, unbehandelten Grünfutters allerdings niedriger als im 2. Versuch, während der Z/PK-Quotient des Ausgangsmaterials im 1. Versuch etwas höher war. Im 1. Versuch liegt dadurch der niedrigste VK-Wert mit 28,0 etwas tiefer als in GV 2 mit 33,6. Die Differenz zwischen den VK-Abstufungen ist in beiden Versuchen aber annähernd gleich. Aus technischen Gründen musste in den oberen VK-Stufen auf die Kombination mit Nitratzusätzen $\geq 0,10$ % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS nahezu durchgehend verzichtet werden. Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen sind für den zu ermittelnden Nitrat-Grenzwert im oberen VK-Bereich aber nicht mehr als 0,1 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS zu erwarten.

Der Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials mit Clostridiensporen stimmt zwischen beiden Versuchen nicht direkt überein. Bei GV 2 ist der Sporengehalt etwas höher als bei GV 1. Ein gewisser Unterschied besteht zwischen den Versuchen insofern, als GV 1 vom 1. Aufwuchs GV 2 vom 3. Aufwuchs angesetzt wurde. Die Lagerungsdauer der Silagen betrug in beiden Versuchen 180 Tage.

Da die systematische Variation der Ausgangsbedingungen zu einer besonderen Variationsbreite der Gärqualität der Silagen geführt hat, werden zunächst die Merkmale des Gärproduktmusters dargestellt, bevor die Grenzwerte des Mindest-Nitratgehaltes abgeleitet werden.

4.1.1 Gärqualität der Silagen

4.1.1.1 Versuch GV 1

In den Tabellen 3 ... 12 sind die Merkmale der Gärqualität für den ersten mehrfaktoriellen Versuch enthalten, wobei für jeden Parameter die Daten für den Block mit sauber geerntetem Grünfutter (Block 1), denen für das kontaminierte Ausgangsmaterial (Block 2) gegenübergestellt wurden.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, weisen beim sauber einsiliierten Ausgangsmaterial die Silagen aus dem unbehandelten nitratfreien Grünfutter (1. Spalte) in den unteren TS-Klassen relativ hohe Buttersäuregehalte auf. Ab etwa VK 45 sind aber auch beim nitratfreien Ausgangsmaterial alle Silagen buttersäurefrei. Bei einem Nitratzusatz von 0,05 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS sind die Buttersäuregehalte der Silagen stark eingeschränkt und es liegen bereits bei VK unterhalb von 40 buttersäurefreie Silagen vor.

Bei höheren Nitratzusätzen sind mit Ausnahme des am schwersten vergärbaren Ausgangsmaterials, bei dem bei den höheren Nitratzusätzen wieder Buttersäure auftritt, alle Silagen frei von BS.

Durch die Kontamination des Grünfutters mit Clostridiensporen (Tab. 4) ist nicht nur der Anteil buttersäurehaltiger Silagen entscheidend erhöht worden. Auch die Höhe der Buttersäuregehalte hat ganz wesentlich zugenommen. Buttersäurefreie Silagen sind nur in einem eng begrenzten Bereich der Vergärbarkeit - TS-Gehalt zwischen 20 - 25 % oder VK-Wert zwischen etwa 38 – 45 - bei Nitratgehalten über 0,10 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS aufgetreten. Für den Bereich der Vergärbarkeit mit $\text{VK} > 50$ (TS-Gehalte ab etwa 30 %) lässt sich das Vorkommen der Buttersäure in Silagen aus kontaminiertem Ausgangsmaterial offensichtlich auch bei Nitratzusatz nicht vollständig ausschalten.

Die Milchsäuregehalte der Silagen (Tab. 5 und 6) korrespondieren erwartungsgemäß in gewissem Umfang mit den Buttersäuregehalten. In den buttersäurehaltigen Silagen (durch blaue Zahlen gekennzeichnet) liegen um so eher nennenswerte Milchsäuregehalte vor, je niedriger die Buttersäuregehalte sind, während bei hohen Buttersäuregehalten in den Silagen keine Milchsäure mehr vorhanden ist. In den buttersäurefreien Silagen ist innerhalb einer VK-Klasse (Zeile) kaum ein gerichteter Zusammenhang zum Nitratgehalt des Grünfutters festzustellen.

Innerhalb einer Nitratstufe (Spalte) gehen die Milchsäuregehalte aber mit steigendem TS-Gehalt erwartungsgemäß zurück. Beim Vergleich der Milchsäuregehalte in den buttersäurefreien Silagen fällt auf, dass bei kontaminiertem Ausgangsmaterial die Milchsäuregehalte deutlich niedriger liegen als beim sauber einsiliierten Grünfutter.

Die pH-Werte der Silagen (Tab. 7 und 8) sind in erster Linie mit den Gehalten an Milchsäure und Buttersäure zu erklären. Da im Block 2 die Buttersäuregehalte meist höher und die Milchsäuregehalte niedriger sind als im 1. Block, sind im 2. Block die pH-Werte zwar nicht durchgehend aber in der Tendenz höher. Im pH-Wert der buttersäurefreien Silagen bestehen zwischen beiden Blocks aber keine eindeutig gerichteten Unterschiede.

Die Essigsäuregehalte der Silagen des 1. Blocks (Tab. 9) sind mit wenigen Ausnahmen sehr niedrig. Gehalte von über 3,0 % in TS, die nach bisherigem Kenntnisstand als Ausdruck von Laktatabbau anzusehen sind, liegen nur in wenigen Varianten vor und zwar in solchen mit Nitratzusatz.

In Block 2 (Tab. 10) sind die Essigsäuregehalte der Silagen durchweg höher als beim 1. Block, was auf Laktatabbau und Buttersäuregärung zurückzuführen sein dürfte. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit entschieden werden, inwieweit die höheren Essigsäuregehalte auch mit dem durch den Stresskeimzusatz veränderten Bakterienbesatz im Zusammenhang stehen.

Die Ammoniakgehalte der Silagen im Block 1 (Tab. 11) liegen nur in den wenigen Silagen mit hohen Buttersäuregehalten bzw. bei hohem Nitratzusatz höher als 10 % $\text{NH}_3\text{-N}$ in Gesamt-N. In den Silagen mit Nitratzusatz, zumindest soweit sie buttersäurefrei sind, hat demnach keine bedeutende Zunahme der Ammoniakbildung durch Nitratreduktion vorgelegen. Demgegenüber weisen die buttersäurereichen Silagen des Blocks 2 (Tab. 12), insbesondere in den unteren 3 Stufen des TS-Gehaltes, hohe bis sehr hohe Ammoniakgehalte auf, auch bei nitratfreiem Ausgangsmaterial. Offensichtlich liegen aber erst bei Buttersäuregehalten ab etwa 2 % in TS $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalte von mehr als 10 % in Gesamt-N vor.

Tabelle 3: Buttersäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knauigras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	-	0,9	0	6,7	1,0	2,0
	2,5	32,8	3,6	1,6	0	0	0	0
	3,1	37,6	1,4	0	0	0	0	0
17,1	1,9	32,3	8,9	1,2	0	0	0	0
	2,5	37,1	5,3	0	0	0	0	0
	3,1	41,9	0	0	0	0	0	0
22,1	1,8	36,5	4,9	0,7	0	0	0	0
	2,3	40,5	2,9	0,7	0	0	0	0
	2,9	45,3	2,9	0	0	0	0	0
27,8	1,8	42,2	0	0	0	0	0	0
	2,3	46,2	0	0	0	0	0	0
	2,9	51,0	0	0	0	0	0	0
39,2	1,5	51,2	0	0				
	2,0	55,2	0	0				
	2,5	59,2	0	0				

Tabelle 4: Buttersäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knauigras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	6,6	7,3	5,3	6,7	6,3	7,3
	2,5	33,5	6,7	5,6	-	4,7	5,2	5,6
	3,1	38,3	8,1	6,1	0,9	1,0	1,6	1,4
17,8	1,9	33,0	8,0	9,3	2,4	6,2	5,1	7,5
	2,5	37,8	8,9	7,3	2,7	0	1,1	3,9
	3,1	42,6	10,1	2,0	0,7	0	1,2	2,0
22,8	1,8	37,2	8,6	3,5	1,7	0	0	0
	2,3	41,2	7,3	1,1	1,0	0	0	0
	2,9	46,0	8,1	1,8	0,6	0	0	0
28,3	1,8	42,7	0,9	0,6	0,5	0,7	0,6	
	2,3	46,7	1,2	0,9	0,9	0,6	1,0	
	2,9	51,5	0,5	0,7	1,2	1,2	1,2	
39,5	1,5	51,5	0,3	0,6				
	2,0	55,5	1,0	0,9				
	2,5	59,5	1,3	1,0				

*Die blaue Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

Tabelle 5: Milchsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	4	9,7	8,05	-	11,6	8,2
	2,5	32,8	5,3	8,3	16,3	12,4	12,6	13,8
	3,1	37,6	13,8	12,3	15,1	12,0	14,5	8,0
17,1	1,9	32,3	0,2	8,6	8,7	8,2	9,1	9,6
	2,5	37,1	3,0	8,1	10,0	9,8	9,6	6,6
	3,1	41,9	10,0	10,3	8,2	9,5	6,6	9,3
22,1	1,8	36,5	1,9	8,2	8,1	8,1	7,9	7,6
	2,3	40,5	4,6	8,0	8,5	7,6	8,4	8,5
	2,9	45,3	5,5	7,6	9,3	8,7	7,4	8,2
27,8	1,8	42,2	4,9	5,9	5,4	5,5	5,8	
	2,3	46,2	5,8	5,9	5,5	6,2	6,5	
	2,9	51,0	5,8	6,1	5,7	5,7	7,4	
39,2	1,5	51,2	3,9	2,8				
	2,0	55,2	4,1	3,8				
	2,5	59,2	3,4	3,4				

Tabelle 6: Milchsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	0	0	0	0	0	0
	2,5	33,5	0	0	1,3	0	0,1	0
	3,1	38,3	0	0	6,6	10,7	10,1	8,4
17,8	1,9	33,0	0	0	3,3	0	1,0	0
	2,5	37,8	0	0	2,5	7,3	3,8	0
	3,1	42,6	0	6,9	5,2	4,0	5,1	1,8
22,8	1,8	37,2	0	4,0	5,1	5,0	5,4	4,7
	2,3	41,2	0	4,0	4,3	3,8	5,2	3,9
	2,9	46,0	0,2	2,8	3,8	4,3	5,7	6,5
28,3	1,8	42,7	4,9	4,9	4,9	4,9	5,3	
	2,3	46,7	4,7	4,2	5,3	5,3	4,7	
	2,9	51,5	4,1	5,2	5,8	5,7	4,7	
39,5	1,5	51,5	4,6	4,9				
	2,0	55,5	5,1	4,6				
	2,5	59,5	5,2	4,0				

*Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

Tabelle 7: pH-Wert in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	-	4,1	4,2	5,3	4,0	4,4
	2,5	32,8	4,4	4,3	3,7	3,9	3,9	3,8
	3,1	37,6	3,8	3,8	3,7	3,9	3,7	4,1
17,1	1,9	32,3	5,1	4,2	4,1	4,1	4,1	4,1
	2,5	37,1	4,7	4,1	4,0	4,0	4,1	4,3
	3,1	41,9	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
22,1	1,8	36,5	4,8	4,3	4,2	4,4	4,4	4,3
	2,3	40,5	4,5	4,3	4,3	4,4	4,4	4,3
	2,9	45,3	4,4	4,3	4,3	4,3	4,4	4,3
27,8	1,8	42,2	4,5	4,5	4,6	4,6	4,5	
	2,3	46,2	4,5	4,4	4,6	4,4	4,4	
	2,9	51,0	4,4	4,5	4,4	4,4	4,5	
39,2	1,5	51,2	4,9	4,9				
	2,0	55,2	4,8	4,9				
	2,5	59,2	4,8	4,8				

Tabelle 8: pH-Wert in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	4,8	4,9	5,1	5,1	5,0	5,0
	2,5	33,5	4,9	5,0	4,7	5,1	5,2	5,1
	3,1	38,3	5,0	5,1	4,2	3,9	4,0	4,1
17,8	1,9	33,0	5,0	5,3	4,6	5,3	5,1	5,4
	2,5	37,8	5,2	5,3	4,7	4,2	4,5	5,4
	3,1	42,6	5,1	4,2	4,2	4,4	4,3	4,8
22,8	1,8	37,2	5,1	4,6	4,4	4,5	4,5	4,6
	2,3	41,2	5,2	4,5	4,5	4,4	4,4	4,5
	2,9	46,0	5,1	4,4	4,4	4,4	4,3	4,2
28,3	1,8	42,7	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	
	2,3	46,7	4,4	4,3	4,3	4,3	4,4	
	2,9	51,5	4,4	4,3	4,2	4,2	4,3	
39,5	1,5	51,5	4	4,4				
	2,0	55,5	4,4	4,4				
	2,5	59,5	4,3	4,4				

*Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

Tabelle 9: Essigsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	-	1,8	3,4	-	2,3	3,8
	2,5	32,8	2,7	3,8	2,2	2,0	2,3	2,0
	3,1	37,6	2,0	2,6	1,6	3,4	2,2	4,1
17,1	1,9	32,3	1,0	2,6	2,1	2,7	2,1	2,4
	2,5	37,1	1,2	3,3	1,6	2,1	2,4	4,9
	3,1	41,9	2,6	2,5	2,4	2,2	2,6	3,2
22,1	1,8	36,5	1,0	2,3	2,1	2,1	2,0	1,8
	2,3	40,5	1,1	1,7	2,9	2,7	2,5	2,0
	2,9	45,3	0,8	2,7	2,0	2,4	2,1	1,9
27,8	1,8	42,2	2,0	2,0	1,6	1,7	1,6	
	2,3	46,2	1,5	2,4	1,9	1,9	1,7	
	2,9	51,0	1,8	2,5	2,3	2,4	2,1	
39,2	1,5	51,2	1,7	1,4				
	2,0	55,2	1,6	1,5				
	2,5	59,2	1,3	1,4				

Tabelle 10: Essigsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	6,4	5,3	5,2	4,8	6,7	8,2
	2,5	33,5	4,6	5,3	5,3	4,4	5,2	6,7
	3,1	38,3	3,5	4,2	3,6	2,0	2,7	3,9
17,8	1,9	33,0	3,8	2,7	4,7	3,7	3,9	5,1
	2,5	37,8	2,1	1,9	4,0	2,6	4,5	2,2
	3,1	42,6	1,7	4,0	4,6	5,6	4,3	6,0
22,8	1,8	37,2	2,4	3,5	3,7	5,4	4,2	4,2
	2,3	41,2	1,8	3,7	5,4	5,5	3,7	5,7
	2,9	46,0	1,3	3,9	5,1	5,1	3,1	5,8
28,3	1,8	42,7	4,0	4,1	3,8	4,0	3,9	
	2,3	46,7	4,5	5,0	4,7	4,4	5,1	
	2,9	51,5	4,3	4,1	5,7	5,0	5,9	
39,5	1,5	51,5	2,2	2,8				
	2,0	55,5	3,4	2,9				
	2,5	59,5	4,7	3,1				

*Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

Tabelle 11: Ammoniakgehalt (% NH₃-N des Gesamt-N) in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	-	8,1	9,6	-	5,8	15,1
	2,5	32,8	12,1	8,7	6,0	6,1	4,9	4,2
	3,1	37,6	7,4	7,5	4,7	6,1	5,1	8,5
17,1	1,9	32,3	19,9	8,2	6,1	5,9	7,0	5,4
	2,5	37,1	13,7	5,6	5,3	4,7	6,3	6,6
	3,1	41,9	5,9	6,5	5,0	5,3	4,4	6,1
22,1	1,8	36,5	13,1	7,1	5,4	6,0	5,3	5,1
	2,3	40,5	8,3	7,2	5,1	5,2	4,7	5,2
	2,9	45,3	8,6	6,7	4,9	4,6	5,0	4,5
27,8	1,8	42,2	5,5	5,2	4,2	4,6	4,9	
	2,3	46,2	4,9	4,2	4,6	4,1	4,4	
	2,9	51,0	5,0	4,4	4,8	4,7	4,5	
39,2	1,5	51,2	5,2	4,6				
	2,0	55,2	4,8	4,8				
	2,5	59,2	4,7	4,6				

Tabelle 12: Ammoniakgehalt (% NH₃-N des Gesamt-N) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	39,9	40,7	42,3	42,2	46,8	44,0
	2,5	33,5	36,1	26,7	11,2	34,7	39,3	42,5
	3,1	38,3	28,3	26,6	7,3	6,4	8,1	7,8
17,8	1,9	33,0	38,5	46,3	12,1	37,0	21,7	42,9
	2,5	37,8	30,8	33,7	15,5	7,6	14,5	41,9
	3,1	42,6	31,7	7,1	7,5	11,8	8,5	19,7
22,8	1,8	37,2	36,6	12,1	8,2	8,3	9,1	11,4
	2,3	41,2	29,0	10,8	7,7	7,2	8,7	11,0
	2,9	46,0	18,2	8,5	8,0	7,5	5,7	7,1
28,3	1,8	42,7	7,9	6,9	6,5	6,8	6,2	
	2,3	46,7	8,1	5,7	5,9	5,9	6,8	
	2,9	51,5	6,3	5,6	5,7	5,4	7,1	
39,5	1,5	51,5	6,1	5,1				
	2,0	55,5	5,3	5,5				
	2,5	59,5	5,3	4,9				

*Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

4.1.1.2 Versuch GV 2

Die Angaben zur Gärqualität bei Versuch GV 2 sind in den Tabellen 13 - 22 enthalten.

Zunächst ist dazu festzustellen, dass im Vergleich zu Versuch GV 1 gewisse Unterschiede vorliegen, besonders deutlich beim Vergleich der Buttersäuregehalte.

Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, sind die Silagen aus nicht kontaminiertem, nitratfreiem Grünfutter durchgehend buttersäurehaltig, auch im Bereich hoher VK-Werte ($VK > 45$). Die Gehalte an Buttersäure sind allerdings wesentlich geringer als bei GV1. Bei Zusatz von Nitrat sind demgegenüber sämtliche Silagen buttersäurefrei, in allen VK-Stufen und Nitrat-Dosierungen .

Unerwartet ist, dass die Silagen aus kontaminiertem Ausgangsmaterial (Tab. 14), obwohl der Kontaminierungsgrad bezüglich der Konzentration an Clostridien sporen höher liegt als bei GV 1, in allen geprüften VK-Stufen und Nitratzusatzstufen durchgehend buttersäurefrei sind. In den Silagen aus nitratfreiem Ausgangsmaterial (Spalte 1) sind die Buttersäuregehalte zwar höher als beim sauber einsilierten Grünfutter aber trotzdem, außer bei den höheren VK-Stufen, weit niedriger als bei GV 1.

Entsprechend den Buttersäuregehalten sind auch die übrigen Merkmale der Gärqualität, bei vergleichbaren Varianten, zwischen den Versuchen unterschiedlich. Das betrifft weniger die Höhe der Gehalte als vielmehr die Verteilung bzw. das Auftreten von Silagen mit einem bestimmten Gärproduktmuster.

Silagen mit relativ hohen Milchsäuregehalten liegen bei GV 2 in beiden Blocks bei Nitratzusatz vor (Tab. 15 und 16), wobei in der Höhe der Gehalte zwischen den Blocks keine grundsätzlichen Unterschiede bestehen. Innerhalb der Spalten ist ebenso wie bei GV 1 der erwartete Rückgang der Milchsäuregehalte bei steigenden TS-Gehalten zu verzeichnen.

Die pH-Werte (Tab. 17 und 18) sind in allen Silagen mit Nitratzusatz, da sie milchsäurereich und buttersäurefrei sind, niedrig. Bemerkenswert ist, dass die pH-Werte innerhalb einer Zeile, d.h. bei steigendem Nitratzusatz, etwa gleich sind. Erwartungsgemäß ist innerhalb der Spalten, d.h. mit zunehmendem TS-Gehalt, ein Anstieg der pH-Werte zu verzeichnen.

Die Essigsäuregehalte (Tab. 19 und 20) der Silagen sind in beiden Blocks durchgehend sehr niedrig. Eindeutig gerichtete Tendenzen in Abhängigkeit von Nitratzusatz oder VK-Wert liegen offensichtlich nicht vor. Bei der Bewertung dieser Gehalte ist zu beachten, dass es sich in beiden Blocks bei Nitratzusatz um buttersäurefreie Silagen mit hohen Milchsäuregehalten handelt. Aber auch in den Silagen aus nitratfreiem Grünfutter, 1. Spalte, sind die Essigsäuregehalte, ungeachtet des Auftretens an Buttersäure und der Höhe der Gehalte, sehr niedrig.

Die Ammoniakgehalte (Tab. 21 und 22) der buttersäurehaltigen Silagen sind in Block 2 zwar etwas höher als in Block 1, aber wesentlich geringer als in den entsprechenden Silagen von GV 1. Bemerkenswert ist aber, dass die Ammoniakgehalte der buttersäurefreien Silagen mit fast 10 % $\text{NH}_3\text{-N}$ in Gesamt-N wesentlich höher liegen als bei den vergleichbaren Varianten aus GV 1 (siehe Tab. 11 und 12).

Tabelle 13: Buttersäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS				
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
20,8	1,6	33,6	2,9	0	0	0	0
	1,9	36,0	1,7	0	0	0	0
	2,4	40,0	0,4	0	0	0	0
25,8	1,5	37,8	1,9	0,2	0,2	0	0
	1,8	40,2	2,4	0	0	0	0
	2,3	44,2	1,6	0,2	0	0	0
31,2	1,4	42,4	1,7	0	0	0	0
	1,7	44,8	0,2	0	0	0	0
	2,2	48,8	1,3	-	-	-	-
40,6	1,5	52,6	0,8	0			
	1,8	55,0	0,9	0			
	2,3	59,0	0,3	0			

Tabelle 14: Buttersäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	0	0	0
	1,9	36,0	-	-	-	0	0	0
	2,4	40,0	4,0	0,5	0	0	0	0
25,8	1,5	37,8	-	-	0	0	0	0
	1,8	40,2	-	-	0	0	0	0
	2,3	44,2	2,2	0,4	0	0,4	0	0
31,2	1,4	42,4	3,3	0,3	0	0	0	0
	1,7	44,8	2,5	0	0	0	0	0
	2,2	48,8	2,3	0	0	0	0	0,4
40,6	1,5	52,6	2,0	0,2	0	0	0	
	1,8	55,0	2,2	0	0	0	0	
	2,3	59,0	1,0	0	0	0	0	

* Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

- : nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Tabelle 15: Milchsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS				
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
20,8	1,6	33,6	4,6	9,9	10,4	11,0	10,7
	1,9	36,0	7,4	10,4	10,9	10,2	10,5
	2,4	40,0	8,7	9,5	10,5	10,8	10,1
25,8	1,5	37,8	5,4	8,5	8,3	8,1	6,4
	1,8	40,2	5,7	8,5	8,3	8,8	8,4
	2,3	44,2	5,7	8,3	8,4	7,9	8,0
31,2	1,4	42,4	4,8	7,2	7,2	7,2	7,3
	1,7	44,8	7,1	6,4	6,7	6,7	6,7
	2,2	48,8	4,7	-	-	-	-
40,6	1,5	52,6	3,9	5,1			
	1,8	55,0	3,8	4,7			
	2,3	59,0	4,2	4,8			

Tabelle 16: Milchsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	10,1	10,0	10,3
	1,9	36,0	-	-	-	9,7	10,5	10,4
	2,4	40,0	3,3	10,1	10,3	9,7	10,2	10,0
25,8	1,5	37,8	-	-	8,3	8,6	8,5	8,1
	1,8	40,2	-	-	8,3	7,1	8,1	7,8
	2,3	44,2	5,3	7,8	7,9	7,1	8,3	7,9
31,2	1,4	42,4	3,8	7,0	7,0	6,8	6,9	7,7
	1,7	44,8	4,3	6,5	6,8	6,8	6,9	6,7
	2,2	48,8	4,4	6,2	7,0	6,3	6,6	6,6
40,6	1,5	52,6	2,9	5,4	5,3	5,2	5,3	
	1,8	55,0	3,0	5,1	5,0	4,0	5,0	
	2,3	59,0	3,9	5,1	5,1	4,9	4,8	

* Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

- : nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Tabelle 17: pH-Wert in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30
20,8	1,6	33,6	4,6	4,0	4,1	4,0	4,0	
	1,9	36,0	4,2	4,0	4,0	4,0	4,0	
	2,4	40,0	4,0	4,0	3,9	3,9	4,0	
25,8	1,5	37,8	4,4	4,1	4,2	4,1	4,2	
	1,8	40,2	4,5	4,1	4,1	4,1	4,2	
	2,3	44,2	4,3	4,1	4,1	4,2	4,1	
31,2	1,4	42,4	4,5	4,2	4,2	4,3	4,2	
	1,7	44,8	4,2	4,2	4,2	4,2	4,3	
	2,2	48,8	4,4	-	-	-	-	
40,6	1,5	52,6	4,7	4,5				
	1,8	55,0	4,6	4,4				
	2,3	59,0	4,4	4,5				

Tabelle 18: pH-Wert in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	4,0	4,0	4,0
	1,9	36,0	-	-	-	4,0	4,0	4,0
	2,4	40,0	4,7	3,9	3,9	4,1	4,0	4,0
25,8	1,5	37,8	-	-	4,1	4,2	4,1	4,2
	1,8	40,2	-	-	4,1	4,2	4,2	4,2
	2,3	44,2	4,3	4,2	4,1	4,2	4,1	4,1
31,2	1,4	42,4	4,5	4,2	4,3	4,3	4,2	4,2
	1,7	44,8	4,5	4,2	4,3	4,2	4,2	4,2
	2,2	48,8	4,4	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
40,6	1,5	52,6	4,8	4,5	4,5	4,5	4,4	
	1,8	55,0	4,7	4,5	4,4	4,4	4,4	
	2,3	59,0	4,5	4,4	4,4	4,5	4,5	

*Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

- :nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Tabelle 19: Essigsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS				
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
20,8	1,6	33,6	0,6	1,7	1,3	1,7	1,4
	1,9	36,0	0,7	1,9	1,6	1,8	1,6
	2,4	40,0	2,2	2,0	1,7	1,9	1,6
25,8	1,5	37,8	0,5	1,6	1,7	1,8	1,0
	1,8	40,2	0,6	1,7	1,7	1,5	1,6
	2,3	44,2	0,7	2,2	1,8	1,9	1,6
31,2	1,4	42,4	0,5	1,8	1,6	1,7	1,5
	1,7	44,8	1,7	1,6	1,7	1,7	1,7
	2,2	48,8	1,1	-	-	-	-
40,6	1,5	52,6	1,1	1,8			
	1,8	55,0	1,0	1,7			
	2,3	59,0	1,4	1,7			

Tabelle 20: Essigsäuregehalt (% in TS) in Silagen aus Knautgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	1,6	1,1	1,4
	1,9	36,0	-	-	-	1,8	1,4	1,5
	2,4	40,0	0,6	1,7	1,7	1,8	1,8	1,2
25,8	1,5	37,8	-	-	1,4	1,6	1,6	1,5
	1,8	40,2	-	-	1,6	1,7	1,6	1,5
	2,3	44,2	0,6	1,6	1,8	2,3	1,7	1,3
31,2	1,4	42,4	0,4	1,5	1,1	1,4	1,7	1,9
	1,7	44,8	0,3	1,3	1,7	1,7	1,2	1,5
	2,2	48,8	0,8	1,7	1,7	1,7	1,7	2,2
40,6	1,5	52,6	0,4	1,6	1,5	1,5	1,4	
	1,8	55,0	0,5	1,7	1,7	1,5	1,7	
	2,3	59,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,6	

* Die bauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

- : nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Tabelle 21: Ammoniakgehalt (NH₃-N in % des Gesamt-N) in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30
20,8	1,6	33,6	17,5	10,3	9,4	9,6	9,0	
	1,9	36,0	11,5	10,3	9,3	8,7	8,9	
	2,4	40,0	10,4	9,9	8,9	8,7	8,5	
25,8	1,5	37,8	11,4	10,6	9,2	8,3	6,6	
	1,8	40,2	12,8	9,4	9,0	8,3	8,6	
	2,3	44,2	10,1	9,1	8,8	8,7	8,2	
31,2	1,4	42,4	12,8	12,3	10,7	11,2	10,0	
	1,7	44,8	10,3	11,7	10,4	10,1	11,6	
	2,2	48,8	10,1	-	-	-	-	
40,6	1,5	52,6	9,3	9,6				
	1,8	55,0	10,5	9,5				
	2,3	59,0	10,4	9,6				

Tabelle 22: Ammoniakgehalt (NH₃-N in % des Gesamt-N) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	9,5	9,3	9,1
	1,9	36,0	-	-	-	8,8	8,8	8,4
	2,4	40,0	16,1	9,5	9,3	9,1	9,1	8,9
25,8	1,5	37,8	-	-	8,9	9,8	8,9	8,4
	1,8	40,2	-	-	8,9	8,7	8,2	8,8
	2,3	44,2	9,8	9,6	9,4	8,1	8,6	8,3
31,2	1,4	42,4	14,0	13,3	10,1	9,5	9,3	9,8
	1,7	44,8	12,1	10,9	6,6	9,6	10,3	8,6
	2,2	48,8	16,4	10,0	9,4	9,2	9,9	8,4
40,6	1,5	52,6	11,0	9,6	8,8	9,9	8,6	
	1,8	55,0	11,6	10,5	9,6	8,6	8,8	
	2,3	59,0	9,1	10,2	9,1	8,7	8,5	

* Die blauen Zahlen kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen

- : nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Beim Vergleich der Ergebnisse beider Versuche ist festzustellen, dass zwischen beiden Unterschiede in der Gärqualität bestehen. In beiden Versuchen liegt jedoch ein Zusammenhang zwischen den Parametern des Ausgangsmaterials, dem VK-Wert sowie dem Nitratgehalt, und der Gärqualität der Silagen vor.

Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit der Zusammenhang zwischen den Merkmalen der Vergärbarkeit einerseits und der Gärqualität andererseits in beiden Versuchen nachweisbar ist.

4.1.2 Merkmale der Gärqualität in Abhängigkeit von den Parametern des Ausgangsmaterials

4.1.2.1 Gärsäuren

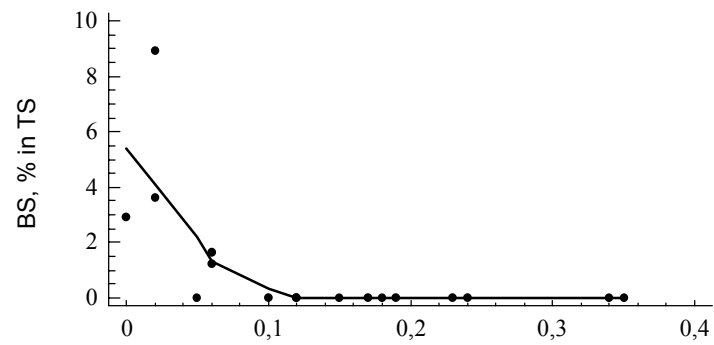
In den Abbildungen 2 bis 4 sind für die geprüften VK-Klassen die Gehalte an Buttersäure in Abhängigkeit vom Nitratgehalt dargestellt und anhand aller Einzeldaten in der jeweiligen Klasse.

Bei der gewählten Darstellungsform handelt es sich nicht um die Wiedergabe von Prozessen im Gärungsverlauf. Vielmehr wurden die am Ende der Gärung bei den einzelnen Nitratdosierungen und VK-Klassen vorliegenden Gehalte an den einzelnen Säuren dargestellt. Die Linie, die die einzelnen Punkte verbindet, veranschaulicht die Wirkung des Nitrats im Vergleich der Dosierungsstufen.

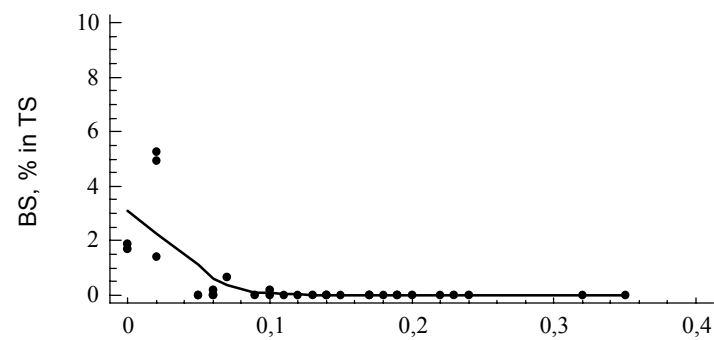
Für das unkontaminierte Grünfutter wurden die Ergebnisse beider Versuche in einer Darstellung zusammengefasst. Da bei den mit Clostridiensporen versetzten Ausgangsmaterialien zwischen den Versuchen GV 1 und GV 2 wesentliche Unterschiede in den Gärsäuregehalten aufgetreten sind, wurden die Ergebnisse für das kontaminierte Ausgangsmaterial getrennt dargestellt.

Bei den angegebenen Buttersäuregehalten handelt es sich um die Summe der $\geq C_4$ -Säuren (Gesamt-Buttersäure), bei denen die n-Buttersäure immer den dominierenden Anteil hat, häufig auch die einzige Säure dieser Gruppe ausmacht.

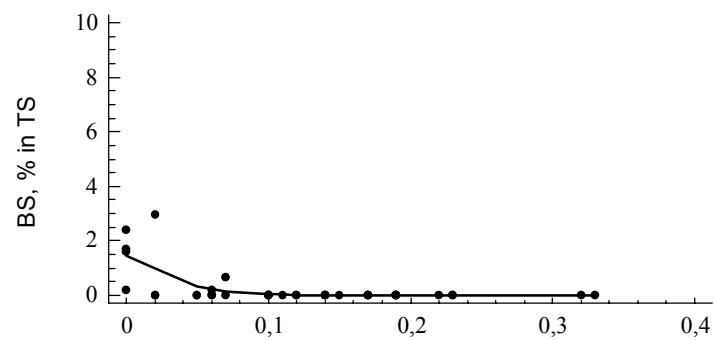
Wie aus Abbildung 2 zunächst ersichtlich ist, besteht in der Verteilung der Messwerte zwischen beiden Versuchen weitgehende Übereinstimmung. Danach ist festzustellen, dass im sauber einsilierten Grünfutter über den gesamten geprüften VK-Bereich hinweg Buttersäure in den Silagen aus nitratfreiem Grünfutter bzw. aus Grünfutter mit geringen Nitratgehalten vorliegt. Es fällt auf, dass die Buttersäuregehalte umso höher sind, je niedriger die Vergärbarkeit, gemessen an den VK-Werten, ist. Mit zunehmender Verbesserung der Vergärbarkeit werden aber nicht nur die Buttersäuregehalte geringer (sie sind allerdings auch bei VK-Werten ≥ 45 mit z.T. über 2,0 % in TS noch relativ hoch). Bei zunehmender Erhöhung der VK-Werte wurden die Nitratgehalte, von denen an buttersäurefreie Silagen vorliegen, niedriger. Während im VK-Bereich 30 – 35 noch mehr als 0,1 % NO_3 -N in TS notwendig sind zur Erzeugung buttersäurefreier Silagen, sind es im VK-Bereich 45 – 59 deutlich unter 0,1 % NO_3 -N in TS.

VK^(*): <35

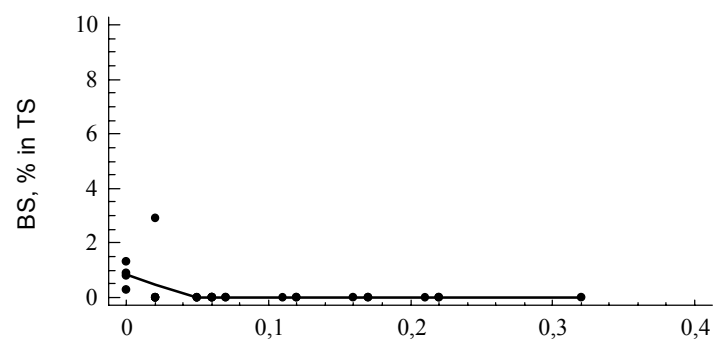
VK: 35 ... <40



VK: 40 ... < 45

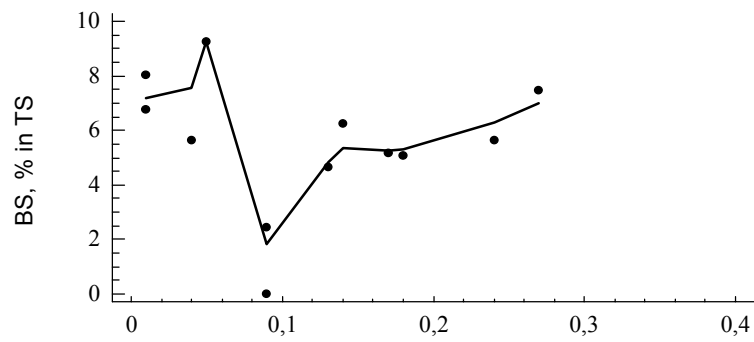


VK: 45 ... 59

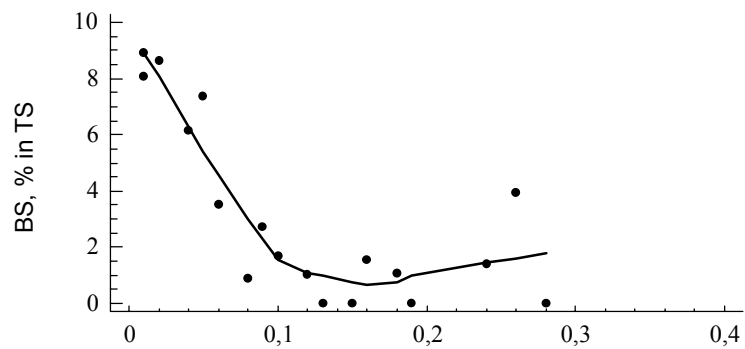
Nitratgehalt, % NO₃-N in TS

* VK = TS (%) + 8Z/PK

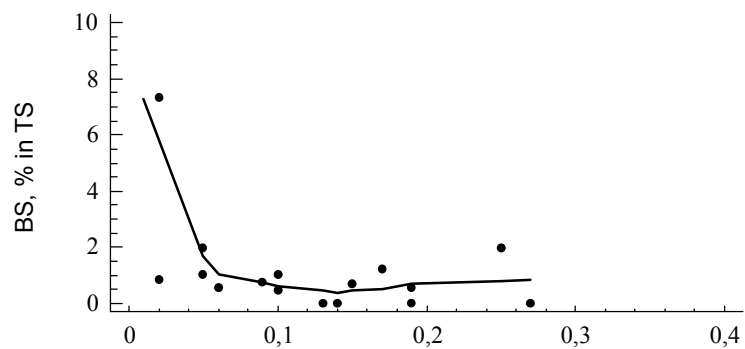
Abbildung 2: Buttersäuregehalt von Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes (Versuch GV 1 und GV 2)

VK^(*): <35

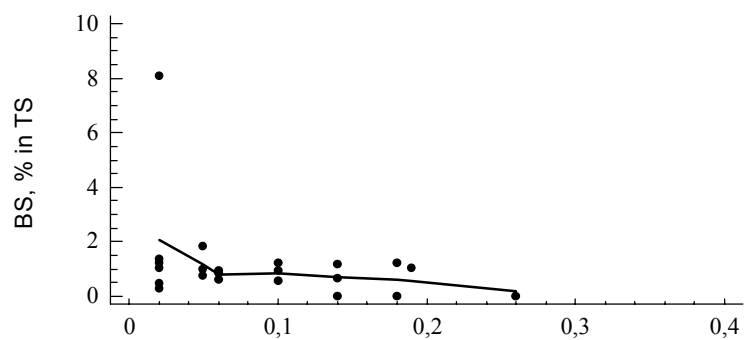
VK: 35 ... <40



VK: 40 ... < 45

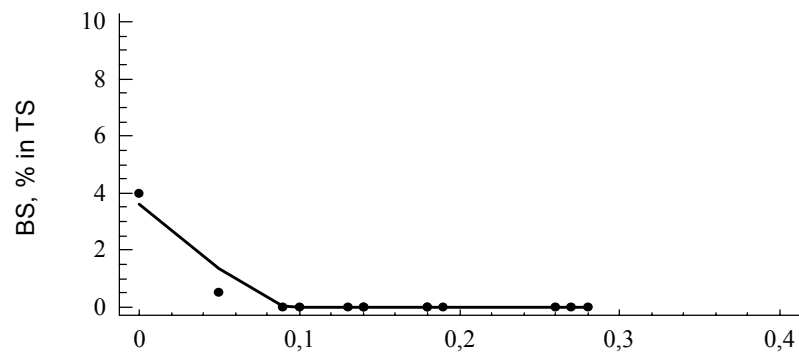


VK: 45 ... 59

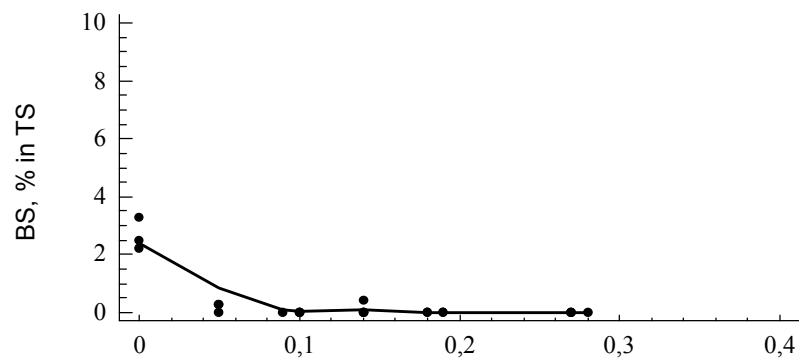
Nitratgehalt, % NO₃-N in TS

* VK = TS (%) + 8Z/PK

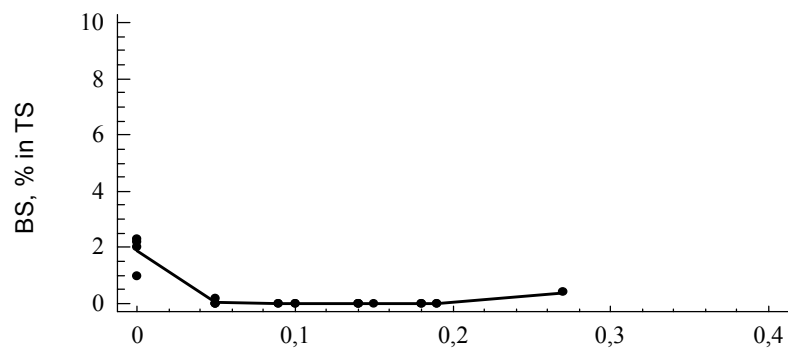
Abbildung 3: Buttersäuregehalt von Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes(Versuch GV 1)

VK^(*):35 ... <40

VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59

Nitratgehalt, % NO₃- N in TS

* VK = TS (%) + 8Z/PK

Abbildung 4: Buttersäuregehalt von Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes (Versuch GV 2)

Bei den Silagen aus kontaminiertem Ausgangsmaterial (Abb. 3, GV 1) liegen im unteren VK-Bereich in allen Nitratzusatzstufen hohe bis extrem hohe Buttersäuregehalte vor. Mit zunehmender Erhöhung der VK-Werte sind bei Fehlen von Nitrat im Grünfütter die Buttersäuregehalte zwar ebenfalls noch sehr hoch, gehen jedoch mit Anstieg des Nitratzusatzes stark zurück. Bemerkenswert ist, dass auch im Bereich der hohen Vergärbarkeitsstufen bei keiner Nitratdosis buttersäurefreie Silagen entstanden sind.

Im 2. Versuch mit kontaminiertem Ausgangsmaterial (GV 2, Abb. 4) entspricht der Kurvenverlauf für die Buttersäuregehalte in Abhängigkeit vom Nitratzusatz eher dem des unkontaminierten Ausgangsmaterials (s. Abb. 2). Es ist deshalb naheliegender anzunehmen, dass die zugesetzten Clostridien sporen hier wenig wirksam geworden sind.

Insgesamt ist aus den Ergebnissen dieser Versuche abzuleiten, dass bei Fehlen von Nitrat im Grünfütter in den Silagen Buttersäure auftritt, auch bei VK-Werten, bei denen das Grünfütter als leicht vergärbar gilt, und auch dann, wenn es im sauber geernteten Zustand einsiliert worden ist. Die Buttersäuregehalte sind um so höher, je niedriger die VK-Werte sind und je höher der Kontaminationsgrad mit Clostridien sporen ist. Bei Vorliegen von Nitrat im Grünfütter gehen die Buttersäuregehalte zurück. Buttersäurefreie Silagen konnten bei Nitratzusatz aber nur erreicht werden, wenn das Grünfütter sauber geerntet war. Bei kontaminiertem Ausgangsmaterial lag auch im sehr leicht vergärbaren Grünfütter und bei allen Nitratdosierungen Buttersäure vor.

In den Abbildungen 5 bis 7 sind zusammen mit den Buttersäuregehalten auch die Gehalte an Milchsäure und Essigsäure dargestellt. Die angegebenen Messpunkte stellen die Mittelwerte für die jeweilige Klasse dar.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, sind auch bei sauber geerntetem Grünfütter die Milchsäuregehalte der Silagen bei Fehlen von Nitrat im Ausgangsmaterial in allen VK-Klassen deutlich niedriger und die Buttersäuregehalte höher als bei Vorhandensein von Nitrat.

Die Zunahme der Milchsäuregehalte bei Nitratzusatz, verbunden mit einem Rückgang der Buttersäuregehalte, ist um so stärker, je niedriger die Vergärbarkeit nach VK ist.

Ab einem Nitratgehalt, von dem an die Buttersäuregehalte auf Null reduziert worden sind, ist kaum eine weitere Erhöhung der Milchsäuregehalte mehr zu verzeichnen. Zu beobachten ist, dass mit Zunahme der VK-Werte, die auf eine Erhöhung der TS-Gehalte im Grünfütter zurückzuführen sind, das Niveau der Milchsäuregehalte in allen Stufen des Nitratzusatzes zurückgeht.

Die Essigsäuregehalte der Silagen aus nitratfreiem Grünfütter sind unabhängig von den VK-Werten des Ausgangsmaterials sehr gering (unter 2 % in TS). Aus den niedrigen Essigsäuregehalten, trotz geringer Milchsäure – und relativ hoher Buttersäuregehalte – ist abzuleiten, dass die Essigsäurebildung in diesen Silagen weitgehend unabhängig vom Laktatabbau erfolgt ist.

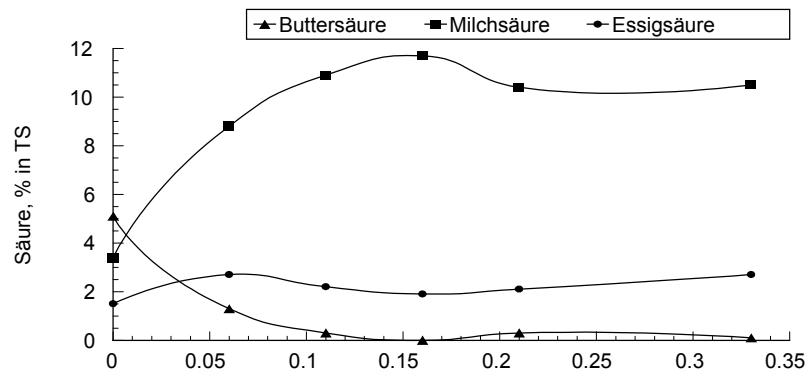
Bei Nitratzusatz waren demgegenüber die Essigsäuregehalte in der Tendenz erhöht, insbesondere dann, wenn weder Laktatabbau noch Buttersäurebildung vorgelegen haben.

Bei Kontamination des Ausgangsmaterials mit Clostridien sporen liegt ein völlig anderes Bild bezüglich der Gehalte an Gär säuren vor (Abb. 6). In der Klasse $VK < 35$ ist mit Ausnahme der NO_3-N -Stufe 0,1 % in keiner Silage Milchsäure enthalten, während die Buttersäuregehalte mit 7 % außerordentlich hoch sind. Nur bei 0,1 % NO_3-N liegt mit ca. 2,5 % ein vergleichsweise niedriger Buttersäuregehalt vor. Bei Zunahme der Vergärbarkeit nach VK ist bei nitratfreiem Ausgangsmaterial zunächst auch noch keine Milchsäure in den Silagen enthalten, bei Buttersäu-

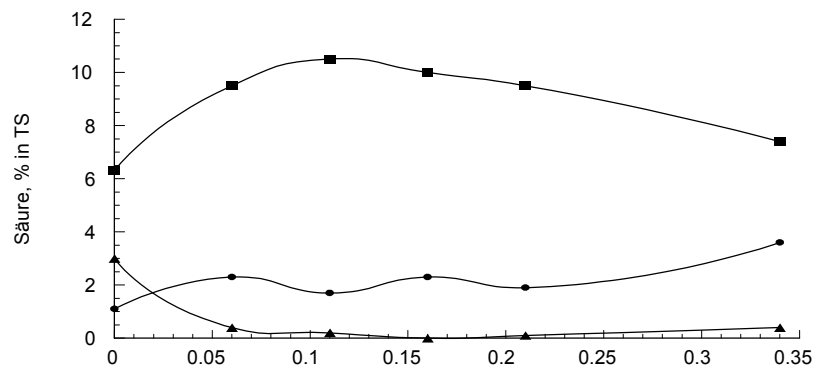
regehalten bis über 8 %. In den höheren Klassen der Vergärbarkeit liegen mit 2 bzw. 4 % Milchsäure aber auch bei Fehlen von Nitrat nennenswerte Milchsäuregehalte vor, während die BS-Gehalte mit 6 bzw. 2 % noch recht hoch sind. Bei Zusatz von Nitrat nehmen die Milchsäuregehalte der Silagen zu und gehen Laktatabbau und Buttersäuregehalte zurück, wenn auch keine buttersäurefreien Silagen entstehen.

Bei den Essigsäuregehalten liegen in allen VK-Klassen nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit vom Nitratgehalt vor. Das Niveau der Essigsäuregehalte ist in der VK-Klasse < 35 mit etwa 5 % in TS und den übrigen VK-Klassen mit etwa 4 % in TS jedoch höher als beim unkontaminierten Ausgangsmaterial, bei dem zu einem großen Teil buttersäurefreie Silagen entstanden waren.

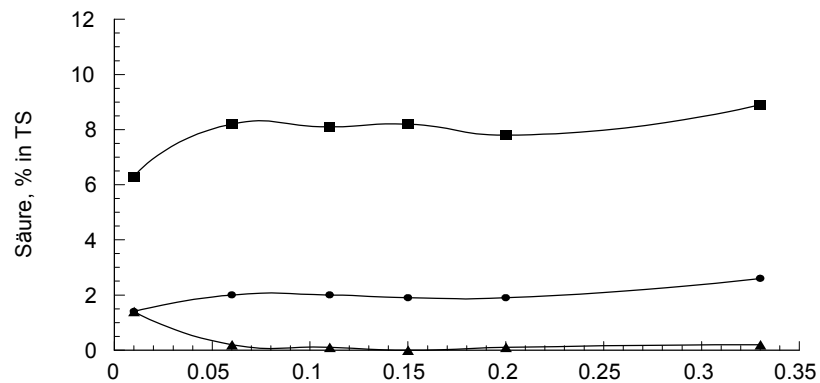
VK: < 35



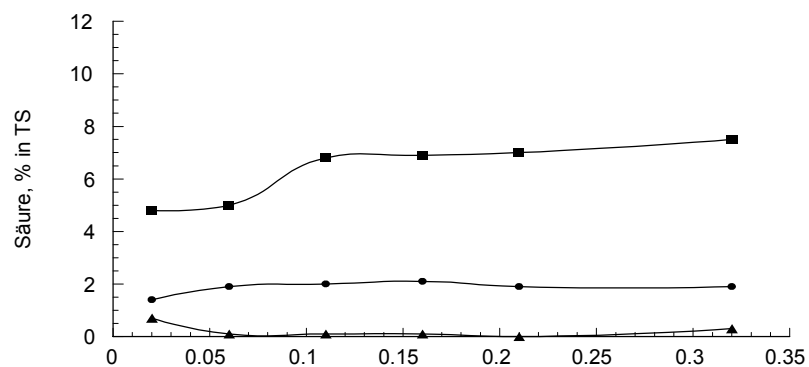
VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



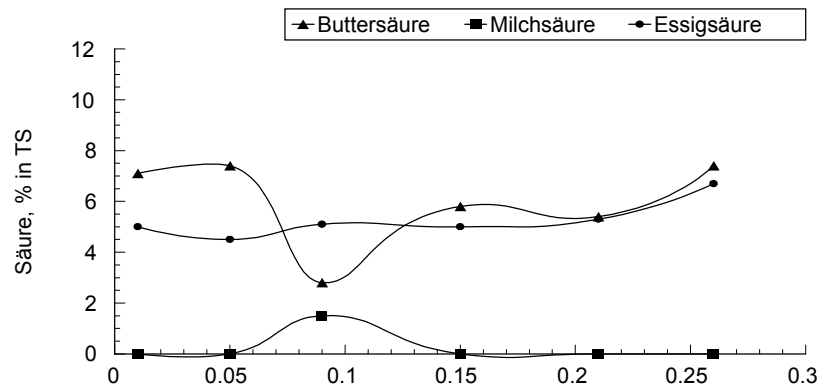
VK: 45 ... 59



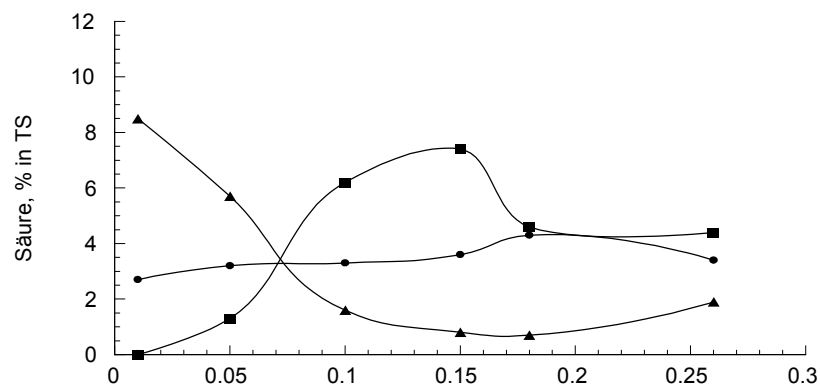
Nitratgehalt: % NO₃-N in TS

Abbildung 5: Gehalt an Milchsäure, Essigsäure und Buttersäure in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes (Versuch GV 1 und GV 2)

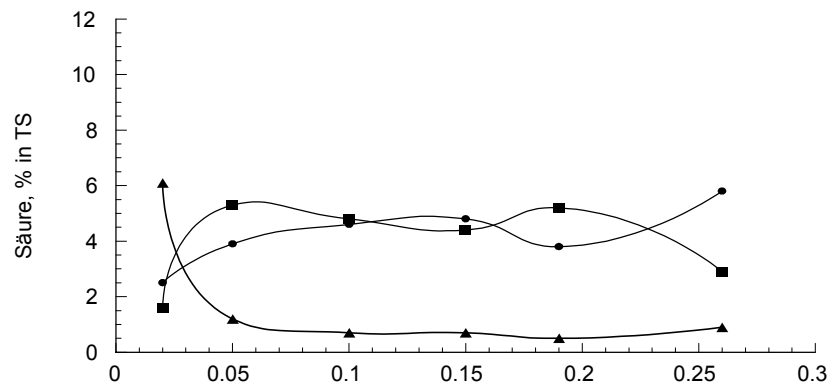
VK: < 35



VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59

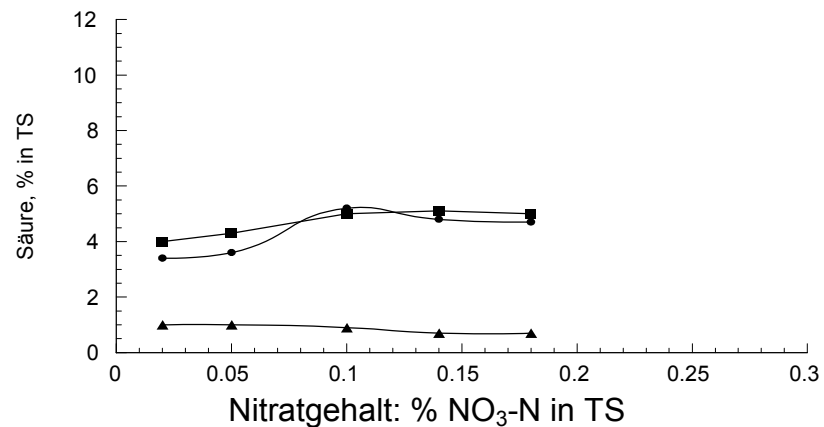
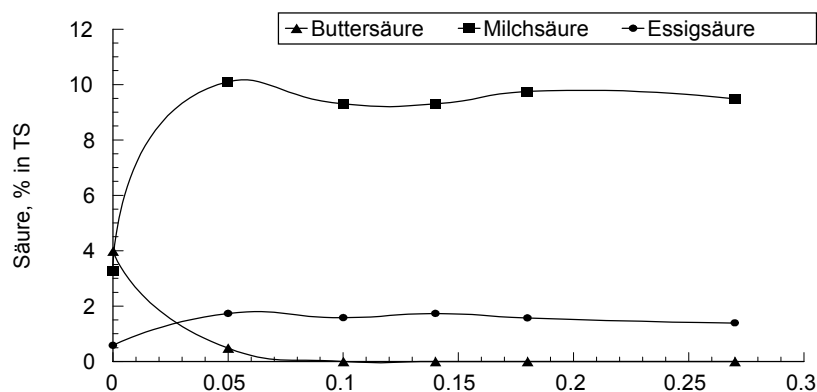
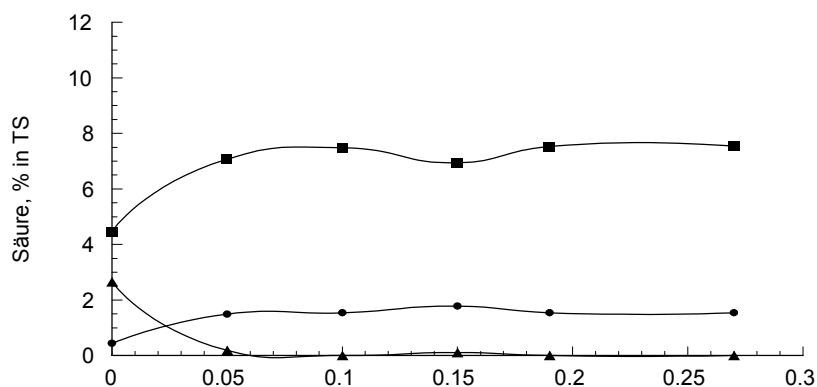


Abbildung 6: Gehalt an Milchsäure, Essigsäure und Buttersäure in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes (Versuch GV 1)

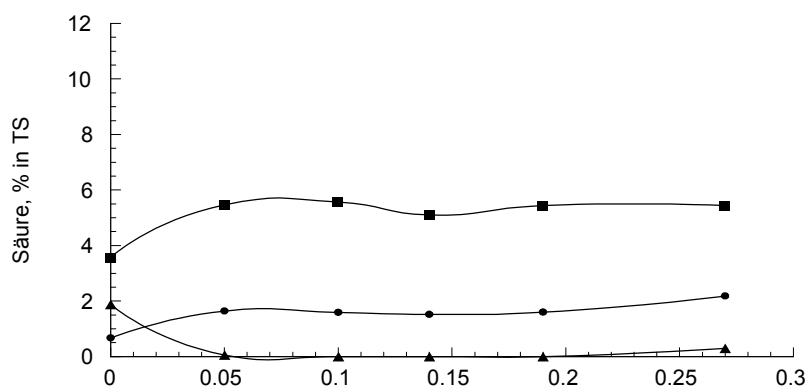
VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59



Nitratgehalt: % NO₃-N in TS

Abbildung 7: Gehalt an Milchsäure, Essigsäure und Buttersäure in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klassen des VK-Wertes (Versuch GV 2)

Wie aus Abbildung 7 abzulesen ist, sind beim Versuch GV 2 auch beim kontaminierten Ausgangsmaterial die Gehalte an Buttersäure und Milchsäure in Abhängigkeit von VK-Wert und Nitratgehalt in der Tendenz mit denen des unkontaminierten Grünfutters vergleichbar. Bei Nitratgehalten unterhalb von 0,05 % NO₃-N in TS liegt in allen VK-Klassen Buttersäure vor, wenn auch mit abnehmenden Gehalten bei Anstieg der VK-Werte. Die Milchsäuregehalte sind bei Fehlen von Nitrat auch hier, in Abhängigkeit von den VK-Werten, niedriger als in Gegenwart von Nitrat. Die Essigsäuregehalte sind unabhängig von VK-Klasse und Nitratgehalt mit unter 2 % in TS durchgehend niedrig. Bei Fehlen von Nitrat liegen Essigsäuregehalte weit unter 1 % in TS.

Insgesamt geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass nicht nur für die Unterbindung von Buttersäuregärung während der Silierung ein gewisser Gehalt an Nitrat erforderlich ist sondern auch für die Vermeidung von Laktatabbau. Dies trifft offensichtlich um so mehr zu, je niedriger die VK-Werte im Grünfutter und je höher der Belastungsgrad des Ausgangsmaterials mit Clostridiensporen ist.

Für die Essigsäuregehalte in den Silagen konnte keine eindeutige Beziehung zu den Merkmalen des Ausgangsmaterials festgestellt werden. Hier liegen zusätzlich zu den Kennzahlen des Ausgangsmaterials offensichtlich auch Beziehungen zum Laktatabbau und zur Buttersäuregärung vor.

Tabelle 23: Korrelation zwischen dem Essigsäuregehalt der Silagen und dem Gehalt an Trockensubstanz (TS), Nitrat sowie dem Z/PK-Quotienten des Grünfutters

Buttersäuregehalt (BS)	Partieller Korrelationskoeffizient bezogen auf den Essigsäuregehalt (% in TS)			
		TS-Gehalt	Z/PK- Quotient	Nitratgehalt
Silagen mit BS < 0,3 % in TS	r	- 0,23*	+ 0,29*	+0,08
	n	154	154	154
Silagen mit BS ≥ 0,3 % in TS	r	- 0,14	+ 0,16	+ 0,52**
	n	100	100	100

*; ** : signifikant bei $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$

In Tabelle 23 ist der Zusammenhang zwischen dem ES-Gehalt der Silagen und dem TS-Gehalt, dem Z/PK-Quotient und dem Nitratgehalt des Grünfutters anhand der partiellen Korrelationskoeffizienten zusammengestellt.

Daraus geht hervor, dass in buttersäurefreien Silagen keine oder nur eine sehr schwache Beziehung zwischen den Merkmalen des Ausgangsmaterials und dem Essigsäuregehalt vorgelegen hat. In buttersäurefreien Silagen bestand auch kein Zusammenhang zwischen dem Nitratgehalt des Ausgangsmaterials und dem Essigsäuregehalt der Silagen.

Demgegenüber wurde in buttersäurehaltigen Silagen eine schwach positive Korrelation zwischen dem Nitratgehalt des Grünfutters und dem Essigsäuregehalt der Silagen gefunden. Daraus dürfte die Schlussfolgerung abzuleiten sein, dass bei Zunahme der Nitratgehalte im Ausgangsmaterial erhöhte Essigsäuregehalte in den Silagen zu erwarten sind, allerdings nur dann, wenn es sich um anaerob instabile Silagen handelt.

4.1.2.2 Ammoniak und pH-Wert

In den Abbildungen 8 bis 10 sind der pH-Wert sowie der Gehalt an $\text{NH}_3\text{-N}$ in Gesamt-N ebenfalls nach Nitratgehalten und VK-Klassen zusammengestellt. Wie daran abzulesen ist, steht der Verlauf beider Kennzahlen offensichtlich mit den Gehalten an Gärsäuren in den Silagen im Zusammenhang.

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass das pH-Niveau der Silagen, zumindest soweit diese buttersäurefrei waren, nahezu unabhängig vom Nitratgehalt des Grünfutters annähernd gleich war. In den buttersäurehaltigen Silagen (nitratfreies Grünfutter) waren die pH-Werte im Vergleich dazu erhöht. In diesen Silagen lagen auch die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Anteile am Gesamt-N oberhalb von 10 %; in allen anderen Silagen, unabhängig vom Nitratgehalt des Ausgangsmaterials, weit darunter.

Beim mit Clostridiensporen kontaminierten Ausgangsmaterial (Abb. 9) finden der Laktatabbau und die hohen Buttersäuregehalte im VK-Bereich < 35 ihren Niederschlag in hohen pH-Werten und sehr hohen NH_3 -Gehalten, annähernd unabhängig vom Nitratgehalt des Ausgangsmaterials.

In den Klassen mit höheren VK-Werten (35 – 40) sind gleichsinnig zum Rückgang der Buttersäuregehalte und dem Anstieg der Milchsäuregehalte im unteren Nitratbereich die NH_3 -Gehalte sowie der pH-Wert rückläufig, um im Bereich der hohen Nitratgehalte (etwa ab 0,2 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) wieder anzusteigen.

In der VK-Klasse 40 – 45 sind gemäß dem Vorliegen von Buttersäure und niedriger Milchsäuregehalte im nitratfreien Ausgangsmaterial und der rückläufigen Milchsäuregehalte im Bereich hoher Nitratgehalte zunehmende NH_3 -Gehalte und pH-Werte zu verzeichnen.

Bei weiterem Anstieg der VK-Werte weisen gemäß den Gehalten an Gärsäuren (siehe Abb. 6) weder der pH-Wert noch der NH_3 -Gehalt besondere Unterschiede in Abhängigkeit vom Nitratgehalt des Grünfutters auf.

Beim mit Clostridiensporen kontaminierten Material des Versuches GV 2 (Abb. 10) sind auch bezüglich des pH-Wertes und der NH_3 -Gehalte die gleichen Tendenzen vorhanden, wie sie für das unkontaminierte Material beschrieben worden sind. Gleichbleibend niedrige NH_3 -Gehalte, unabhängig vom Nitratgehalt des Grünfutters und nahezu kein Einfluss des Nitrats auf die pH-Werte, mit Ausnahme des nitratfreien Materials in den unteren VK-Klassen.

Insgesamt ist demnach festzustellen, dass der Nitratgehalt des Grünfutters, indem er Auftreten und Verlauf der Buttersäuregärung beeinflusst, auch Auswirkungen auf die Gehalte an Ammoniak und den pH-Wert in der Silage hat.

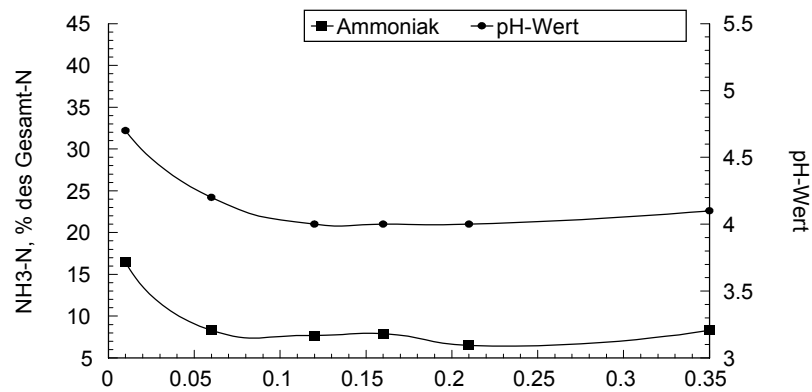
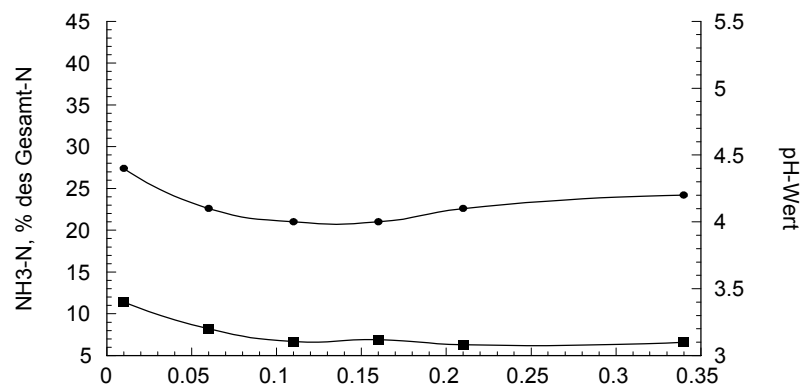
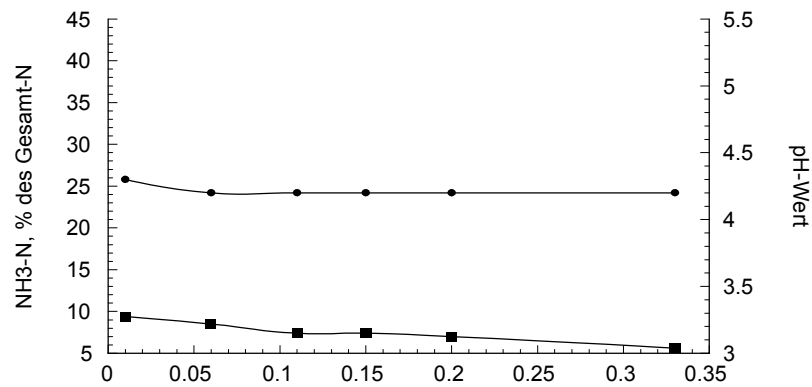
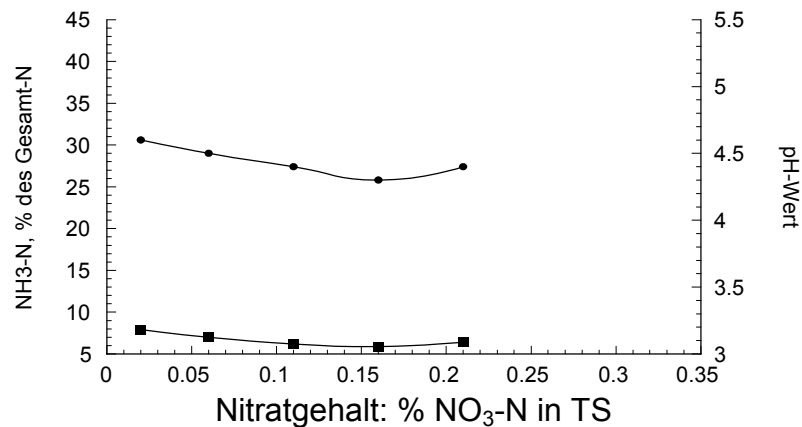
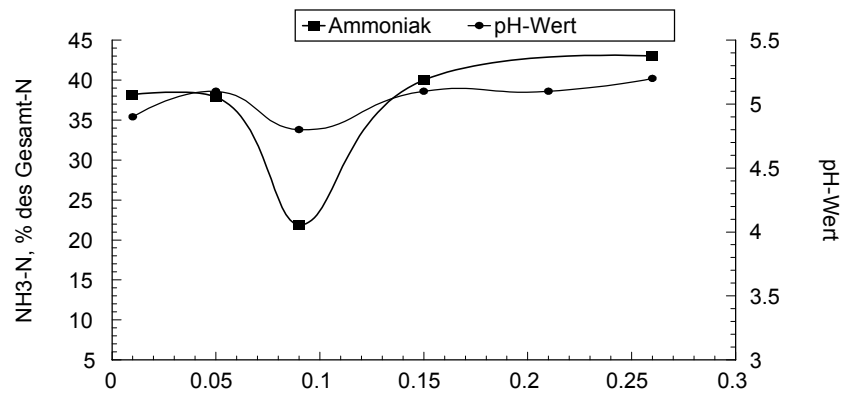
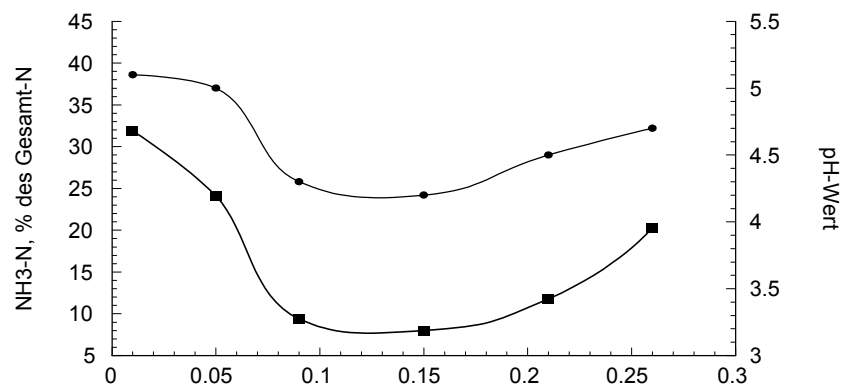
VK: < 35VK: 35...<40VK: 40 ... < 45VK: 45 ... 59

Abbildung 8: Ammoniakgehalt und pH-Wert in Silagen aus Knautgras ohne Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klasse des VK-Wertes (Versuch GV 1 und GV 2)

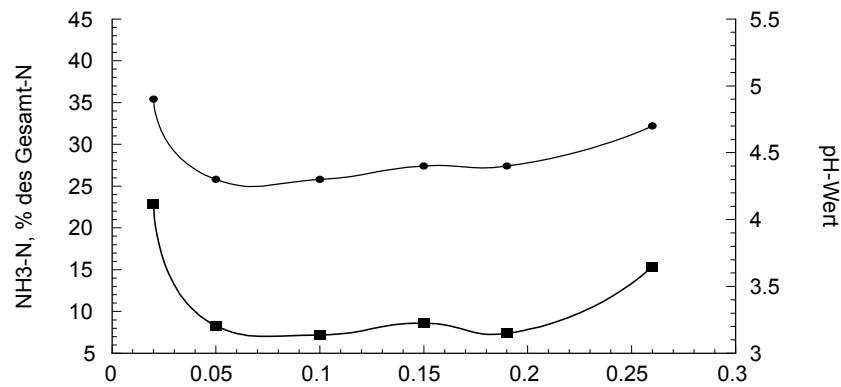
VK: < 35



VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59

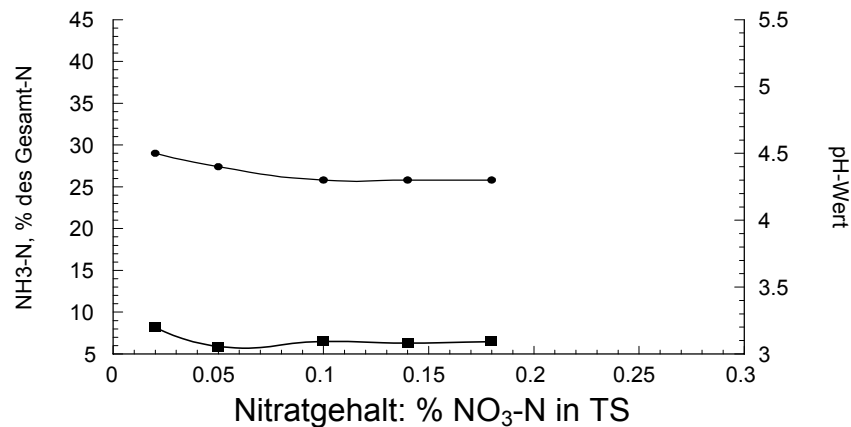
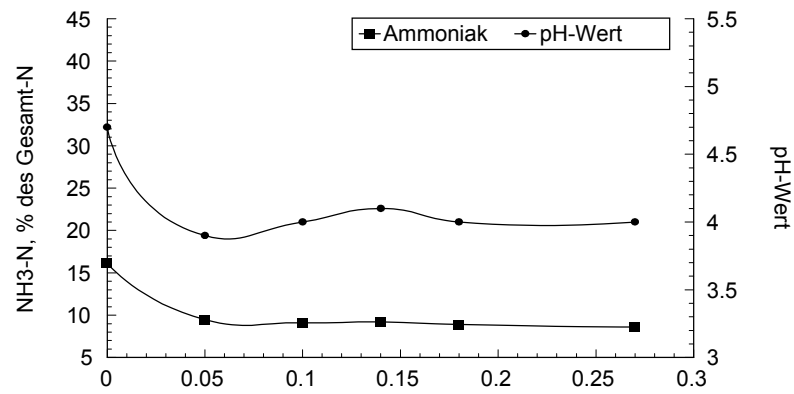
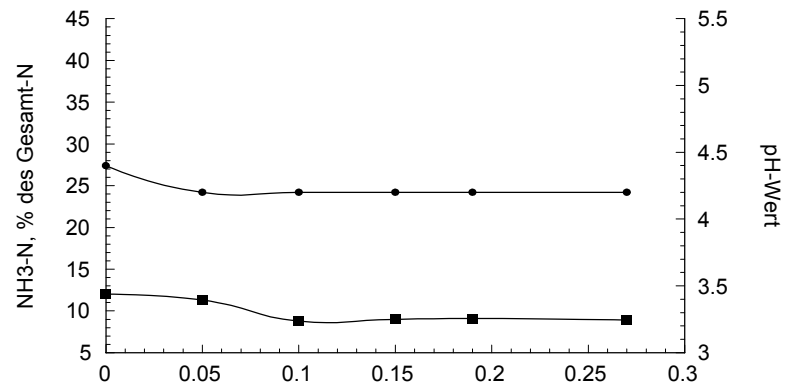


Abbildung 9: Ammoniakgehalt und pH-Wert in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klasse des VK-Wertes (Versuch GV 1)

VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59

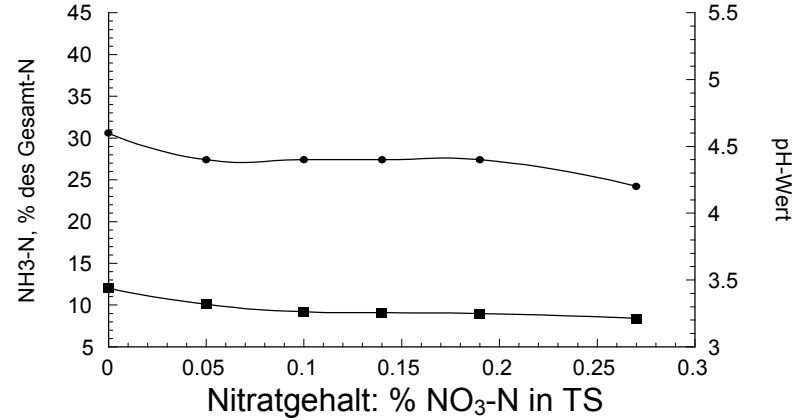


Abbildung 10: Ammoniakgehalt und pH-Wert in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz, nach Nitratgehalt und Klasse des VK-Wertes (Versuch GV 2)

4.1.3 Einfluss des Nitrats auf die Beziehungen zwischen den Gärparametern

Wie die vorangegangenen Ausführungen gezeigt haben, hat der Nitratgehalt des Grünfutters nicht nur Auswirkungen auf die Art und den Gehalt an Gärsäuren in den Silagen sondern auch auf die Bildung von Ammoniak und den pH-Wert, d.h. auf alle die Parameter, die zur Kennzeichnung der Gärqualität von Silagen derzeit herangezogen werden.

Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit durch das Nitrat auch die Beziehungen zwischen den Merkmalen der Gärqualität beeinflusst werden.

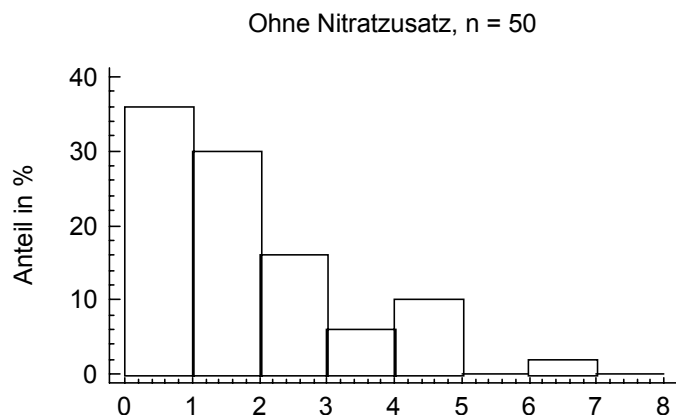
4.1.3.1 Buttersäure und Essigsäure

Wie aus Tabelle 23 abzulesen war, ist für buttersäurehaltige Silagen ein Zusammenhang zwischen dem Nitratgehalt des Ausgangsmaterials und dem Essigsäuregehalt der Silage statistisch nachweisbar. Um diesem Zusammenhang weiter nachgehen zu können, wurde zunächst die Verteilung der ES-Gehalte in den Silagen geprüft und zwar sowohl für nitratfreies als auch für nitrathaltiges Ausgangsmaterial. Bei nitrathaltigem Grünfutter erfolgte zusätzlich noch eine Aufteilung in die Klassen buttersäurefrei ($BS < 0,3 \%$ in TS) und buttersäurehaltig ($BS \geq 0,3 \%$ in TS). Da bei nitratfreiem Grünfutter fast alle Silagen buttersäurehaltig waren, konnte hierfür eine solche Aufteilung nach dem Auftreten von Buttersäure nicht vorgenommen werden.

In Abbildung 11 ist die Häufigkeitsverteilung der Silagen nach dem Essigsäuregehalt bei nitratfreiem Grünfutter dargestellt, im oberen Teil (11 a) für alle Silagen, im unteren (11 b) nur für die buttersäurehaltigen.

Daraus geht hervor, dass bei nitratfreiem Ausgangsmaterial reichlich 35 % der Silagen Essigsäuregehalte von max. 1 % in TS aufwiesen, weitere 30 % Gehalte von 1 - 2 % in TS. Insgesamt lagen bei etwa 80 % der Silagen Essigsäuregehalte von unter 3 % in TS vor. Das bedeutet, dass unabhängig von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient im Grünfutter (und unabhängig von den übrigen Merkmalen der Gärqualität) die ES-Gehalte des weitaus größten Teiles der Silagen sehr niedrig waren. Betrachtet man nur die buttersäurehaltigen Silagen (Abb. 11 b) so ist festzustellen, dass ebenfalls etwa zwei Drittel der Silagen Essigsäuregehalte von $\leq 2,0 \%$, ca. 80 % der Silagen Essigsäuregehalte von $\leq 3,0 \%$ in TS aufweisen.

a):



b):

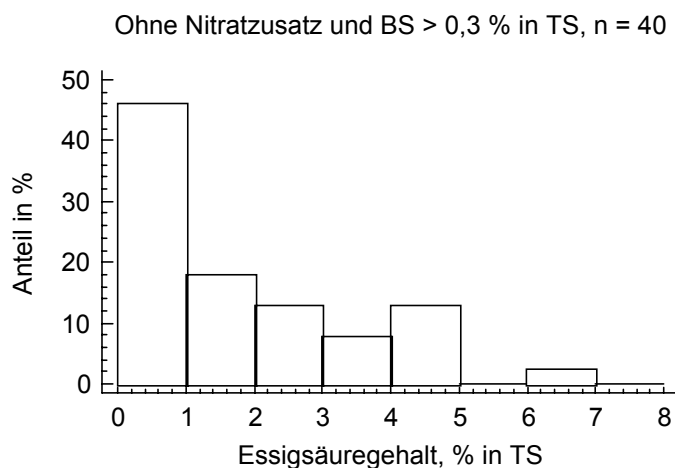
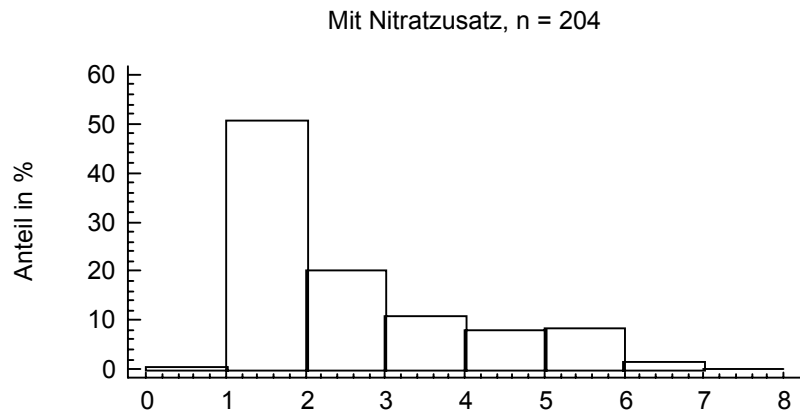


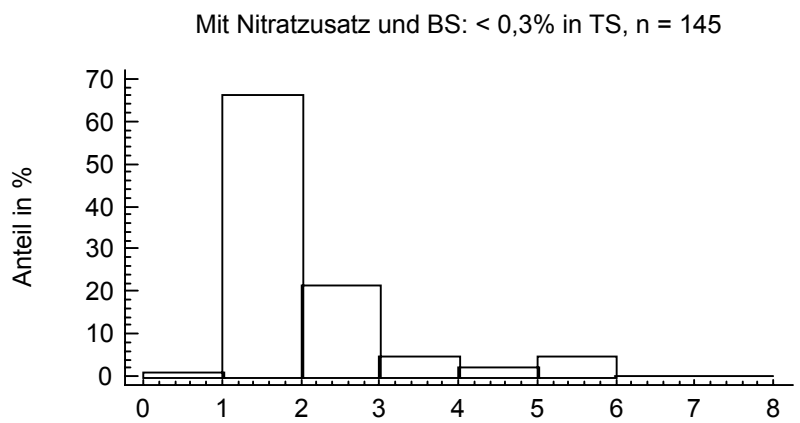
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der Silagen nach dem Essigsäuregehalt für nitratfreies Grünfutter

Zu beachten ist, dass durch den Zusatz an Stresskeimmaterial zum Grünfutter der Epiphytenbesatz des Ausgangsmaterials verändert wurde, wodurch vermutlich die Essigsäurebildung in den Silagen verstärkt wurde (s. Tab. 20). In der vorliegenden Auswertung konnte dieser Effekt jedoch nicht berücksichtigt werden.

a):



b):



c):

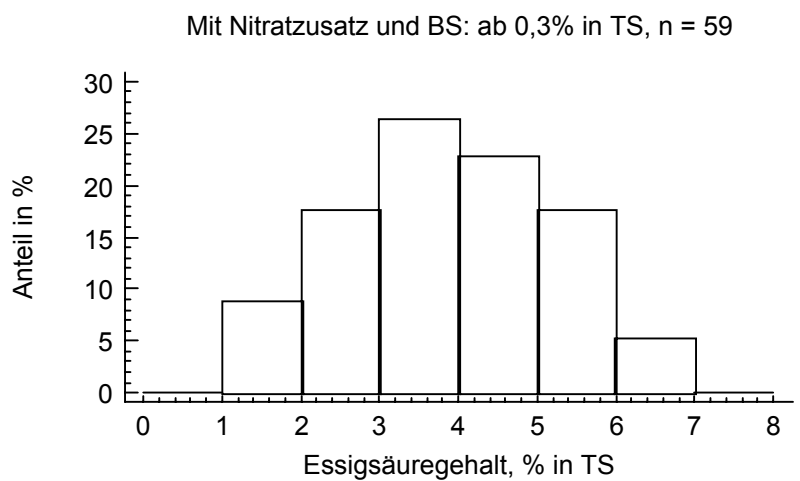


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der Silagen nach dem Essigsäuregehalt für nitrathaltiges Grünfutter

In Abbildung 12 wurde das Ergebnis der Häufigkeitsverteilung der Silagen nach den Essigsäuregehalten für nitrathaltiges Grünfutter dargestellt: für alle vorliegenden Silagen (Abb. 12 a), für buttersäurefreie (Abb. 12 b) und für buttersäurehaltige (Abb. 12 c).

Wie aus Abbildung 12 a ersichtlich ist, weist auch hier der größte Teil der Silagen nur geringe Essigsäuregehalte auf. Aus der Abbildung 12 b ist zu entnehmen, dass es sich dabei nahezu ausschließlich um buttersäurefreie Silagen gehandelt hat.

Etwa 90 % der buttersäurefreien Silagen hatten Essigsäuregehalte von $\leq 3,0$ % in TS. Höhere Essigsäuregehalte traten vor allem in den buttersäurehaltigen Silagen (Abb. 12 c) auf.

Aus den Ergebnissen zum Essigsäuregehalt ist insgesamt die Schlussfolgerung abzuleiten, dass bei nitratfreiem Grünfutter die Essigsäuregehalte der Silagen, ungeachtet des Auftretens von Buttersäure, sehr niedrig sind. Im Falle nitrathaltigen Grünfutters liegen niedrige ES-Gehalte nur in fehlgärungsfreien Silagen vor. Höhere Essigsäuregehalte in den Silagen treten vor allem bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial im Zusammenhang mit Fehlgärungen auf.

4.1.3.2 Buttersäure und Ammoniak

Als Ursache der Ammoniak(NH_3)-Bildung in Silagen gilt insbesondere die Aktivität proteolytischer Clostridien, durch die im Zusammenhang mit dem Aminosäureabbau Ammoniak freigesetzt wird. Im Allgemeinen wird deshalb der NH_3 -Gehalt in den Silagen als Ausdruck von Protein- bzw. Aminosäurenabbau gewertet. Eine Beziehung zum Buttersäuregehalt besteht insofern, als beim Aminosäurenabbau flüchtige Fettsäuren entstehen ($\geq \text{C}_4$ -Atome), die der Fraktion "Buttersäure" zuzuordnen sind.

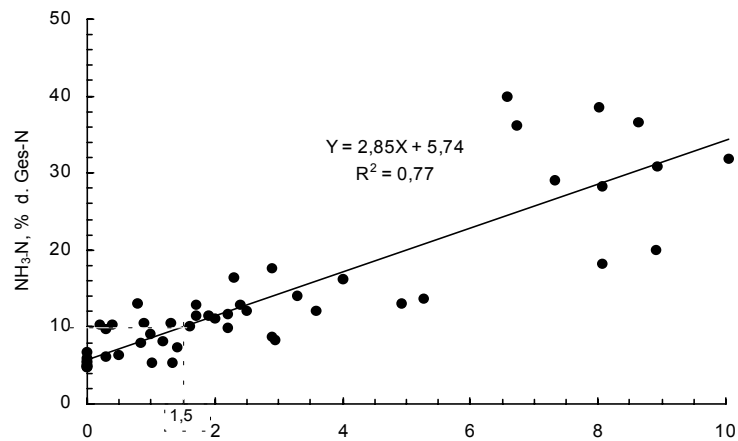
Zum anderen ist bekannt, dass Ammoniak durch Reduktion aus dem Nitrat entsteht, insbesondere im Zusammenhang mit dem Laktatabbau, wodurch es im weiteren Gärungsverlauf ebenfalls zur Buttersäurebildung kommen kann.

Im Folgenden soll zunächst geprüft werden, inwieweit der Nitratgehalt des Ausgangsmaterials Einfluss auf die Beziehung zwischen den Gehalten an Buttersäure und Ammoniak in der Silage hat und ob eine Abgrenzung der NH_3 -Bildung aus Nitratreduktion und Aminosäurenabbau vorgenommen werden kann.

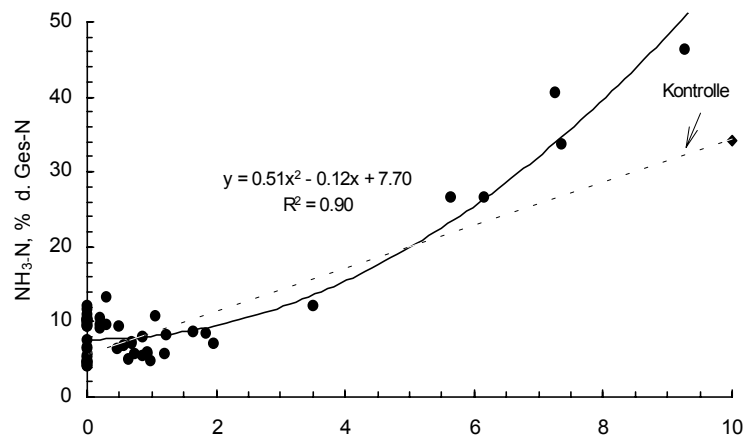
In Abbildung 13 ist der Zusammenhang zwischen den Gehalten an Buttersäure und Ammoniak in der Silage unter Berücksichtigung des Nitratgehaltes im Grünfutter dargestellt.

Wie daraus ersichtlich ist, sind bei nitratfreiem Material die NH_3 -Gehalte in buttersäurefreien Silagen mit ca. 6 % NH_3 -N in Gesamt-N gering. Hierbei dürfte es sich weder um eine NH_3 -Bildung aus dem Proteinabbau noch aus der Nitratreduktion handeln. Es ist eher anzunehmen, dass es sich hierbei um eine NH_3 -Bildung aus leicht abbaubaren stickstoffhaltigen Verbindungen des Pflanzenmaterials handelt. Sofern Buttersäure in den Silagen vorliegt, ist eine relativ enge Beziehung zum Ammoniakgehalt gegeben, die als Hinweis auf eine NH_3 -Bildung aus dem Proteinabbau zu werten sein dürfte. Allerdings ist festzustellen, dass bis zu einem BS-Gehalt von etwa 1,5 % in TS und einem NH_3 -N-Anteil am Gesamt-N von etwa 10 % noch keine gerichtete Beziehung zwischen Buttersäure- und Ammoniakgehalt erkennbar ist. Es ist naheliegend anzunehmen, dass im Bereich geringer Buttersäuregehalte (noch kein Aminosäureabbau) auch freie Aminosäuren und andere N-haltige Verbindungen eine Quelle für die NH_3 -Bildung darstellen.

a) ohne Nitrat
(Kontrolle)



b) mit 0,05 - 0,10 %
NO₃-N in TS
(entpr. 2,3 - 6,0 %
NO₃-N d. Ges.-N)



c) mit > 0,1 - 0,3 %
NO₃-N in TS
(entpr. > 6 - 14 %
NO₃-N d. Ges.-N)

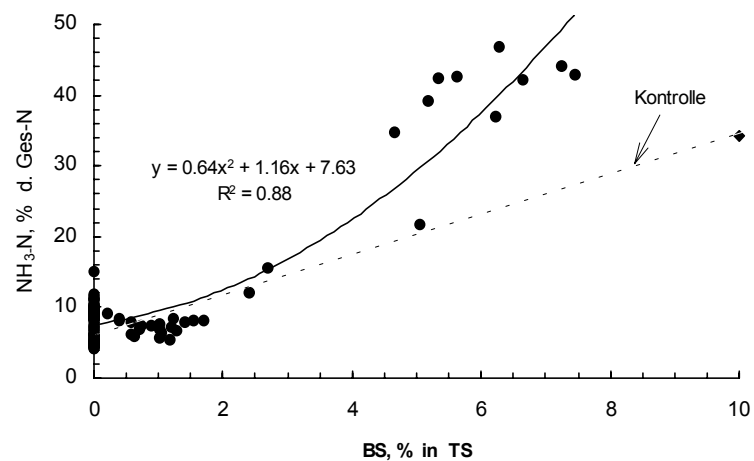


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen dem Buttersäure(BS)- und Ammoniakgehalt in Silagen; unter Berücksichtigung des Nitratgehaltes im Grünfütter

Bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial waren die NH_3 -Gehalte in den buttersäurefreien Silagen ebenfalls gering, wenn auch in der Tendenz etwas höher als bei nitratfreiem Material. Jedoch hatte das Nitrat im geprüften Bereich keinen nachweisbaren Einfluss auf den NH_3 -Gehalt, wenn keine Buttersäure in den Silagen vorhanden war.

Auffallend ist, dass sowohl bei nitratfreiem Grünfutter als auch bei nitrathaltigem Material eine gerichtete Zunahme der Ammoniakgehalte, die mit dem Aminosäureabbau in Zusammenhang gebracht werden kann, erst ab einem Buttersäuregehalt von über 1,5 oder 2,0 % in TS nachweisbar ist.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei nitratfreiem Material ist daraus die Schlussfolgerung abzuleiten, dass bei BS-Gehalten bis etwa 2 % der NH_3 -Gehalt nicht ohne weiteres dem Protein- bzw. Aminosäureabbau zuzuordnen ist. Erst bei BS-Gehalten oberhalb von 2 % kann der NH_3 -Gehalt auf den Aminosäureabbau zurückgeführt werden. Dabei ist aber zu beachten, dass auch bei BS-Gehalten über 2 % nicht direkt aus dem NH_3 -Gehalt auf die Höhe der Buttersäuregehalte geschlossen werden kann.

Wie aus den Angaben weiter hervorgeht, ist der Anstieg der NH_3 -Gehalte im Zusammenhang mit der Zunahme der BS-Gehalte um so größer, je höher der Nitratgehalt des Grünfutters war. Bei geringen Nitratgehalten des Grünfutters lagen bei 5 % Buttersäure etwa 20 % NH_3 -N im Gesamt-N vor. Bei höherem Nitratgehalt des Grünfutters traten Messwerte bis etwa 40 % NH_3 -N am Gesamt-N auf.

Insgesamt ist aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung abzuleiten, dass aus der Höhe des NH_3 -Gehaltes nicht direkt auf das Ausmaß des Proteinabbaus geschlossen werden kann. Erst bei BS-Gehalten von 2 % und darüber kann davon ausgegangen werden, dass Protein- bzw. Aminosäureabbau vorliegt. Aber auch in diesem Bereich besteht kein direkter Zusammenhang zwischen NH_3 -Gehalt und Ausmaß des Aminosäureabbaus, da in Abhängigkeit vom Nitratgehalt des Ausgangsmaterials ein erheblicher Teil des NH_3 -Gehaltes aus dem Nitratabbau resultiert.

4.1.3.3 Buttersäure und pH-Wert

Eine Beziehung zwischen dem Buttersäuregehalt und dem pH-Wert der Silagen ist zunächst aufgrund der Aziditätsabhängigkeit der Clostridienentwicklung, die Buttersäurebildung zur Folge hat, zu erwarten. Da das im Grünfutter enthaltene Nitrat, zumindest im Falle buttersäurehaltiger Silagen, direkt den NH_3 -Gehalt und damit die Pufferwirkung im Gärsubstrat beeinflusst, ist auch mit einem Einfluss des Nitrats auf die Beziehung zwischen Buttersäuregehalt und pH-Wert zu rechnen.

In Tabelle 24 wird der Zusammenhang zwischen pH-Wert und Buttersäuregehalt der Silagen anhand statistischer Kennzahlen dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, wurde der Zusammenhang zwischen pH-Wert und Buttersäuregehalt sowohl vom TS-Gehalt als auch von der Anwesenheit des Nitrats im Grünfutter beeinflusst. Im unteren TS-Bereich lag zwischen beiden Merkmalen eine enge positive Korrelation vor. 80 – 94 % der Gesamtvarianz des Buttersäuregehaltes war demnach auf Unterschiede im pH-Wert zurückzuführen. In dieser Beziehung drückt sich jedoch nicht nur die Abhängigkeit der Buttersäurebildung vom Grad der Azidität aus, sondern zugleich auch die Abhängigkeit des pH-Wertes vom Ausmaß des

vorhandenen Buttersäuregehaltes. In den beiden oberen TS-Stufen (30 – 40 %) waren die BS-Gehalte infolge der verminderten Wasseraktivität stark eingeschränkt, wodurch auch die Variationsbreite der beiden geprüften Merkmale sehr gering war.

Tabelle 24: Ergebnis der Korrelations- und Regressionsanalyse zur Beziehung zwischen pH-Wert und Buttersäure(BS)-Gehalt in Silagen

TS-Gehalt (%)	Nitrat- zusatz	n	Korrelation		Regressionsgleichung Y: BS (% in TS) X: pH-Wert	Variationsbreite der ermittelten pH- Werte von ... bis
			r	Sign.		
13,2 ± 0,4	ohne	6	0,96	**	Y = -23,62 + 6,25X	3,8 ... 5,0
	mit	29	0,89	**	Y = -17,53 + 4,54X	3,7 ... 5,2
18,9 ± 1,7	ohne	10	0,97	**	Y = -32,03 + 7,96X	4,0 ... 5,2
	mit	53	0,93	**	Y = -18,76 + 4,68X	3,9 ... 5,4
23,9 ± 1,7	ohne	10	0,97	**	Y = -29,49 + 7,30X	4,3 ... 5,2
	mit	55	0,42	**	Y = -7,06 + 1,70X	4,1 ... 4,6
29,6 ± 1,6	ohne	12	0,35	n.s.	n.a.	4,2 ... 4,5
	mit	47	-0,07	n.s.	n.a.	4,2 ... 4,6
40,2 ± 0,6	ohne	12	-0,10	n.s.	n.a.	4,3 ... 4,9
	mit	47	-0,27	n.s.	n.a.	4,4 ... 4,9

** : signifikant mit $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant; n.a.: nicht abgeleitet, weil keine signifikante Beziehung nachweisbar ist.

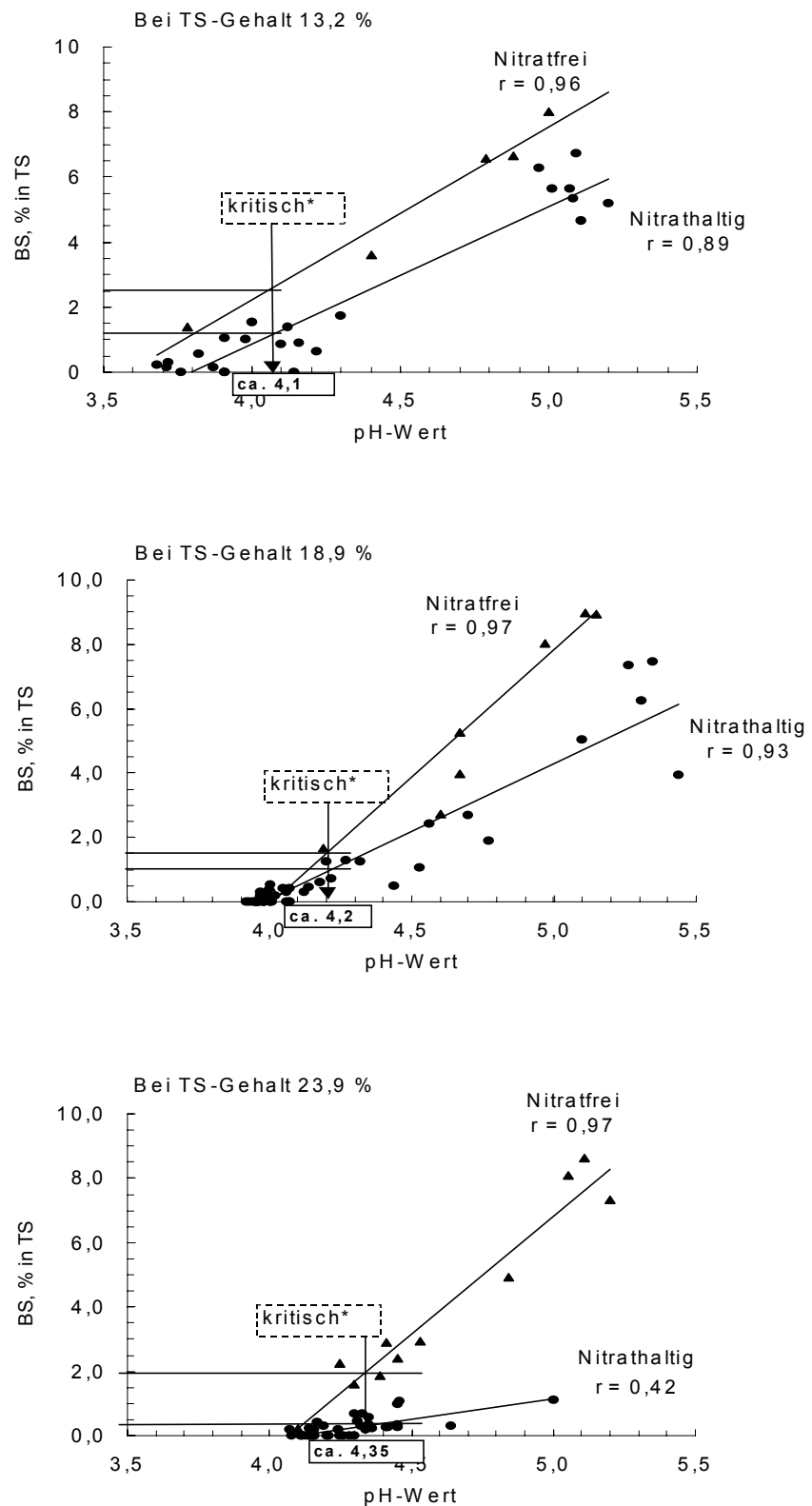
Eine signifikante Beziehung zwischen Buttersäuregehalt und pH-Wert der Silage konnte deshalb in diesem Bereich nicht nachgewiesen werden.

Um die Wirkung des Nitrats auf den Zusammenhang zwischen Buttersäuregehalt und pH-Wert der Silagen veranschaulichen zu können, werden die in Tabelle 24 angegebenen Regressionsgleichungen in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

Daraus geht hervor, dass in jeder TS-Stufe, in der eine signifikante Beziehung zwischen beiden Merkmalen vorgelegen hatte, die Zunahme des Buttersäuregehaltes bei Anstieg des pH-Wertes bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial geringer war als bei Fehlen von Nitrat. Darin drückt sich nicht nur die stärkere Pufferwirkung durch den Nitratzusatz aus. Diese Erscheinung bringt vor allem zum Ausdruck, dass bei einem gegebenen pH-Wert in Gegenwart von Nitrat eine stärkere Hemmwirkung auf die Buttersäuregärung vorliegt als bei Fehlen von Nitrat.

Nach WEIßBACH (1968) sowie WEIßBACH und HONIG (1996) werden für TS-Gehalte von 15, 20 und 25 % pH-Werte von 4,1, 4,2 und 4,35 als ausreichend (kritisch) angesehen, um BS-Gärung bei der Silierung auszuschließen.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, konnte in den beiden oberen TS-Stufen (18,9 und 23,9 %) mit dem bisher als "kritisch" angesehenen Säuregrad ein Buttersäuregehalt von annähernd Null erreicht werden, wenn Nitrat im Ausgangsmaterial vorhanden war.



¹⁾ Kritischer pH-Wert nach Weißbach (1968)

Abbildung 14: Einfluss des Nitrates im Grünfütter auf die Beziehung zwischen Buttersäuregehalt und pH-Wert in Silagen; unter Berücksichtigung des TS-Gehaltes

Bei nitratfreiem Material wurden bei diesen pH-Werten aber noch Buttersäuregehalte von etwa 2,0 % nachgewiesen. Demnach liegt bei Fehlen von Nitrat im Ausgangsmaterial der kritische pH-Wert zur Unterbindung von Buttersäuregärung niedriger als bei Vorhandensein von Nitrat. Das bedeutet, dass zusätzlich zum Aziditätsgrad die inhibitorische Wirkung des Nitrats zur Unterbindung von Clostridienaktivität in der Silage erforderlich ist. Ob und wie weit bei Fehlen von Nitrat im Gärsubstrat Clostridienaktivität allein durch Absenkung des pH-Wertes unterbunden werden kann, ist aus diesen Ergebnisse noch nicht abzuleiten.

4.1.4 Einfluss des Nitrats auf den Gehalt an Clostridien sporen in der Silage

In Tabelle 25 und 26 ist der Gehalt an Clostridien sporen in der Silage in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Parametern der Vergärbarkeit des Ausgangsmaterials für Versuch GV 1 dargestellt. Dabei sind die buttersäurehaltigen Silagen durch blaue Zahlen gekennzeichnet (siehe auch Tabelle 3 und 4).

In dem Versuch ohne Stresskeimzusatz (Tab. 25) zum Grünfutter sind nachweisbare Gehalte an Clostridien sporen nur bei nitratfreiem Ausgangsmaterial sowie bei geringen Nitratzusätzen aufgetreten. Auffallend ist jedoch, dass trotz z.T. hoher Buttersäuregehalte nur sehr geringe Sporengehalte vorgelegen haben. Dies betrifft die Silagen mit niedrigen und mittleren VK-Werten im Bereich niedriger TS-Gehalte. Bei den beiden oberen TS-Stufen mit VK-Werten ≥ 42 waren auch bei nitratfreiem Ausgangsmaterial keine Sporen nachweisbar. Es handelte sich hier auch um buttersäurefreie Silagen.

Bei Zusatz von Stresskeimmateriale (Tab. 26) sind die wenigen buttersäurefreien Silagen sowie die Silagen der höheren TS-Stufen ab ca. 30 %, trotz Vorliegens von Buttersäure, nahezu sporenfrei. Hohe Sporengehalte liegen insbesondere bei nitratfreiem Ausgangsmaterial vor, vor allem im Bereich der niedrigen TS-Gehalte. Bemerkenswert ist, dass innerhalb der Zeilen, d.h. bei Nitratzusatz, die Sporengehalte zurückgehen, trotz z.T. hoher Buttersäuregehalte in den Silagen. In der Tendenz ist eine Abnahme der Sporengehalte in den Silagen sowohl bei Nitratzusatz als auch bei Erhöhung der VK-Werte des Ausgangsmaterials festzustellen. Ob dieser Einfluss der VK-Werte auf den Sporengehalt eher mit dem Z/PK-Quotienten oder mehr mit dem TS-Gehalt im Zusammenhang steht, ist aufgrund der Variation der Sporengehalte hieran nicht festzustellen.

Die Ergebnisse für den Versuch GV 2 sind in den Tabellen 27 und 28 zusammengestellt (siehe auch Tab. 13 und 14).

Beim Ausgangsmaterial ohne Stresskeimzusatz (Tab. 27) sind auch hier im wesentlichen nur beim nitratfreien Material Sporen nachweisbar gewesen. Es fällt jedoch auf, dass trotz wesentlich niedrigerer Buttersäuregehalte in diesem Versuch in vergleichbaren VK-Klassen höhere Sporengehalte vorgelegen haben als in Versuch GV1. Bemerkenswert ist auch, dass in den höheren VK-Klassen, bei denen bei GV 1 nahezu keine Sporen vorhanden waren, hier z.T. mittlere Gehalte aufgetreten sind.

Auch beim Versuch mit Stresskeimzusatz (Tab. 28) liegen im Bereich hoher VK-Werte, trotz relativ niedriger Buttersäuregehalte, hohe Sporengehalte vor, die allerdings auch schon bei geringem Nitratzusatz stark vermindert sind.

Tabelle 25: Gehalt an Clostridiensporen (MPN /g FM) in Silagen aus Knaulgrasohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,02	0,06	0,12	0,17	0,23	0,34
12,8	1,9	28,0	1,2x10 ²	18	n.n.	n.n.	n.n.	35
	2,5	32,8	n.n.	n.n.	n.n.	60	n.n.	n.n.
	3,1	37,6	n.n.	n.n.	15	n.n.	n.n.	n.n.
17,1	1,9	32,3	1,8x10 ²	20	20	n.n.	15	15
	2,5	37,1	15	20	n.n.	20	20	n.n.
	3,1	41,9	n.n.	2,4x10 ²	20	n.n.	15	30
22,1	1,8	36,5	5,7x10 ²	1,2x10 ²	n.n.	15	n.n.	n.n.
	2,3	40,5	1,5x10 ³	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2,9	45,3	1,6x10 ²	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
27,8	1,8	42,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2,3	46,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2,9	51,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
39,2	1,5	51,2	n.n.	n.n.				
	2,0	55,2	n.n.	n.n.				
	2,5	59,2	n.n.	n.n.				

* Die schattierten Felder kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen; n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 26: Gehalt an Clostridiensporen (MPN /g FM) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 1

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,01	0,05	0,10	0,14	0,18	0,27
13,5	1,9	28,7	1,2x10 ⁴	1,3x10 ³	4,5x10 ²	4,1x10 ³	1,3x10 ²	6,7x10 ²
	2,5	33,5	1,8x10 ⁵	7,0x10 ²	80	1,0x10 ²	1,7x10 ²	1,0x10 ²
	3,1	38,3	1,8x10 ⁵	1,5x10 ²	60	70	90	n.n.
17,8	1,9	33,0	1,5x10 ⁵	3,7x10 ²	5,0x10 ²	2,0x10 ²	2,0x10 ²	4,3x10 ²
	2,5	37,8	3,5x10 ⁴	1,1x10 ³	28	20	20	2,6x10 ²
	3,1	42,6	5,2x10 ³	30	1,5x10 ²	35	45	10
22,8	1,8	37,2	7,8x10 ⁴	1,4x10 ⁵	3,2x10 ²	n.n.	30	n.n.
	2,3	41,2	1,1x10 ⁵	75	n.n.	95	35	n.n.
	2,9	46,0	6,6x10 ⁴	1,2x10 ²	45	n.n.	n.n.	15
28,3	1,8	42,7	90	n.n.	n.n.	15	20	
	2,3	46,7	65	n.n.	20	n.n.	n.n.	
	2,9	51,5	20	80	n.n.	n.n.	n.n.	
39,5	1,5	51,5	40	70				
	2,0	55,5	15	n.n.				
	2,5	59,5	n.n.	n.n.				

* Die schattierten Felder kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen; n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 27: Gehalt an Clostridiensporen (MPN/g FM) in Silagen aus Knaulgras ohne Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30
20,8	1,6	33,6	1,6x10 ³	n.n. ¹⁾	n.n.	n.n.	n.n.	
	1,9	36,0	90	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
	2,4	40,0	15	n.n.	40	n.n.	n.n.	
25,8	1,5	37,8	1,1x10 ³	n.n.	20	15	n.n.	
	1,8	40,2	1,9x10 ²	n.n.	20	n.n.	20	
	2,3	44,2	70	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
31,2	1,4	42,4	2,4x10 ⁴	15	n.n.	n.n.	1,0x10 ²	
	1,7	44,8	n.n.	40	n.n.	60	20	
	2,2	48,8	1,6x10 ²	-	-	-	-	
40,6	1,5	52,6	4,0x10 ³	n.n.				
	1,8	55,0	80	n.n.				
	2,3	59,0	n.n.	n.n.				

* Die schattierten Felder kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen; n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 28: Gehalt an Clostridiensporen (MPN /g FM) in Silagen aus Knaulgras mit Stresskeimzusatz in Abhängigkeit von Nitratgehalt und den Merkmalen der Vergärbarkeit, Versuch GV 2

TS-Gehalt %	Z/PK	VK	Nitratgehalt: % NO ₃ -N in TS					
			0,00	0,05	0,10	0,14	0,19	0,27
20,8	1,6	33,6	-	-	-	n.n.	20	20
	1,9	36,0	-	-	-	n.n.	n.n.	n.n.
	2,4	40,0	5,4x10 ⁴	n.n.	n.n.	n.n.	20	15
25,8	1,5	37,8	-	-	n.n.	n.n.	n.n.	20
	1,8	40,2	-	-	50	n.n.	n.n.	20
	2,3	44,2	4,7x10 ²	40	n.n.	n.n.	n.n.	40
31,2	1,4	42,4	5,6x10 ⁴	2,1x10 ²	1,5x10 ²	n.n.	n.n.	1,3x10 ²
	1,7	44,8	1,5x10 ⁵	40	60	40	70	90
	2,2	48,8	40	1,8x10 ²	70	n.n.	1,6x10 ²	1,6x10 ³
40,6	1,5	52,6	1,4x10 ⁵	1,0x10 ²	1,6x10 ²	n.n.	60	
	1,8	55,0	1,4x10 ⁵	1,5x10 ³	30	50	70	
	2,3	59,0	1,1x10 ³	1,9x10 ³	1,5x10 ²	20	n.n.	

* Die schattierten Felder kennzeichnen buttersäurehaltige Silagen
- : nicht angesetzt wegen Mangels an Material

Insgesamt ist für beide Versuche festzustellen, dass hohe Sporengehalte vor allem in buttersäurehaltigen Silagen aufgetreten sind und insbesondere dann, wenn das Ausgangsmaterial nitratfrei war oder nur geringe Nitratgehalte aufwies. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Buttersäuregehalte und dem Sporengehalt war jedoch nicht erkennbar. Bei Nitratzusatz war in beiden Versuchen ein Rückgang der Sporengehalte festzustellen. Zum Einfluss der VK-Werte

auf den Sporengelalt sind aus diesen Darstellungen noch keine Schlussfolgerungen abzuleiten.

In Abbildung 15 ist für beide Versuche zusammengefasst der Zusammenhang zwischen BS-Gehalt und Sporengelalt der Silagen sowohl für nitratfreies als auch für nitrathaltiges Ausgangsmaterial dargestellt. Daran ist erkennbar, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des BS-Gehaltes und der Sporenbelastung der Silagen in beiden Fällen nicht besteht. Bei Silagen aus nitratfreiem Ausgangsmaterial sind die Sporengelalte bei vergleichbaren BS-Gehalten aber in der Tendenz wesentlich höher als bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial.

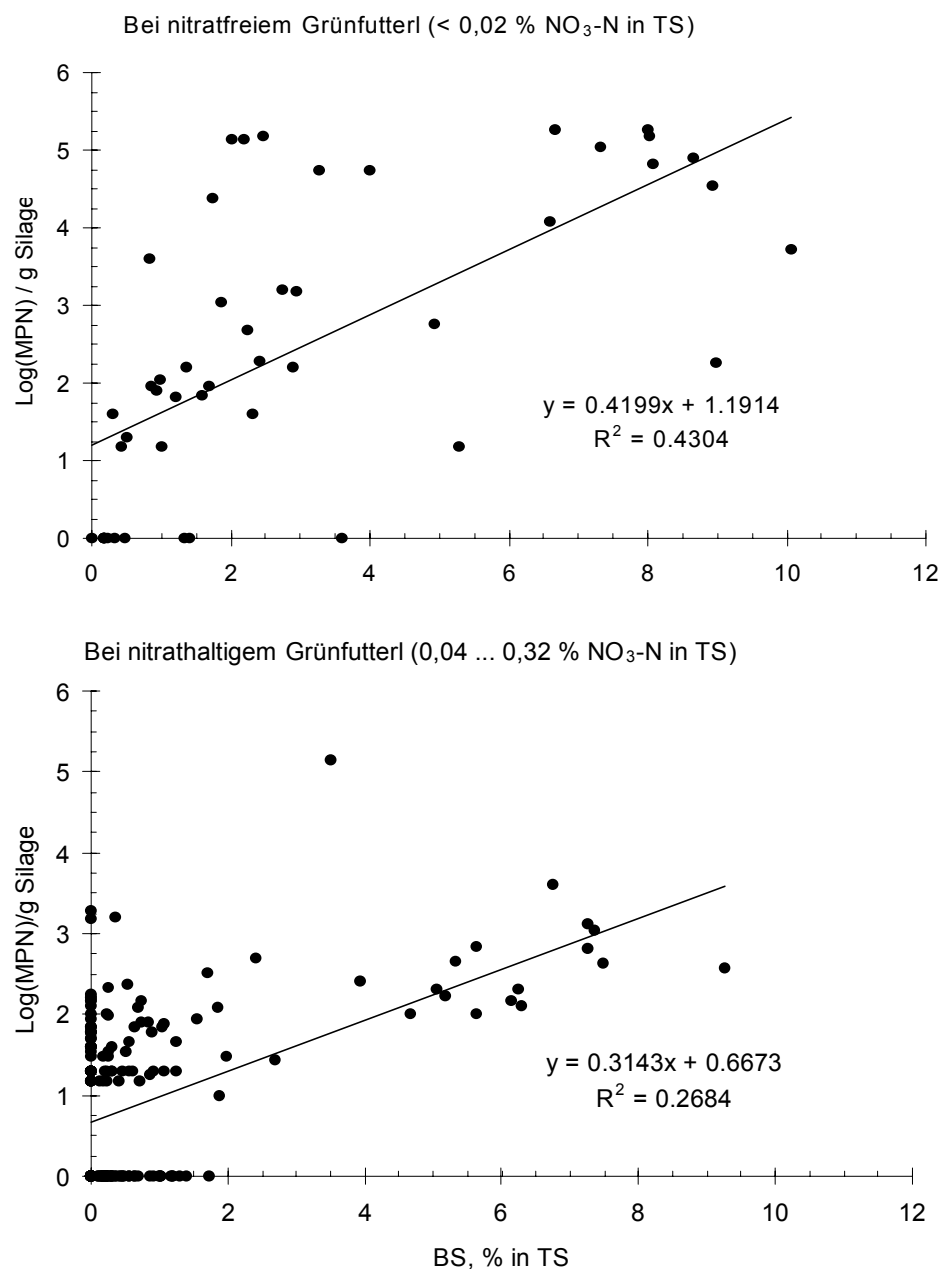


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Buttersäuregehalt und Sporengelalt in Silagen; unter Berücksichtigung der Anwesenheit von Nitrat im Ausgangsmaterial

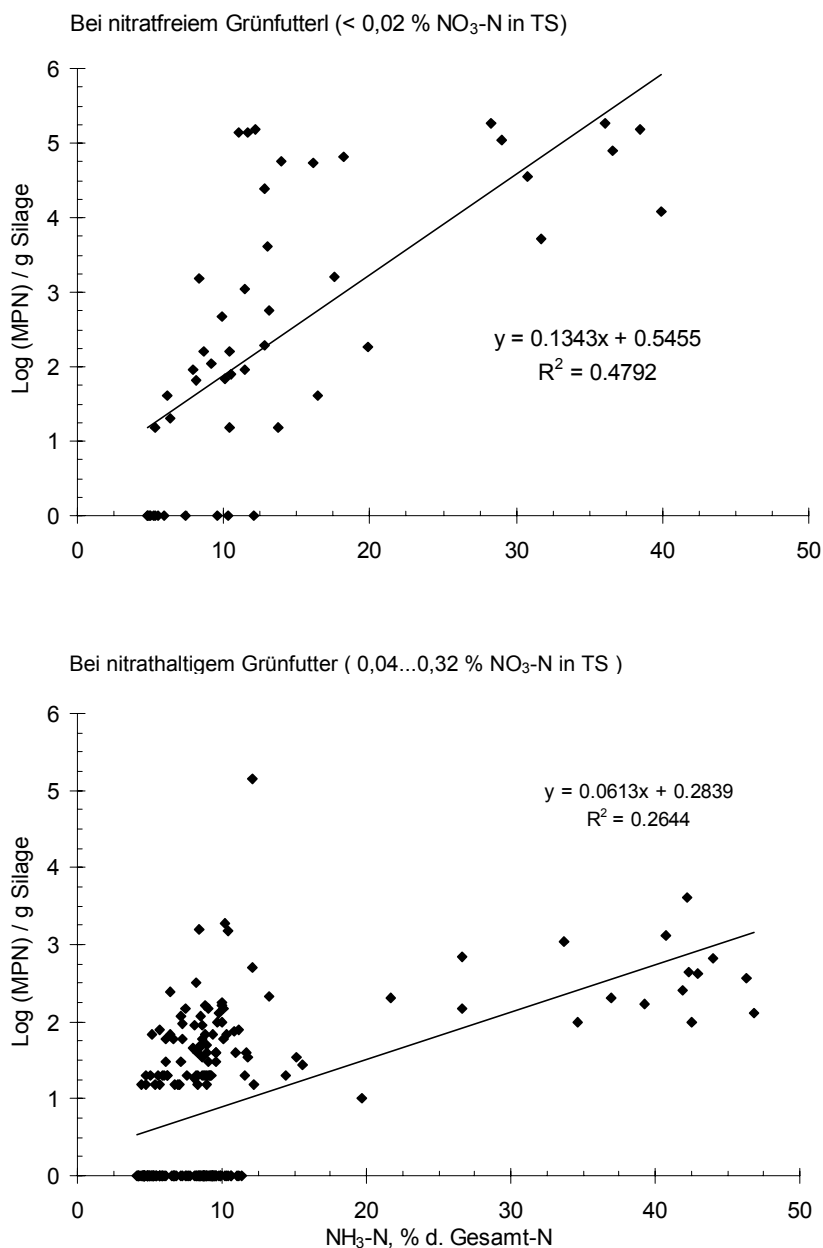


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Ammoniakgehalt und Sporengleich in Silagen; unter Berücksichtigung der Anwesenheit von Nitrat im Ausgangsmaterial

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, liegt eine ähnliche Beziehung wie sie für den Buttersäuregehalt festgestellt wurde auch zwischen dem Ammoniakgehalt und dem Sporengleich der Silage vor.

Demnach kann anhand der Stoffwechselprodukte von Clostridien, die durch vegetative Keime gebildet werden, nur bedingt auf den Gehalt an Clostridien sporen geschlossen werden. Wie aus Tabelle 29 ersichtlich ist, kann mit niedrigen Sporengleich in der Silage vor allem in buttersäurefreien Silagen gerechnet werden, wobei aber nicht ausgeschlossen ist, dass auch BS-haltige Silagen geringe Sporengleich aufweisen.

Tabelle 29: Verteilung der Silagen nach dem Kontaminationsgrad an Clostridien sporen in Abhängigkeit von Höhe des Buttersäuregehaltes

Buttersäuregehalt % in TS	Anzahl, gesamt n	Verteilung nach den Klassen der Sporengehalte (MPN/g FM)		
		0 - <10 ²	10 ² - <10 ³	≥ 10 ³
< 0,3	154 (100 %)	140 (90,9 %)	12 (7,8 %)	2 (1,3 %)
0,3 - < 1,0	29 (100%)	23 (79,3%)	4 (13,8 %)	2 (6,9 %)
≥ 1,0	73 (100%)	26 (35,6 %)	25 (34,3 %)	22 (30,1 %)

Bei Vorliegen von Buttersäure ist allerdings eher mit erhöhten Sporengehalten zu rechnen. Wie Abbildung 17 zu entnehmen ist, nahm der prozentuale Anteil der Silagen mit geringem Sporengehalt deutlich ab, wenn Buttersäure im Gärmedium auftrat. Mit zunehmenden Buttersäuregehalten stieg auch der Anteil an Silagen mit hohem Sporengehalt an.

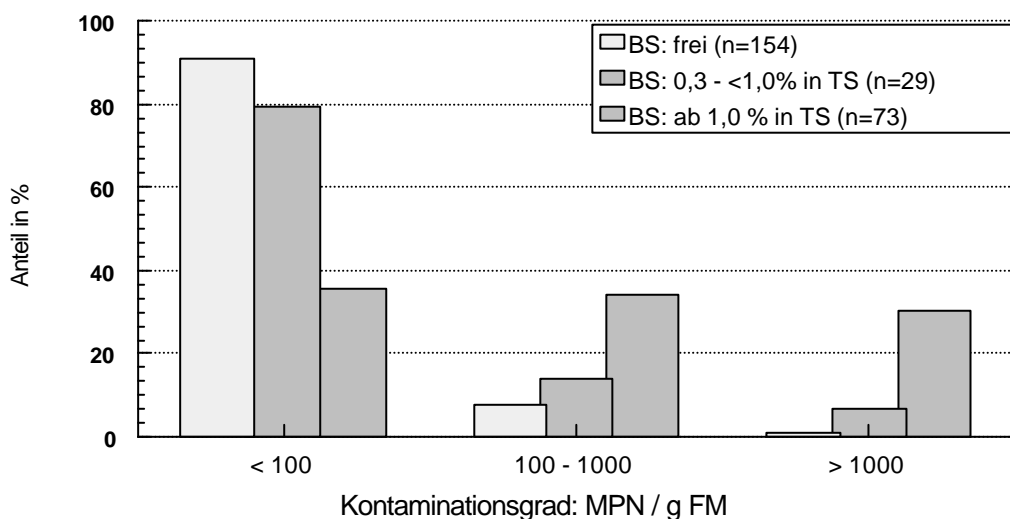


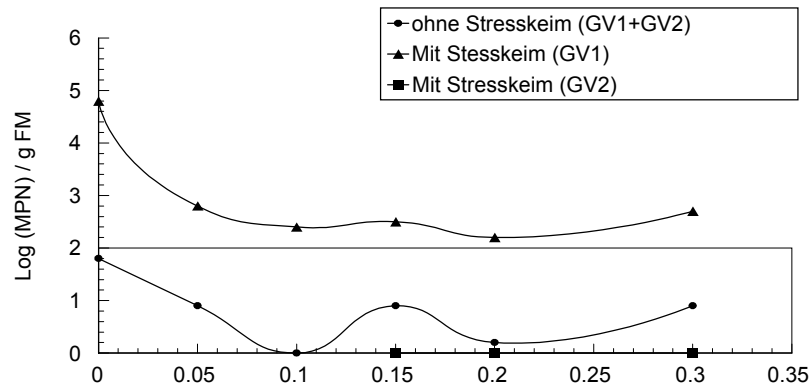
Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der Silagen (in %) nach dem Gehalt an Clostridien sporen (MPN/g FM) in Abhängigkeit vom Buttersäuregehalt (BS)

Aus Abbildung 18, in der der Sporenghalt der Silagen in Abhängigkeit von den Merkmalen des Ausgangsmaterials dargestellt ist, geht hervor, dass der Clostridiensporenghalt der Silagen vor allem vom Nitratgehalt des Ausgangsmaterials sowie dem Verschmutzungsgrad des Grünfutters bestimmt wird. Der Buttersäuregehalt der Silagen wurde in dieser Zusammenstellung nicht berücksichtigt.

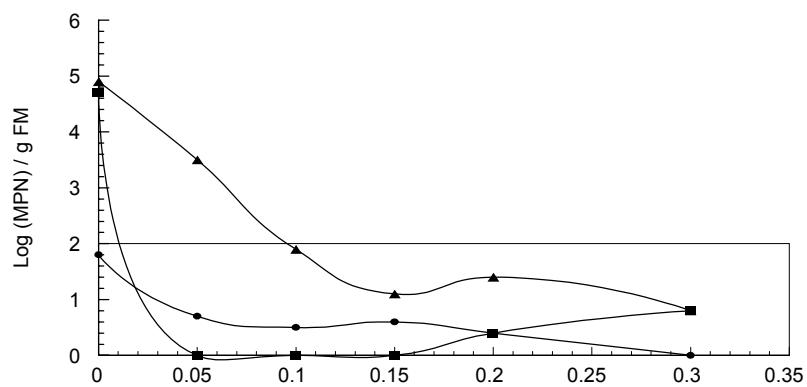
Zunächst ist festzustellen, dass der Sporenghalt der Silagen in allen Klassen der Vergärbarkeit bei nitratfreiem Ausgangsmaterial am höchsten ist, wobei bei sporenbelastetem Grünfutter deutlich höhere Gehalte vorliegen als bei geringer Belastung des Ausgangsmaterials. Bereits bei geringem Nitratzusatz gehen in jedem Falle die Sporengehalte deutlich zurück; bei steigenden Nitratzusätzen nehmen sie bis zur Nachweisgrenze weiter ab.

Das Niveau der Sporengehalte beim jeweiligen Nitratgehalt ist aber offensichtlich nicht allein vom Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials abhängig. Wie aus den abnehmenden Gehalten bei Anstieg der VK-Klassen abzulesen ist, erfolgt auch eine Einschränkung der Sporenbildung durch Verbesserung der Vergärbarkeit. Bei hoher Sporenbelastung des Ausgangsmaterials ist eine Reduzierung der Sporenbelastung aber nur bei höheren VK-Werten in Kombination mit dem Nitrat erreichbar. Im VK-Bereich < 35 kann der Sporenghalt durch Nitratzusatz aber nur leicht vermindert werden. Er bleibt hier bei allen Nitratgehalten auf einem relativ hohem Niveau.

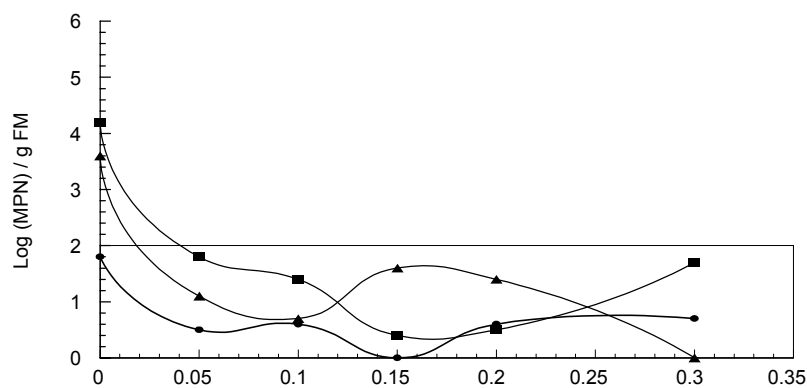
VK: < 35



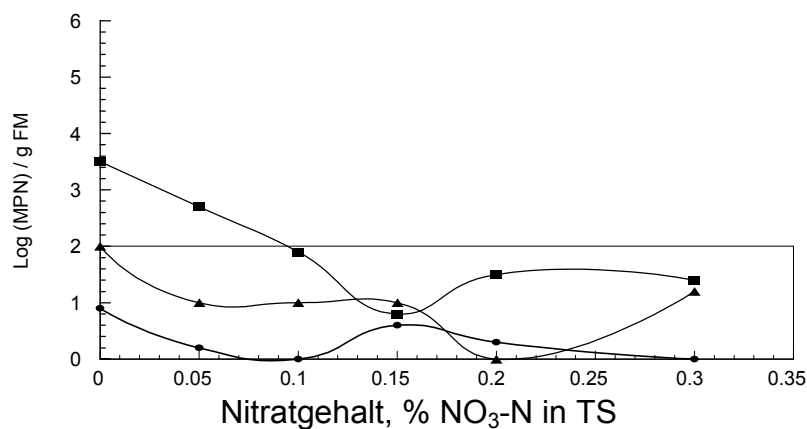
VK: 35...<40



VK: 40 ... < 45



VK: 45 ... 59



* Die schattierten Felder kennzeichnen den sporenen Bereich ($\leq 10^2$ MPN/g FM)

**MPN gibt die Sporenanzahl an, die mittels MPN(most probable number)-Verfahrens bestimmt wird.

Abbildung 18: Gehalt an Clostridiensporen (MNP/g FM) in Silagen aus Knautgras in Abhängigkeit von Nitratgehalt und VK-Wert des Ausgangsmaterials

4.1.5 Ableitung von Grenzwerten für den Mindest-Nitratgehalt zur Unterbindung von Buttersäuregärung

Die bisher dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass das Auftreten von Buttersäure und die Höhe der Buttersäuregehalte davon abhängig sind, welche Nitratgehalte im Grünfutter bei bestimmten VK-Werten vorliegen. Darüber hinaus ging aus den Ergebnissen hervor, dass zusätzlich auch die Höhe des Clostridien-sporengehaltes im Grünfutter von Bedeutung ist.

Im Folgenden soll der Mindest-Nitratgehalt (MNG) ermittelt werden, der in Abhängigkeit von den übrigen Merkmalen der Vergärbarkeit (VK) notwendig ist zur Erzeugung buttersäurefreier Silagen. Die Ableitung dieses Grenzwertes wurde unter Berücksichtigung des Clostridien-sporengehaltes im Ausgangsmaterial vorgenommen.

Die Ermittlung des MNG erfolgte im ersten Schritt mit Hilfe eines graphischen Auswertungsverfahrens für jede geprüfte Wertekombination von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient. Dazu wurde für die jeweilige Wertekombination die Beziehung zwischen dem Buttersäuregehalt der Silage und dem Nitratgehalt des Grünfutters dargestellt, wobei die entsprechende Anpassungskurve mittels Computersimulation geschätzt wurde. Anhand dieser Kurve wurde dann der minimale Nitratgehalt ermittelt, bei dem die Silagen gerade buttersäurefrei waren. Als buttersäurefrei galten gemäß der für die Silagebeurteilung allgemein angewandten Richtlinie Silagen, die einen BS-Gehalt von $\leq 0,3$ % BS in TS aufwiesen. In den Abbildungen 19 und 20 sind ausgewählte Beispiele für dieses Vorgehen dargestellt.

Nachdem auf diese Weise die Einzelwerte des minimalen Nitratgehaltes für jede Wertekombination von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient ermittelt worden sind, wurde die Beziehung zwischen den MNG-Messwerten und den Kennzahlen der Vergärbarkeit, TS-Gehalt, Z/PK-Quotient sowie VK-Wert, statistisch geprüft.

TS-Gehalt und Z/PK-Quotient wurden in diesem Zusammenhang als gleichrangige und von einander unabhängige Merkmale angesehen, die Einfluss auf den Mindest-Nitratgehalt haben können.

Nach KÖHLER et al. (1992) kann die Beziehung zwischen MNG und einem der beiden Einflussfaktoren aber nur dann mittels einfacher Korrelation geschätzt werden, wenn es gelingt, einen der Einflussfaktoren annähernd konstant zu halten, so dass nur zwei der gemessenen Merkmale variieren. Diese Voraussetzung konnte in den vorliegenden Versuchen nicht erfüllt werden, weil nur relativ wenige Z/PK-Stufen bei einem gegebenen TS-Gehalt geprüft worden sind.

Nach WEBER (1972) und EBLER (1987) kann eine solche Beziehung aber mit Hilfe eines partiellen Korrelationskoeffizienten bestimmt werden. Der partielle Korrelationskoeffizient gibt dabei den Grad der Abhängigkeit zwischen zwei Variablen an, wenn die Abhängigkeit von den restlichen Variablen ausgeschaltet worden ist. Für die Beschreibung der Beziehung zwischen MNG und TS-Gehalt bzw. Z/PK-Quotient wurden deshalb partielle Korrelationskoeffizienten berechnet

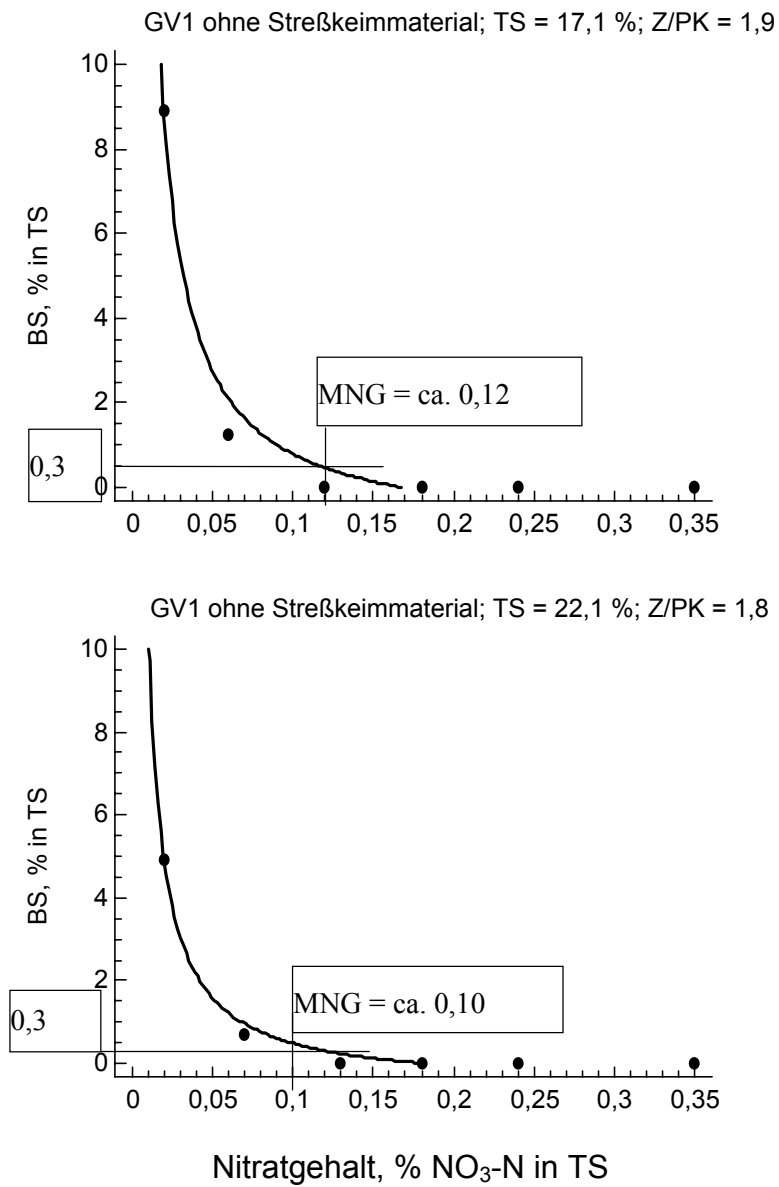


Abbildung 19: Ausgewählte Beispiele für die Ermittlung des Mindest-Nitratgehaltes bei Ausgangsmaterial ohne Zusatz von Stresskeimmaterial

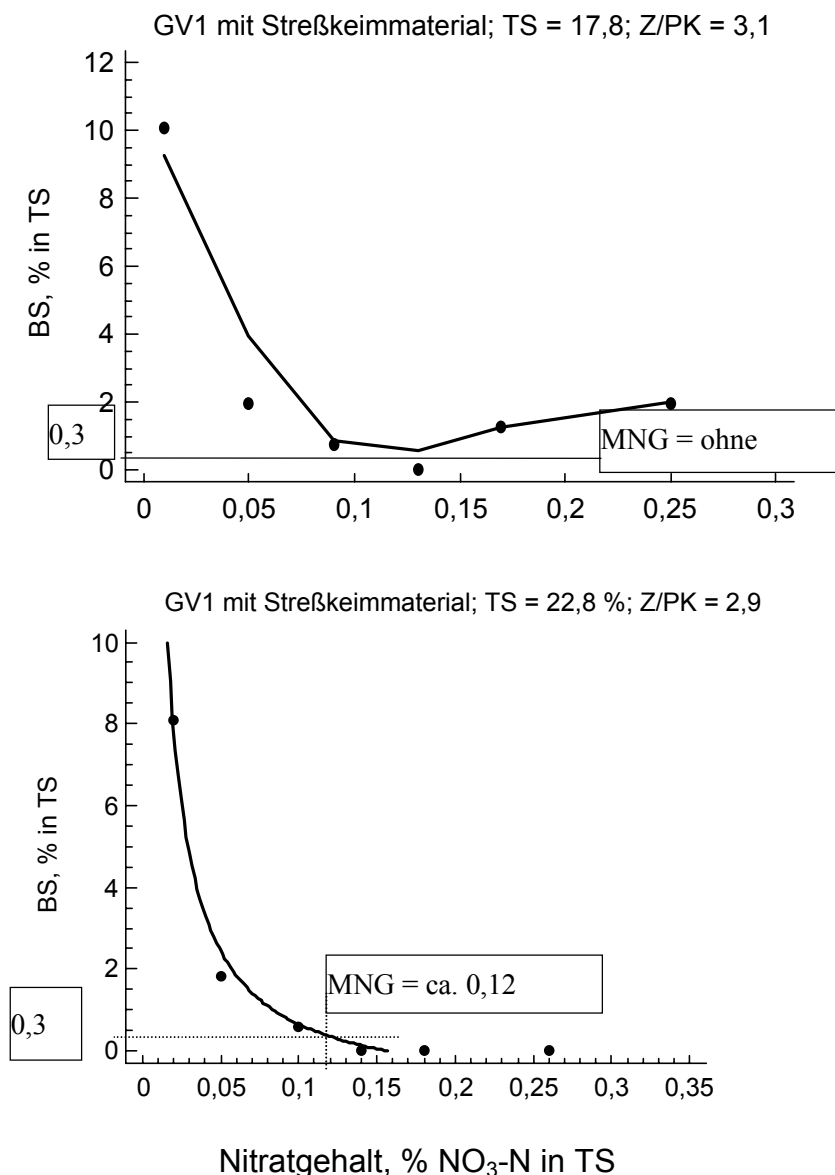


Abbildung 20: Ausgewählte Beispiele für die Ermittlung des Mindest-Nitratgehaltes bei Ausgangsmaterial mit Zusatz von Stresskeimmaterial

Für den Zusammenhang zwischen MNG und VK-Wert wurde im Gegensatz dazu die einfache Korrelation berechnet. Dieses unterschiedliche Vorgehen ist darin begründet, dass der VK-Wert nicht als eine gleichrangige zufällige Variable anzusehen ist. Er stellt vielmehr eine aus TS-Gehalt und Z/PK-Quotient zusammengefasste Größe dar (SCHMIDT et al., 1971), in der die Teileffekte beider Merkmale nicht voneinander zu trennen sind.

In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der beschriebenen Korrelationsanalyse angegeben. Sie weisen aus, dass sowohl zwischen MNG und TS-Gehalt als auch zwischen MNG und Z/PK-Quotient ein linearer Zusammenhang bestand. Im Korrelationskoeffizienten für VK finden diese Beziehungen ebenfalls ihren Niederschlag. Bemerkenswert ist der deutlich höhere Korrelationskoeffizient bei allen Merkmalen für das mit Clostridien sporen belastete Ausgangsmaterial. Er bringt zum Ausdruck, dass bei sporenbelastetem Ausgangsmaterial die Anwesenheit von Nitrat im Gärungsmedium eine besondere Bedeutung für die Unterbindung von Clostridienaktivität hat, trotz hohen TS-Gehaltes und Z/PK-Quotienten.

Tabelle 30: Korrelation zwischen Mindest-Nitratgehalt (MNG) und TS-Gehalt (%), Z/PK-Quotient sowie VK-Wert

Behandlung (Versuch)	Korrelationskoeffizient (r) sowie Probenanzahl (n)			
		TS-Gehalt ¹⁾	Z/PK-Quotient ¹⁾	VK-Wert ²⁾
ohne Stresskeimzusatz (GV 1 + GV 2)	r	- 0,77**	- 0,43*	- 0,77**
	n	24	24	24
mit Stresskeimzusatz (GV 2)	r	- 0,92**	- 0,82**	- 0,92**
	n	12	12	12

¹⁾ partielle Korrelation; ²⁾ einfache Korrelation
*, ** : Signifikanz mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$

Zur Ableitung der Schätzgleichung für den Mindest-Nitratgehalt in Abhängigkeit von TS-Gehalt (%) bzw. Z/PK-Quotient wurde die multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Werte für MNG als abhängige Variable und die für TS-Gehalt und Z/PK-Quotient als unabhängige Variable angenommen.
Folgende Gleichungen wurden ermittelt:

- Für Grünfutter ohne Sporenmaterial:

$$MNG = 0,21 - 0,0035 \times TS - 0,025 \times Z / PK \quad (1)$$

$$(r^2 = 59,7 \% ; p < 0,01)$$

- Für Grünfutter mit Sporenmaterial:

$$MNG = 0,19 - 0,002 \times TS - 0,026 \times Z / PK \quad (2)$$

$$(r^2 = 85,0 \% ; p < 0,01)$$

Dimensionen: MNG: in % $\text{NO}_3\text{-N}$ bezogen auf TS

Die Ableitung der Grenzwertlinie für den Mindest-Nitratgehalt erfolgte bezogen auf den VK-Wert, weil in dieser Größe das gegenseitige Verhältnis von TS und Z/PK zur Einschätzung der Vergärbarkeit zusammengefasst ist, so dass der notwendige Bedarf an Nitrat für die jeweils im Grünfutter gegebene Vergärbarkeit ermittelt werden kann.

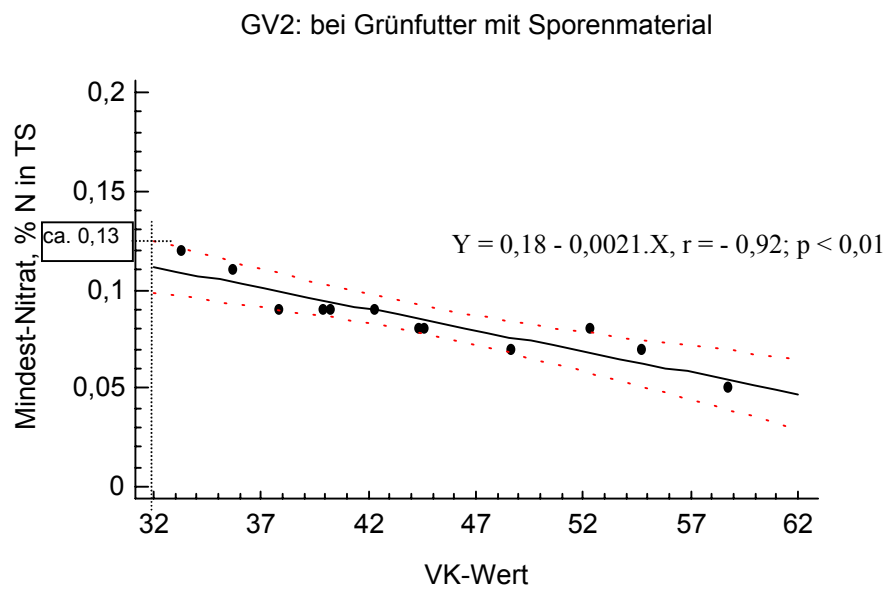
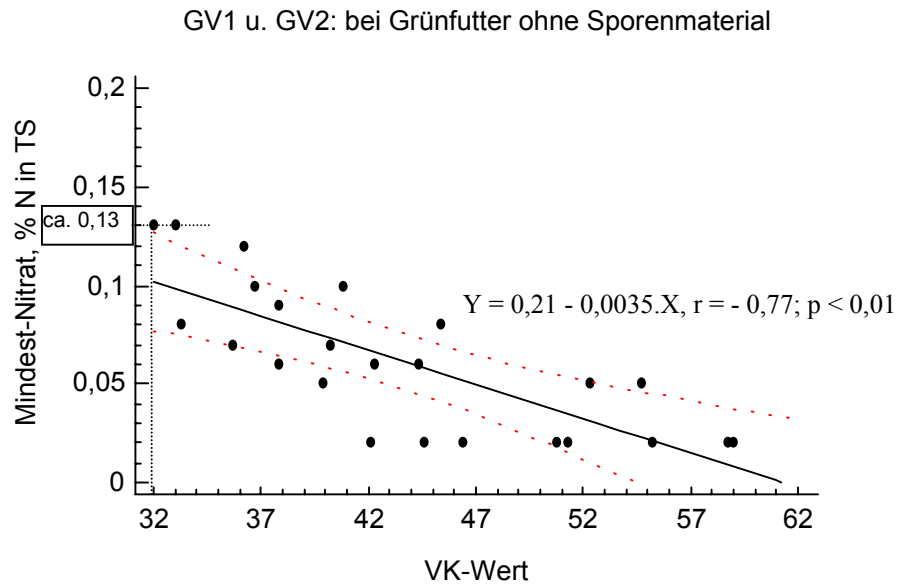


Abbildung 21: Regressionsfunktion sowie Konfidenzintervall für die Beziehung zwischen Mindest-Nitratgehalt und Vergärbarkeitskoeffizient (VK) im Grünfutter

In Abbildung 21 sind die Messwerte zusammen mit den Regressionsfunktionen sowie dem Konfidenzintervall von 99 % dargestellt. VK stellt darin die unabhängige Variable "x", der Mindest-Nitratgehalt (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) die abhängig Variable "y" dar. Aufgrund des relativ geringen Stichprobenumfangs wurde mit dem Konfidenzintervall von 99 % ein möglichst kleiner Bereich für den in Frage kommenden Mindest-Nitratgehalt gewählt.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, lag bei Grünfutter ohne Zusatz von Sporenmaterial eine relativ große Streuung der Messwerte für MNG vor. Diese Streuung ist vermutlich auf den wechselnden natürlichen Gehalt des verwendeten Grünfutters an Clostridiensporen zurückzuführen. In einigen Wertekombinationen von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient lagen bereits ab VK 42 buttersäurefreie Silagen vor, trotz Fehlens von Nitrat. Demgegenüber waren in anderen Varianten 0,05 – 0,08 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS erforderlich, obwohl die VK-Werte deutlich höher als 42 lagen. Trotz dieser Streuung wurde jedoch ein deutlich linearer ($r = 0,77$), statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen MNG und VK-Wert gefunden.

Bei Grünfutter mit Zusatz von Stresskeimmaterial war die Streuung der Messwerte für MNG wesentlich geringer. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt auf den durchgehend eingestellten hohen Sporengehalt zurückzuführen ist.

Wie aus dieser Darstellung hervorgeht, konnten auch bei sehr hohen VK-Werten ohne Nitratzusatz keine buttersäurefreien Silagen erzielt werden. Das bedeutet, dass allein durch Verbesserung der Vergärbarkeit nach den bisher gültigen Merkmalen bei nitratfreiem Grünfutter, sofern es stark mit Sporen belastet ist, keine buttersäurefreien Silagen erzielt werden können. Mit $r = -0,92$ lag eine sehr enge Beziehung zwischen dem Vergärbarkeitskoeffizient (VK) und dem notwendigen Mindest-Nitratgehalt vor.

Aus den in Abbildung 21 angegebenen Regressionsgeraden geht auch hervor, dass der notwendige Gehalt an Nitrat bei steigenden VK-Werten bei Grünfutter ohne besondere Clostridiensporenbelastung schneller zurückging als bei belastetem Ausgangsmaterial. Während bei unbelastetem Grünfutter MNG mit zunehmenden VK-Werten gegen Null geht, d.h. buttersäurefreie Silagen bei Fehlen von Nitrat möglich sind, wird ein solcher Null-Wert bei sporenbelastetem Ausgangsmaterial nicht erreicht.

Die in Abbildung 21 dargestellten Regressionsgeraden können noch nicht als Grenzwertlinien für den notwendigen Mindest-Nitratgehalt angesehen werden, da sie innerhalb des Streuungsbereiches der Messwerte liegen. Die gesuchten Grenzwertlinien stellen vielmehr eine Parallele zu den beschriebenen Regressionsgeraden dar, die jeweils an der oberen Grenze des Konfidenzintervalls verlaufen, d.h. oberhalb des Streuungsbereiches der Messwerte.

Mit einer solchen Festlegung für den Verlauf der Grenzwertlinie wird gewährleistet, dass für die zu ermittelnde notwendige Kombination von VK-Wert und Mindest-Nitratgehalt (MNG_{VK}) eine hohe Treffsicherheit gegeben ist.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich ist, wurde bei Grünfutter ohne Sporenmaterial für den niedrigsten gemessenen VK-Wert von 32 an der oberen Grenze des Vertrauensbereiches ein MNG von $0,127 \approx 0,13$ % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS festgestellt, d.h. $\text{MNG}_{\text{max}} = 0,13$.

Die Grenzwertlinie für den Mindest-Nitratgehalt (% NO₃-N in TS) in Abhängigkeit vom VK-Wert (MNGVK) verläuft somit um den Betrag von 0,13 NO₃-N in TS in Parallelverschiebung oberhalb der Regressionsgerade ($y = 0,21 - 0,0035 \cdot VK$).

Sie kann wie folgt abgeleitet werden:

$$MNG_{VK} = A - 0,0035 \times VK$$

Bei $VK = 32$ und $MNG_{max} = 0,13$ beträgt

$$A = 0,13 + 0,0035 \times 32 = 0,24$$

Die Grenzwertlinie für sporenarmes Ausgangsmaterial lautet demnach:

$$MNG_{VK} = 0,24 - 0,0035 \times VK \quad (3)$$

Für sporenreiches Grünfutter beträgt der Wert für MNG_{max} ebenfalls 0,13 % NO₃-N in TS. Für die Regressionsgerade wurde $y = 0,18 - 0,0021 \cdot VK$ ermittelt (s. Abb. 21).

Die Ableitung der Grenzwertlinie kann damit wie folgt vorgenommen werden:

$$MNG_{VK} = A - 0,0021 \times VK$$

Bei $VK = 32$ und $MNG_{max} = 0,13$ beträgt

$$A = 0,13 + 0,0021 \times 32 = 0,197 \approx 0,20$$

Die Grenzwertlinie für sporenreiches Ausgangsmaterial lautet demnach:

$$MNG_{VK} = 0,20 - 0,0021 \times VK \quad (4)$$

Damit kann für den gemessenen VK-Bereich zwischen 32 und 60 der notwendige Mindestgehalt an Nitrat in Abhängigkeit vom VK-Wert sowohl für sporenarmes, sauber geerntetes, Grünfutter als auch für sporenreiches, verschmutztes Material berechnet werden (s. Abbildung 22).

In Tabelle 31 sind die entsprechenden Angaben in gerundeten Zahlenwerten zusammengestellt. Die Grenzwertlinien für den Mindestgehalt an Nitrat gibt Abbildung 23 wieder.

Es erscheint zunächst überraschend, dass für $VK = 32$ für beide Sporenklassen der gleiche Mindestgehalt ausgewiesen ist. Das dürfte damit zu erklären sein, dass im unteren VK-Bereich, in dem günstige Bedingungen für die Clostridienvermehrung gegeben sind, nicht die Anzahl der vorhandenen Sporen für die Bildung von Buttersäure entscheidend ist sondern vor allem ihr Vorhandensein.

Bei geringer Sporenbelastung des Grünfutters wird jedoch bereits durch Verschlechterung der Bedingungen für Clostridienaktivität, d.h. bei steigenden VK-Werten, eine Hemmwirkung ausgelöst, so dass der notwendige Nitratgehalt als direkter Clostridieninhibitor zunehmend geringer sein kann. Bei $VK = 60$ werden auch hier bei weitgehendem Fehlen von Nitrat buttersäurefreie Silagen erzielt. Demgegenüber ist bei hoher Sporenbelastung des Ausgangsmaterials auch bei nach VK als leicht vergärbare einzustufendem Grünfutter noch der inhibitorische Effekt relativ hoher Nitrat-Gehalte erforderlich. Selbst bei einem VK-Wert von 60 ist mit etwa 3 g NO₃/kg TS noch ein relativ hoher Gehalt an Nitrat erforderlich.

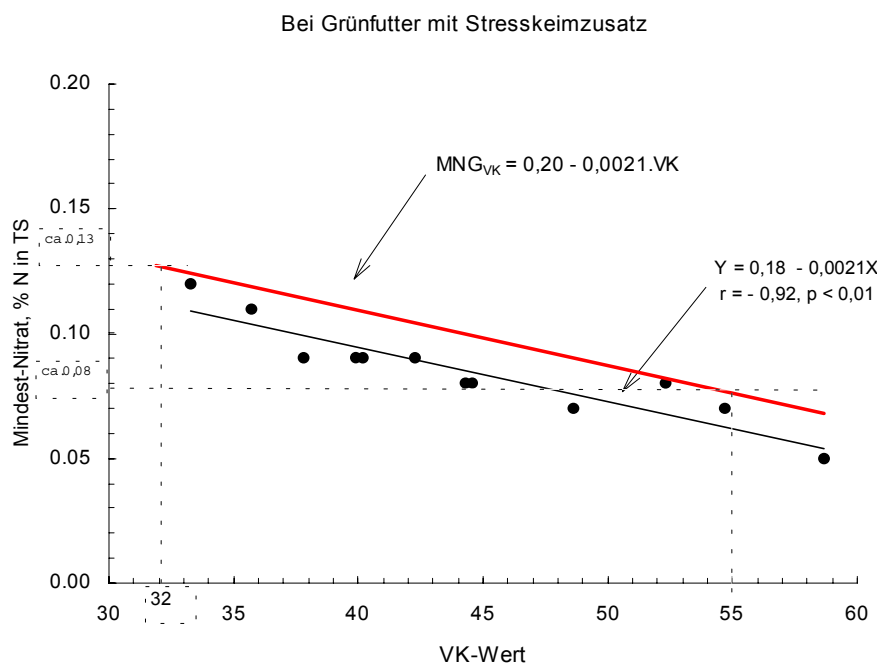
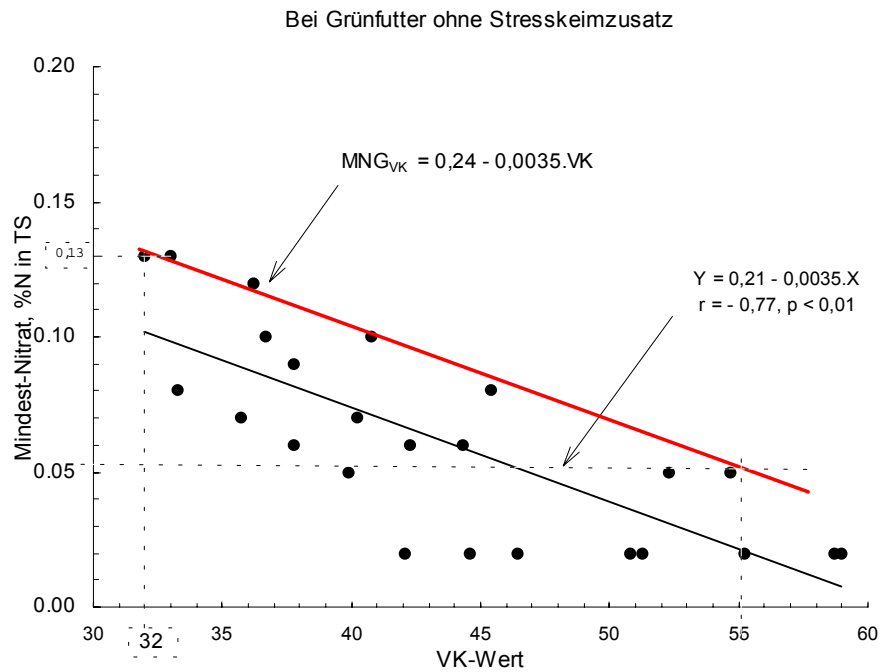


Abbildung 22: Zur Ableitung der Grenzwertelinie für den Mindest-Nitratgehalt in der Abhängigkeit vom VK-Wert

Tabelle 31: Mindest-Nitratgehalt (MNG) zur Erzeugung buttersäurefreier Silagen in Abhängigkeit von VK-Wert und Clostridiensporenbelastung des Grünfutters

VK-Wert	MNG für sporenarmes Material		MNG für sporenreiches Material	
	% NO ₃ -N in TS	g NO ₃ /kg TS	% NO ₃ -N in TS	g NO ₃ /kg TS
32	0,13	5,8	0,13	5,8
35	0,12	5,3	0,13	5,8
40	0,10	4,4	0,12	5,3
45	0,08	3,5	0,11	4,9
50	0,07	2,9	0,10	4,4
55	0,05	2,2	0,08	3,5
60	0,03	1,3	0,07	2,9

Insgesamt ist damit festzustellen, dass es nicht den allgemeingültigen Grenzwert für den notwendigen Mindest-Nitratgehalt zur Unterbindung von Buttersäure gibt. Die im Gärsubstrat erforderliche Menge an Nitrat steht vielmehr mit den übrigen Gärungsbedingungen sowie dem Clostridiensporenbesatz des Grünfutters im Zusammenhang.

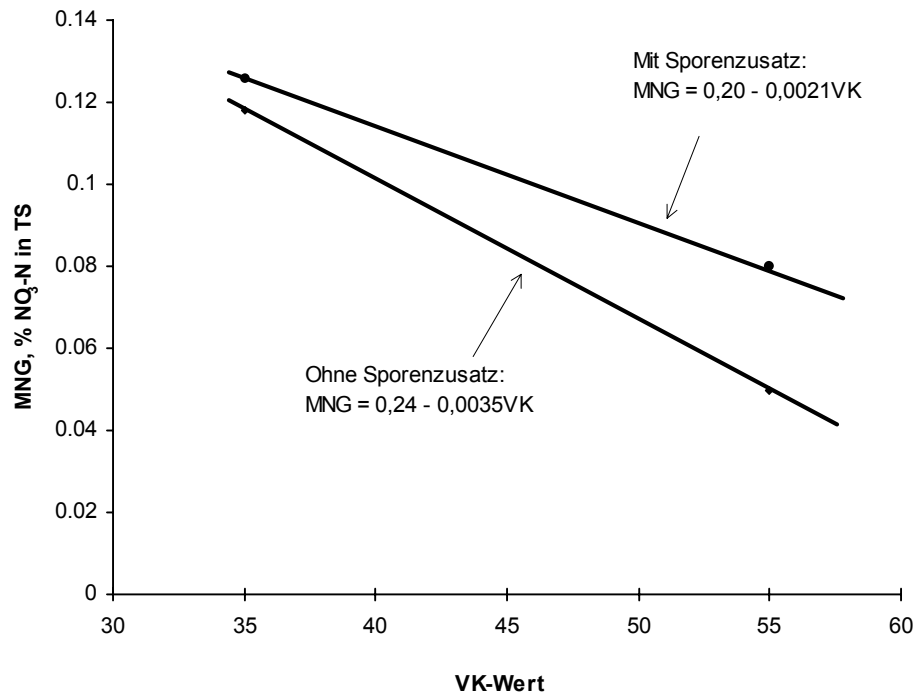


Abbildung 23: Grenzwertlinie für den Mindestgehalt an Nitrat (MNG) in Abhängigkeit vom VK-Wert bei Grünfutter ohne/mit Sporenzusatz

4.2 Versuch zur Dynamik der Clostridienentwicklung

Die Ergebnisse der mehrfaktoriellen Versuche haben gezeigt, dass das Auftreten von Buttersäure und die Höhe der BS-Gehalte in Silagen abhängig sind von der im Ausgangsmaterial gegebenen Vergärbarkeit nach VK in Verbindung mit dem Nitratgehalt, wobei auch die Clostridiensporenbelastung des Ausgangsmaterials dafür von Bedeutung war.

Der Clostridiensporengehalt der Silagen wurde ebenfalls durch das im Grünfütter gegebene Verhältnis von TS-Gehalt und Z/PK-Quotient und zugleich durch den

Nitratgehalt des betreffenden Materials und seinen Ausgangsgehalt an Clostridiensporen bestimmt. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Buttersäuregehalt der Silagen und deren Belastung mit Clostridiensporen lag jedoch nicht vor.

Zur Aufklärung der Ursachen und Bedingungen für die Clostridienentwicklung im Gärungsverlauf werden im folgenden die Ergebnisse des dazu durchgeführten Verlaufsversuches dargestellt. Als Einflussfaktoren wurden dabei der TS-Gehalt, die Säuerungsintensität sowie der Nitratgehalt geprüft.

Tabelle 32: Kennzahlen des Ausgangsmaterials für den Versuch zur Dynamik der Clostridienentwicklung

	TS-Stufen			
	1.	2.	3.	4.
TS-Gehalt (%)	21,74	32,49	41,55	51,49
NO ₃ -N, % in TS	0,00	0,00	0,00	0,00
WLKH (g/kg TS)	112,7	92,37	79,33	69,46
PK (g MS/ kg TS)	36,39	37,97	40,53	39,96
Z/PK ¹⁾	3,10	2,43	1,96	1,74
VK ²⁾	46,5	51,9	57,2	65,4
Clostridiensporen (MPN ³⁾ /g FM)	2,8x10 ⁴	6,8x10 ³	2,0x10 ⁴	1,6x10 ⁴
Lactobacillus (KbE/g FM)	5,4x10 ⁵	6,0x10 ⁵	5,2x10 ⁵	1,2x10 ⁶
Enterococcus (KbE/g FM)	4,0x10 ⁴	7,4x10 ⁵	1,2x10 ⁶	1,2x10 ⁶

¹⁾ Z (Zucker) = WLKH; ²⁾ VK = TS (%) + 8 Z/PK; ³⁾ MPN: most probable number

In Tabelle 32 sind die Kennzahlen des Ausgangsmaterials im Hinblick auf die Silierung zusammengestellt. Wie daraus ersichtlich ist, liegen zwischen den TS-Stufen kaum Unterschiede bezüglich der einzelnen Merkmale vor. Allerdings ist festzustellen, dass der Zuckergehalt mit Anstieg der TS-Gehalte geringer wurde.

Dieser Effekt ist mit dem unvermeidbaren Zuckerabbau während der Trockengutbereitung zu erklären, wobei in Rechnung zu stellen ist, dass der relative Anteil an Trockengut in der Mischung aus frischem und getrocknetem Grünfütter mit dem

eingestellten TS-Gehalt zunahm. In den VK-Werten liegt zwischen den TS-Stufen trotzdem eine deutliche Abstufung vor.

Bezüglich der VK-Werte ist festzustellen, dass das Ausgangsmaterial auch in der niedrigsten Stufe des TS-Gehaltes als leicht vergärbare eingeschätzt werden kann. Mit Erhöhung der TS-Gehalte ist trotz der rückläufigen Zuckergehalte eine weitere Verbesserung eingetreten.

Der Clostridiensporengehalt des Materials war aufgrund des Erdzusatzes in allen Varianten annähernd gleich und hatte mit etwa 10^4 Sporen/g Frischmasse (FM) ein relativ hohes Niveau.

Als hoch ist auch der natürliche Besatz des Grünfutters mit Lactobacillen einzuschätzen. Da das Grünfutter durchgehend nitratfrei war, kann davon ausgegangen werden, dass kein natürlicher Clostridieninhibitor vorgelegen hat.

4.2.1 Zur Wirkung des Trockensubstanzgehaltes

In Tabelle 33 sind die Gehalte an Gärprodukten und Restzucker sowie an Clostridiensporen in den Silagen im Gärungsverlauf für die Kontrollvarianten der einzelnen TS-Stufen aufgeführt. In Abbildung 24 sind die wichtigsten Merkmale des Gärungsverlaufes im Vergleich zwischen den TS-Stufen graphisch dargestellt.

Daraus ist ersichtlich, dass die Absenkung des pH-Wertes zu Gärbeginn um so schneller verlief, je niedriger der TS-Gehalt des Ausgangsmaterial war.

Die Intensität der Milchsäurebildung nahm mit Erhöhung der TS-Gehalte entsprechend ab. Dabei ist bemerkenswert, dass die Höhe der Milchsäure-Gehalte trotz relativ hoher Zuckergehalte im Ausgangsmaterial in allen TS-Stufen verhältnismäßig gering war. In der niedrigsten TS-Stufe trat nach dem 7. Tag Buttersäure auf, deren Gehalt bis zum 180. Tag auf 4,6 % in TS anstieg. Laktatabbau fand in dieser Variante im wesentlichen nur bis zum 14. Tag statt. Während des Anstiegs der BS-Gehalte nach dem 14. Tag gingen die Milchsäuregehalte kaum noch zurück.

In der 2. und 3. TS-Stufe trat Buttersäure erst ab dem 14. bzw. 28. Tag auf. Die Milchsäuregehalte blieben nach diesem Zeitpunkt auf einem relativ niedrigen Niveau konstant.

In der höchsten Stufe des TS-Gehaltes blieben alle Silagen während des gesamten Gärungsverlaufes bei relativ hohem pH-Niveau buttersäurefrei.

Die Ammoniakgehalte der Silagen waren in allen TS-Stufen während des Gärungsverlaufes niedrig. Sie stiegen nur im Zusammenhang mit relativ hohen BS-Gehalten etwas an. Aber auch dann waren sie mit 6 – 8 % $\text{NH}_3\text{-N}$ in Gesamt-N gering.

Die Clostridiensporengehalte gingen bei der niedrigsten TS-Stufe etwa unmittelbar nach der Einlagerung des Grünfutters deutlich zurück. Sie nahmen aber zeitgleich mit dem Auftreten von Buttersäure (nach dem 7. Tag) wieder drastisch zu. Bereits am 14. Tag haben sie eine Höhe von ca. 10^6 Sporen/g FM erreicht. Trotz weiter ansteigender Buttersäuregehalte blieb der Sporengehalt in dieser Variante bei etwa 10^6 Sporen/g FM bis zum 180. Tag annähernd gleich.

Auch in der 2. und 3. TS-Stufe ging der Sporengehalt in der ersten Gärungsphase zunächst zurück, im Vergleich zur 1. TS-Stufe jedoch zeitlich etwas verzögert. Der danach einsetzende Wiederanstieg erreichte aber mit etwa 10^5 Sporen/g FM in der 2. TS-Stufe ein geringeres Niveau als in der 1. TS-Stufe. In der 3. TS-Stufe (41,6 % TS) wurde mit dem Wiederanstieg etwa das Niveau des Ausgangssporengehaltes von etwa 10^4 Sporen/g FM erreicht.

Tabelle 33: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

TS-Stufen	Tag (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₂ -N % des Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen pro g FM
			Milchsäure	Essigsäure	Buttersäure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	112,7	$2,8 \times 10^4$
	3	4,3	2,9	1,1	0,0	4,3	38,8	$4,0 \times 10^3$
	7	4,2	3,3	1,2	0,0	4,6	23,7	$7,4 \times 10^3$
	14	4,4	2,2	0,6	1,4	4,9	22,0	$2,5 \times 10^6$
	28	4,4	1,7	0,4	2,6	4,3	18,8	$2,5 \times 10^6$
	56	4,3	2,1	0,4	3,6	5,4	9,0	$2,3 \times 10^6$
	180	4,3	1,5	0,4	4,6	8,1	6,5	$1,1 \times 10^6$
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	92,4	$3,4 \times 10^4$
	3	4,6	2,2	0,7	0,0	4,0	31,5	$1,2 \times 10^4$
	7	4,4	2,6	1,1	0,0	4,5	18,6	$3,7 \times 10^3$
	14	4,4	2,5	0,8	0,3	5,4	19,8	$9,3 \times 10^4$
	28	4,5	2,4	0,6	1,3	5,1	18,8	$2,5 \times 10^5$
	56	4,4	2,5	0,4	1,6	6,0	16,8	$6,8 \times 10^5$
	180	4,3	3,1	0,3	1,7	6,5	16,6	$3,0 \times 10^4$
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	79,3	$2,0 \times 10^4$
	3	4,7	1,8	0,5	0,0	4,7	35,4	$1,7 \times 10^4$
	7	4,6	2,0	0,9	0,0	5,2	22,8	$6,8 \times 10^3$
	14	4,6	2,1	1,0	0,0	5,7	17,8	$6,0 \times 10^4$
	28	4,5	2,5	1,5	0,3	6,7	18,9	$8,3 \times 10^3$
	56	4,6	2,2	0,5	1,2	6,9	23,2	$2,0 \times 10^5$
	180	4,4	4,1	0,6	1,1	7,4	21,3	$6,0 \times 10^2$
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	69,5	$1,6 \times 10^4$
	3	5,0	1,2	0,6	0,0	4,0	45,8	$2,6 \times 10^4$
	7	4,8	1,6	0,8	0,0	4,5	23,0	$1,3 \times 10^4$
	14	4,7	1,8	0,9	0,0	3,5	19,3	$6,6 \times 10^4$
	28	4,6	1,8	1,0	0,0	5,3	20,8	$3,2 \times 10^3$
	56	4,6	1,9	1,1	0,0	5,7	27,3	$9,3 \times 10^3$
	180	4,5	2,2	1,2	0,0	5,7	34,5	$1,1 \times 10^2$

¹⁾ n.b.: nicht bestimmt; ²⁾ Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)

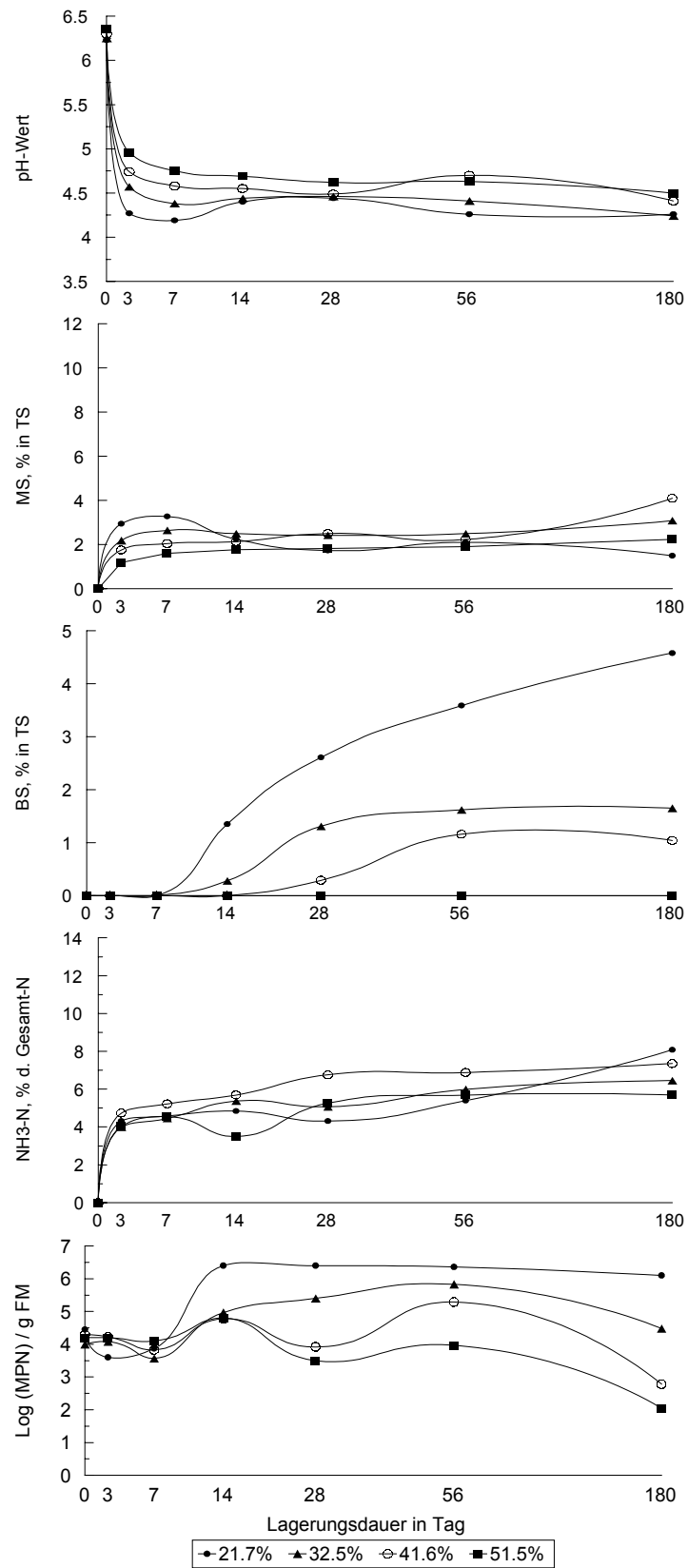


Abbildung 24: pH-Werte sowie Gehalte an Gärssäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf in Abhängigkeit vom TS-Gehalt des Ausgangsmaterials (nitratfrei) ohne Zusätze

Auffallend ist, dass in allen Varianten, in denen nach dem anfänglichen Rückgang wieder erhöhte Sporengehalte aufgetreten sind, zu diesem Zeitpunkt auch Buttersäure vorgelegen hat.

Beim höchsten TS-Gehalt von 51,5 % blieb das Niveau des Sporengehaltes bis zum 14. Tag annähernd unverändert. Danach war ein langsamer Rückgang zu verzeichnen. Die Silagen dieser Variante waren durchgehend buttersäurefrei.

Insgesamt ist zum Einfluss des TS-Gehaltes auf Gärungsverlauf und Clostridiensporenenentwicklung bei nitratfreiem sporenelastetem Grünfütter festzustellen, dass Buttersäurebildung erst beim höchsten TS-Gehalt von 51,5 % (VK = 65,4) ausgeschaltet werden konnte. Die Buttersäurebildung setzte im Gärungsverlauf um so früher ein, je niedriger der TS-Gehalt des Ausgangsmaterials war.

Der Clostridiensporengehalt ging bei den unteren TS-Stufen in der ersten Gärungsphase zunächst zurück. Er stieg dann zeitgleich mit dem Auftreten der Buttersäurebildung wieder an. Dieser Wiederanstieg ist umso stärker, je niedriger der TS-Gehalt war, und umgekehrt. Nur beim höchsten geprüften TS-Gehalt von 51,5 % blieb der Clostridiensporengehalt in den ersten zwei Wochen der Gärung nahezu unverändert. Danach ging er langsam zurück.

Daraus kann die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass mit zunehmendem TS-Gehalt des Grünfütters die Entwicklung von Clostridien hinsichtlich ihrer Sporenkeimung, ihrer Stoffwechselaktivität und ihrer Sporenbildung während des Gärungsverlaufes eingeschränkt wird. Zur Verhinderung der Entwicklung von Clostridien ist im Falle eines Mangels an Nitrat im Gärsubstrat aber ein sehr hoher TS-Gehalt ($\geq 50\%$) im Grünfütter erforderlich.

Eine Zunahme der Clostridiensporengehalte in der Silage war nur bei Vorliegen von Buttersäure zu verzeichnen. Zwischen der Höhe des Clostridiensporenbekanntes und der Höhe der Buttersäuregehalte war jedoch kein direkter Zusammenhang feststellbar.

4.2.2 Zur Wirkung der Säuerungsintensität

Um den Einfluss der Säuerungsintensität auf Buttersäurebildung und Clostridiensporengehalt in der Silage prüfen zu können, wurden Milchsäurebakterien (MSB) bzw. MSB in Kombination mit Glucose bei den einzelnen TS-Stufen eingesetzt. Die Ergebnisse für den Zusatz von Milchsäurebakterien (MSB) sind in Tabelle 34, für den Zusatz von MSB + Glucose (MSB +G) in Tabelle 35 zusammengestellt.

Aus Tabelle 33 ist ersichtlich, dass in allen TS-Stufen durch den Zusatz von MSB eine Intensivierung der Milchsäuregärung, verbunden mit einer beschleunigten Absenkung des pH-Wertes, eingetreten ist. Wie aus den Angaben weiterhin hervorgeht, war das Ausmaß der Buttersäurebildung stark eingeschränkt und der Beginn der Buttersäuregärung verzögert.

In den unteren beiden TS-Stufen ging der Gehalt an Clostridiensporen nach Gärbeginn ebenfalls zunächst zurück, um danach über das Ausgangsniveau hinaus anzusteigen. In den beiden oberen TS-Stufen war demgegenüber im Gärungsverlauf ein kontinuierlicher Rückgang im Clostridiensporengehalt zu beobachten. Buttersäure war hier nicht aufgetreten, wenn auch am 180. Tag in der Stufe 40 % TS Spuren von Buttersäure nachweisbar waren.

Tabelle 34: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes bei Zusatz von Milchsäurebakterien (MSB) in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

TS-Stufen	Tad (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₃ -N % des- Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen Pro g FM
			Milch- säure	Essig- säure	Butter- säure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	112,7	2,8x10 ⁴
	3	3,7	7,8	0,6	0	3,0	31,3	5,0x10 ²
	7	3,6	8,8	0,6	0	2,7	20,2	2,6x10 ²
	14	3,6	8,8	0,6	0,6	2,7	19,4	1,2x10 ⁴
	28	3,6	8,9	0,5	0,4	2,4	23,3	2,4x10 ³
	56	3,5	8,6	0,5	0,8	3,2	22,4	1,2x10 ⁶
	180	3,7	8,5	0,4	1,3	3,8	26,2	9,6x10 ⁵
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	92,4	3,4x10 ⁴
	3	4,1	4,4	0,6	0,0	3,5	23,4	1,3x10 ⁴
	7	3,9	5,9	0,8	0,1	3,4	15,8	6,0x10 ²
	14	3,8	6,5	0,7	0,0	4,0	13,8	1,2x10 ²
	28	3,8	6,5	0,8	0,2	4,0	15,3	1,3x10 ³
	56	3,8	6,6	0,7	0,3	4,6	17,9	1,3x10 ³
	180	3,9	5,1	0,3	1,0	5,2	17,3	1,8x10 ⁶
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	79,3	2,0x10 ⁴
	3	4,3	3,2	0,6	0,0	4,4	35,2	1,6x10 ⁴
	7	4,0	4,8	0,6	0,0	4,3	17,0	1,2x10 ⁴
	14	3,9	5,4	0,6	0,0	4,4	13,2	1,7x10 ²
	28	4,0	5,6	0,7	0,2	4,6	13,9	0,2x10 ²
	56	4,0	5,8	0,7	0,0	5,3	16,2	n.n.
	180	3,9	4,6	0,7	0,3	5,6	22,4	n.n.
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	69,5	1,6x10 ⁴
	3	4,9	1,4	0,5	0,0	3,6	45,8	1,2x10 ⁴
	7	4,3	3,1	0,6	0,0	3,8	23,0	1,3x10 ³
	14	4,1	3,9	0,8	0,0	4,4	19,3	3,4x10 ²
	28	4,1	4,3	0,8	0,0	4,4	20,8	0,2x10 ²
	56	4,1	4,5	0,8	0,0	4,6	27,3	0,2x10 ²
	180	4,0	4,6	0,8	0,0	5,3	34,5	n.n.

¹⁾ n.b.: nicht bestimmt; ²⁾ Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)

Wie aus Tabelle 35 hervorgeht, ist durch den Glucosezusatz eine weitere, wenn auch geringfügige zusätzliche Säuerung eingetreten, die in höheren Milchsäuregehalten, niedrigeren pH-Werten und weiterer Einschränkung der Buttersäurebildung ihren Niederschlag fand.

Die Gehalte an Clostridiensporen waren in den unteren beiden TS-Stufen gegenüber der Variante MSB allein etwas eingeschränkt. In den beiden oberen TS-Stufen entsprach der Rückgang an Clostridiensporen im Gärungsverlauf etwa dem bei Zusatz von Milchsäurebakterien.

Tabelle 35: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes bei Zusatz von Milchsäurebakterien und Glucose (MSB + G) in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

TS-Stufen	Taa (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₃ -N % des Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen pro g FM
			Milch- säure	Essig- säure	Butter- säure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	187,6	2,8x10 ⁴
	3	3,7	7,11	0,5	0	1,8	114,9	9,0x10 ²
	7	3,5	10,2	0,5	0	1,5	74,6	1,3x10 ²
	14	3,5	9,9	0,5	0	1,5	72,5	1,4x10 ³
	28	3,5	9,9	0,6	0	1,8	57,9	1,6x10 ³
	56	3,4	10,5	0,7	0,3	2,3	32,4	2,0x10 ⁴
	180	3,5	8,5	0,7	0,4	2,5	30,6	2,5x10 ⁴
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	144,8	3,4x10 ⁴
	3	4,0	4,4	0,6	0	3,5	77,7	6,8x10 ³
	7	3,8	6,5	0,8	0	3,8	31,8	1,1x10 ²
	14	3,7	-	0,7	0	3,8	26,9	1,9x10 ²
	28	3,7	7,1	0,8	0,2	3,5	31,3	0,4x10 ²
	56	3,7	7,2	1,0	0	3,8	29,3	n.n.
	180	3,7	6,5	0,8	0,6	4,4	38,6	3,7x10 ³
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	121,4	2,0x10 ⁴
	3	4,3	3,2	0,5	0	3,8	76,8	1,7x10 ⁴
	7	3,9	5,0	0,7	0	4,5	36,2	1,6x10 ³
	14	3,9	5,8	0,7	0	4,5	37,3	1,3x10 ³
	28	3,9	5,9	0,7	0	4,3	39,4	1,2x10 ²
	56	3,8	6,0	0,7	0	5,0	39,4	n.n.
	180	3,8	5,8	1,0	0,2	4,5	39,1	15
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	104,0	1,6x10 ⁴
	3	4,8	1,7	0,4	0	3,6	74,7	1,2x10 ⁴
	7	4,2	3,6	0,6	0	3,7	51,8	6,8x10 ³
	14	4,0	4,4	0,4	0	3,9	42,1	2,1x10 ²
	28	4,0	4,7	0,8	0	3,9	45,8	35
	56	4,0	4,7	0,8	0	4,0	35,0	20
	180	4,0	4,4	0,9	0	4,2	48,2	n.n.

¹⁾ n.b.: nicht bestimmt; ²⁾ Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)

In den Abbildungen 25 und 26 ist der Gärungsverlauf für beide geprüfte Zusätze im Vergleich zur Kontrolle bei den einzelnen TS-Stufen dargestellt.

Daran ist zunächst ablesbar, dass die Unterschiede in der Säuerungsintensität und der entsprechenden Auswirkungen auf den Gärungsverlauf zwischen beiden Zusatzstufen gering sind, wobei die Unterschiede in den beiden niedrigen TS-Stufen noch deutlicher erkennbar sind als bei den TS-Stufen ≥ 40 %.

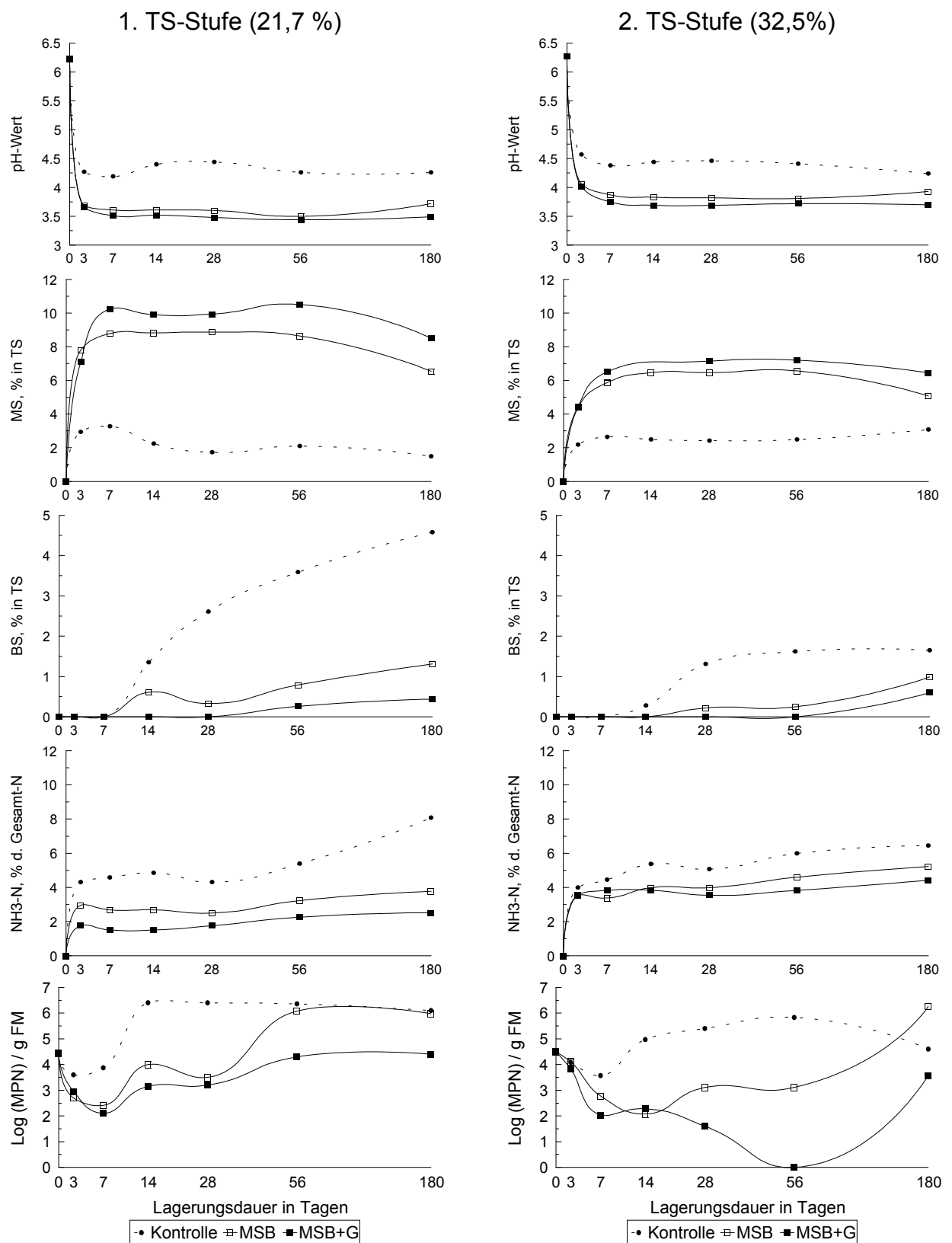


Abbildung 25: pH-Werte sowie Gehalte an Gärsäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 21,7 % und 32,5 % und bei Zusatz von MSB bzw. MSB + Glucose

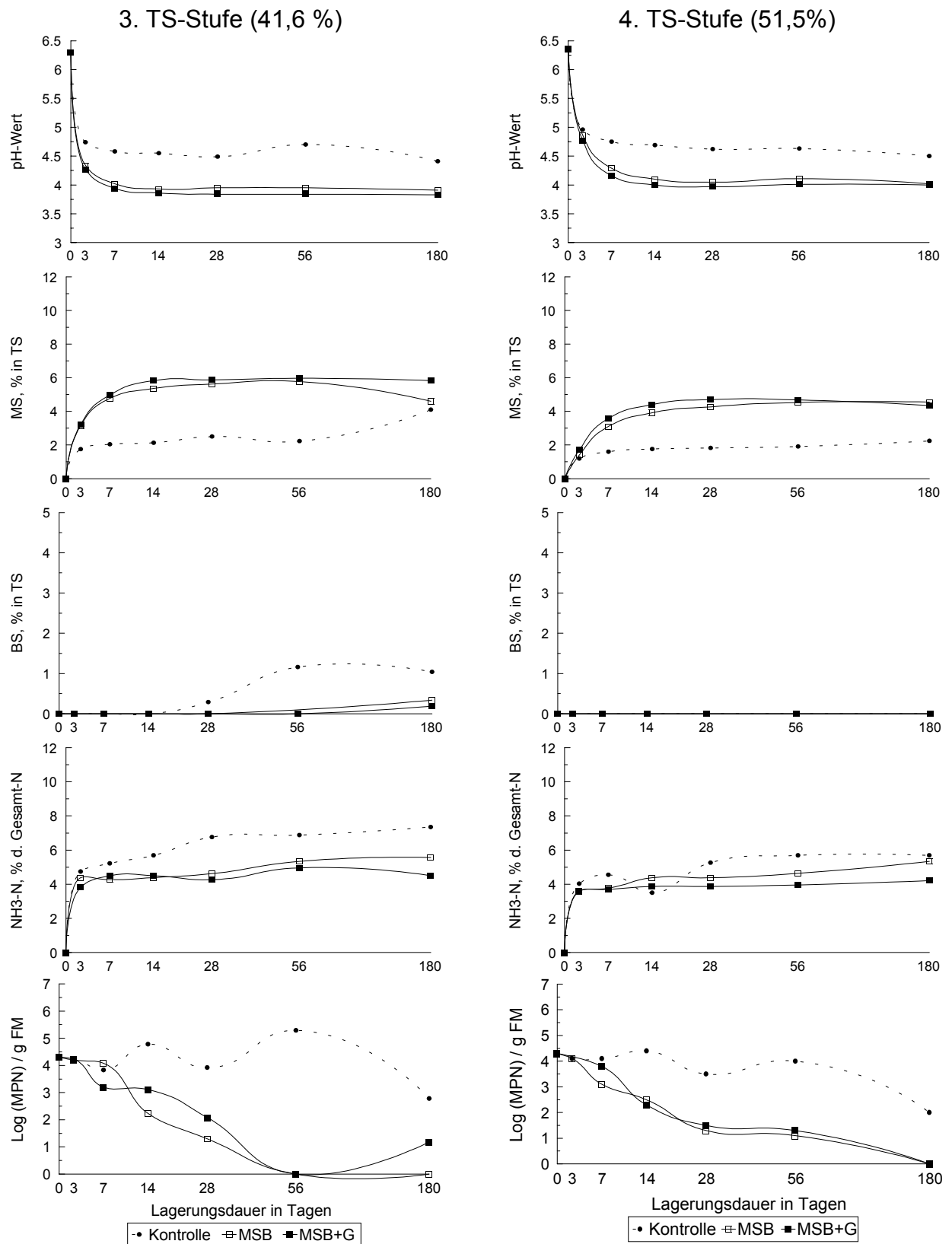


Abbildung 26: pH-Werte sowie Gehalte an Gärsäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 41,6 % und 51,5 % und bei Zusatz von MSB bzw. MSB + Glucose

Bemerkenswert sind die Auswirkungen der Säuerung auf den Clostridiensporengehalt. In den unteren beiden Stufen lag für beide Varianten zu Gärungsbeginn ein etwa gleicher Rückgang im Sporengehalt vor. Der darauf folgende Anstieg der Sporengelalte setzte bei MSB früher ein und erreichte ein stärkeres Ausmaß als in der Variante MSB + G. In den beiden oberen TS-Stufen ist bei beiden Varianten im Gärungsverlauf ein kontinuierlicher Rückgang im Sporengehalt zu verzeichnen. Zwischen den beiden Zusatz-Varianten lagen dabei kaum Unterschiede vor.

Insgesamt ist festzustellen, dass durch die zusätzliche Säuerung zwar eine Einschränkung der Buttersäuregärung hinsichtlich Beginn und Höhe der BS-Gelalte erreicht worden ist. Buttersäurefrei blieben im Gärungsverlauf aber nur die Silagen der oberen TS-Stufen (41,6 und 51,5 %).

Die mit Zunahme der TS-Gelalte beobachtete Einschränkung der Clostridiensporengelalte ist durch die zusätzliche Säuerung verstärkt worden.

4.2.3 Zur Wirkung des Nitratgelaltes

Die Wirkung des Nitrats auf Gärungsverlauf und Clostridiensporengehalt wurde in zwei Stufen der Dosierung geprüft:

- 0,10 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS; entspricht 4,43 g NO_3 /kg TS
- 0,15 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS; entspricht 6,65 g NO_3 /kg TS

In den Tabellen 36 und 37 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Wie daraus ersichtlich ist, blieben bei beiden Dosierungen von Nitrat die Silagen in allen Stufen des TS-Gelaltes bis zum Ende der Lagerungsdauer von 180 Tagen buttersäurefrei, obwohl die Milchsäurebildung und die damit verbundene pH-Absenkung etwas geringer waren als bei Zusatz von MSB bzw. MSB + G. Die Clostridiensporengelalte gingen in allen TS-Stufen im Gärungsverlauf kontinuierlich zurück. Zwischen den beiden Dosierungsstufen bestanden diesbezüglich keine Unterschiede. Offensichtlich ist der Rückgang des Sporengelaltes im Gärungsverlauf, auch bei Nitratzusatz, mit steigendem TS-Gehalt des Ausgangsmaterials verzögert.

In den Abbildungen 27 und 28 sind die Merkmale des Gärungsverlaufes bei Nitratzusatz im Vergleich zur Kontrolle für die einzelnen TS-Stufen graphisch dargestellt.

Daraus ist zunächst ablesbar, dass im Bereich der unteren beiden Stufen Milchsäuregärung und pH-Absenkung durch den Nitratzusatz stimuliert worden sind. In den beiden oberen TS-Stufen war ein solcher Effekt nicht nachweisbar. Das Ausmaß der Milchsäurebildung ist hier durch den Nitratzusatz kaum verbessert worden.

Auch die Ammoniakgelalte sind in allen TS-Stufen durch den Nitratzusatz nahezu nicht verändert worden.

Auffallend ist vor allem der Verlauf der Clostridiensporengelalte. In allen TS-Stufen war im Gärungsverlauf ein kontinuierlicher Rückgang der Sporengelalte zu verzeichnen. Mit steigenden TS-Gelalten des Ausgangsmaterials war dieser

Rückgang aber zunehmend verzögert. Während bei 21,7 % TS am 28. Tag kaum noch Sporen nachweisbar waren, entsprachen die Sporengehalte in der Stufe 51,5 % TS am 56. Tag noch nahezu der Ausgangskonzentration.

Demnach ist festzustellen, dass durch den Zusatz von Nitrat in allen TS-Stufen Buttersäuregärung unterbunden worden ist. Der hohe Sporenbesatz des Ausgangsmaterials ist im Gärungsverlauf durch den Nitratzusatz vermindert worden, allerdings um so langsamer, je höher der TS-Gehalt war. Zwischen den beiden Dosierungsstufen bestanden keine nennenswerten Unterschiede.

Tabelle 36: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes bei Zusatz von 0,1 % NO₃-N in TS in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

TS-Stufen	Tag (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₃ -N % des- Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen pro g FM
			Milch- säure	Essig- säure	Butter- säure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	111,9	2,8x10 ⁴
	3	4,4	2,8	0,8	0	4,0	42,4	2,4x10 ⁴
	7	4,2	3,4	1,0	0	3,5	29,9	6,0x10 ³
	14	4,1	4,5	1,0	0	4,3	26,3	1,8x10 ³
	28	3,9	6,0	1,1	0	4,3	19,7	45
	56	3,8	7,5	0,9	0	4,3	13,7	n.n.
	180	3,8	7,2	0,8	0	4,6	15,2	n.n.
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	91,8	3,4x10 ⁴
	3	4,8	1,9	0,7	0	4,0	40,6	6,8x10 ³
	7	4,6	2,3	1,0	0	4,1	27,3	1,1x10 ²
	14	4,5	2,8	1,2	0	5,8	27,4	1,9x10 ²
	28	4,2	4,0	1,2	0	6,0	24,5	0,4x10 ²
	56	4,1	4,9	1,2	0	6,4	19,6	n.n.
	180	4,0	4,8	1,4	0	6,4	19,5	3,7x10 ²
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	78,8	2,0x10 ⁴
	3	5,0	1,4	0,7	0	5,0	44,5	9,3x10 ³
	7	4,8	1,7	1,1	0	5,2	30,2	6,2x10 ³
	14	4,8	1,9	1,0	0	6,3	28,2	9,3x10 ³
	28	4,7	2,2	0,9	0	6,6	30,1	5,8x10 ³
	56	4,5	2,7	1,1	0	7,1	30,3	2,1x10 ³
	180	4,3	3,4	1,2	0	7,4	28,0	n.n.
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	69,0	1,6x10 ⁴
	3	5,1	1,0	0,5	0	3,9	48,4	1,9x10 ⁴
	7	5,0	1,2	0,7	0	4,8	30,7	8,7x10 ³
	14	4,9	1,4	0,8	0	5,2	25,6	2,8x10 ⁴
	28	4,8	1,5	0,9	0	5,9	29,4	1,7x10 ⁴
	56	4,8	1,7	1,0	0	6,4	32,9	1,7x10 ³
	180	4,5	2,1	1,2	0	4,7	31,4	n.n.

¹⁾ n.b.: nicht bestimmt; ²⁾ Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)

Tabelle 37: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes bei Zusatz von 0,15 % NO₃-N in TS in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

TS-Stufen	Tad (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₃ -N % des- Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen prog FM
			Milch- säure	Essig- säure	Butter- säure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	111,7	2,8x10 ⁴
	3	4,4	2,8	0,8	0	3,2	39,4	3,6x10 ³
	7	4,2	3,8	1,1	0	4,0	28,3	1,9x10 ³
	14	3,9	5,8	0,9	0	4,0	18,8	6,0x10 ²
	28	3,8	7,1	1,1	0	3,7	14,1	35
	56	3,7	7,9	1,0	0	4,3	11,2	20
	180	3,7	7,3	1,0	0	3,7	13,5	n.n.
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	91,5	3,4x10 ⁴
	3	4,8	1,9	0,7	0	4,7	39,6	2,4x10 ⁴
	7	4,6	2,3	1,0	0	5,0	27,9	1,2x10 ⁴
	14	4,5	2,7	1,1	0	5,3	24,2	1,4x10 ⁴
	28	4,2	3,8	1,2	0	5,8	22,2	2,0x10 ²
	56	4,1	5,3	1,2	0	6,4	13,8	35
	180	4,0	5,0	1,5	0	6,3	15,4	15
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	78,5	2,0x10 ⁴
	3	5,1	1,3	0,5	0	5,1	44,2	1,7x10 ³
	7	4,8	1,7	0,9	0	5,5	26,9	8,6x10 ³
	14	4,8	1,8	1,1	0	6,3	25,1	8,6x10 ³
	28	4,7	1,6	1,1	0	6,0	29,9	4,1x10 ³
	56	4,6	2,3	1,1	0	7,2	32,5	2,2x10 ²
	180	4,4	3,2	1,1	0	6,5	33,0	n.n.
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	68,7	1,6x10 ⁴
	3	5,2	0,9	0,6	0	4,2	48,2	-
	7	4,9	1,3	0,7	0	4,8	27,6	4,1x10 ³
	14	4,9	1,3	0,9	0	5,4	27,5	2,4x10 ⁴
	28	4,8	1,4	1,0	0	5,0	35,9	5,0x10 ³
	56	4,8	1,5	0,8	0	5,8	30,7	4,6x10 ³
	180	4,6	2,1	1,2	0	6,8	32,8	20

1) n.b.: nicht bestimmt; 2) Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)

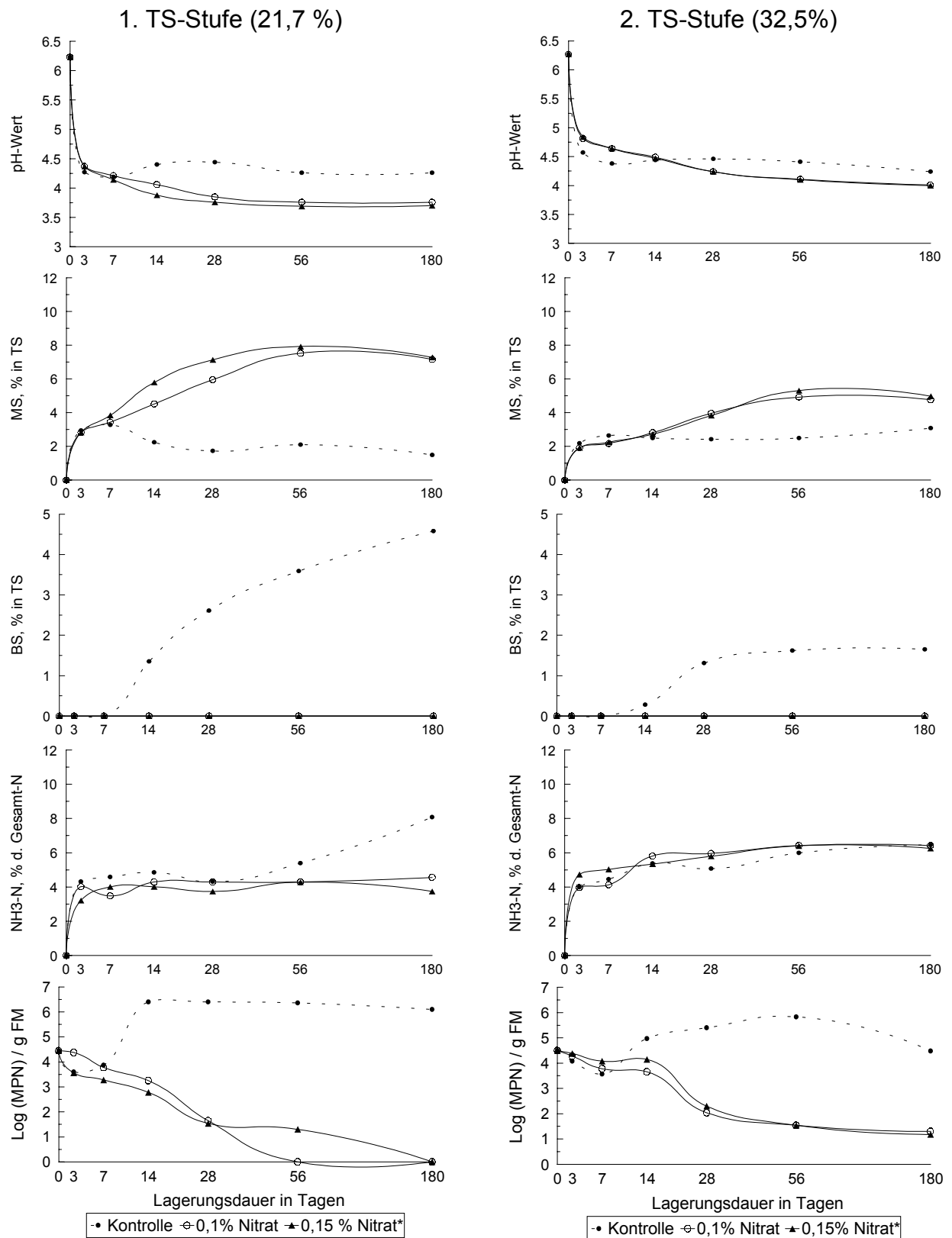


Abbildung 27: pH-Werte sowie Gehalte an Gärsäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 21,7 % und 32,5 % und bei Zusatz von Nitrat

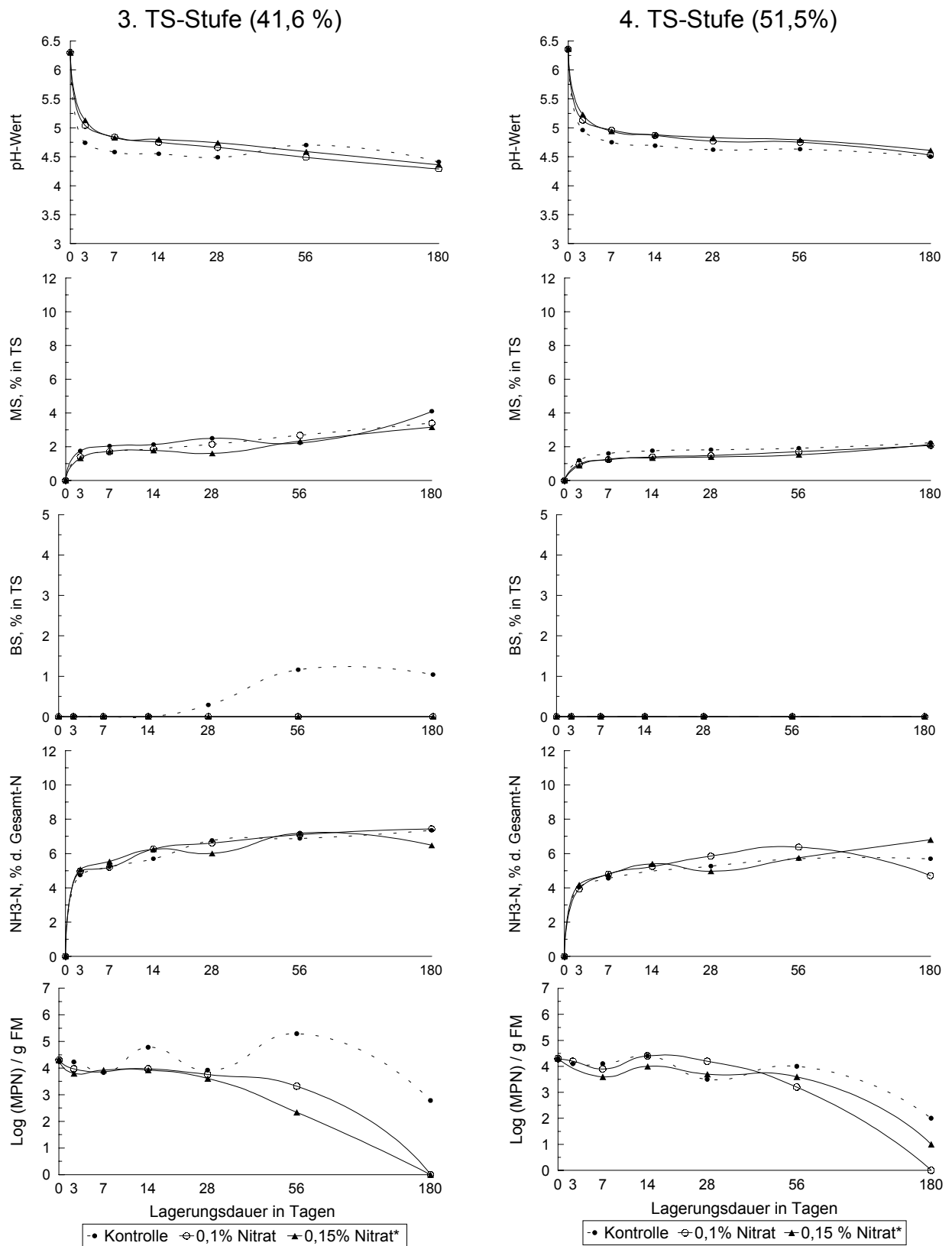


Abbildung 28: pH-Werte sowie Gehalte an Gärssäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 41,7 % und 51,5 % und bei Zusatz von Nitrat

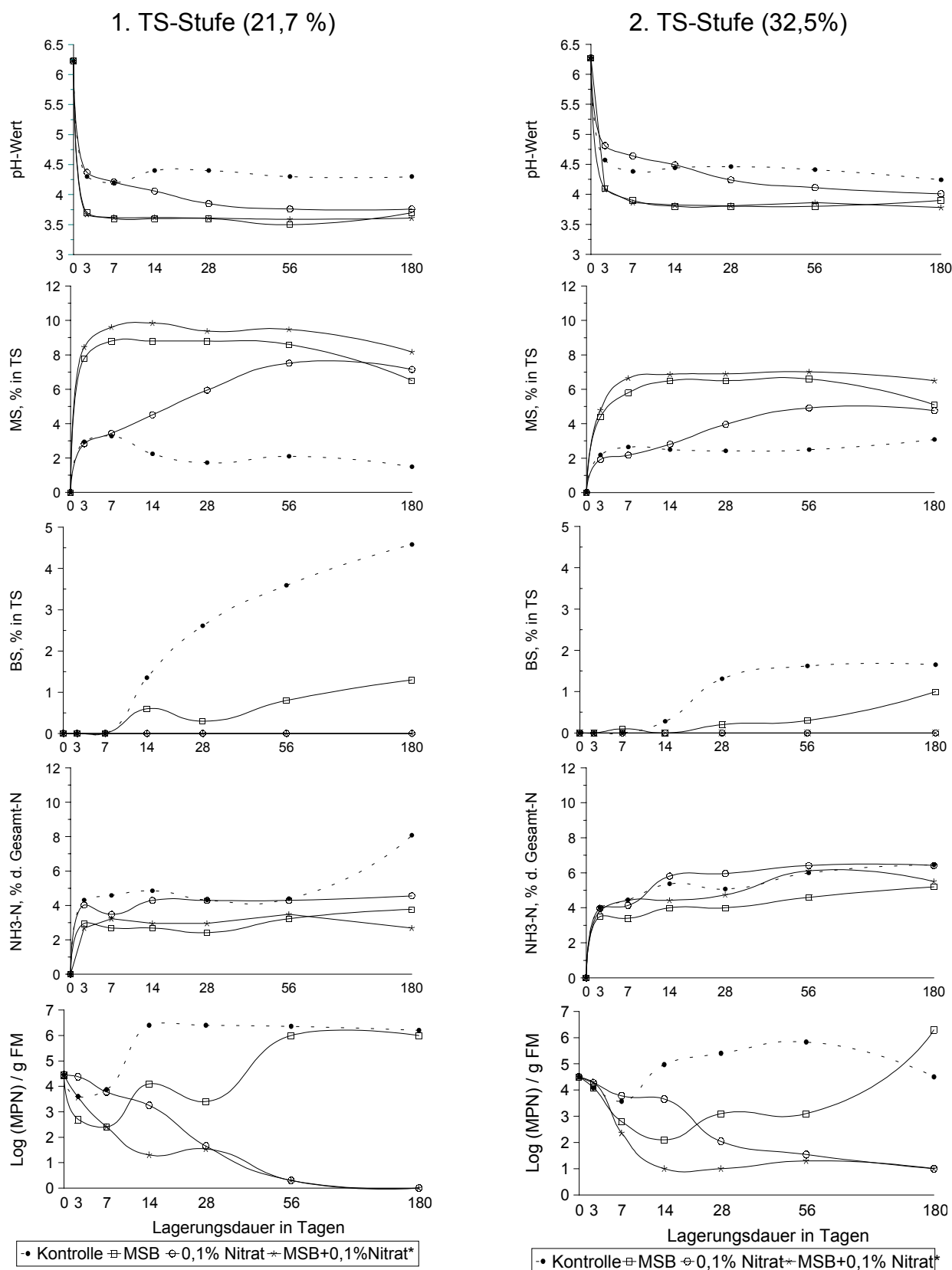
4.2.4 Zur Wirkung von Säuerung und Nitrat in Kombination

In Tabelle 38 sind die Ergebnisse für Gärqualität und Clostridiensporengehalt im Gärungsverlauf bei Zusatz von MSB + 0,10 % NO₃-N in TS zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, dass durch den gemeinsamen Zusatz von MSB plus Nitrat eine sehr starke Stimulierung der Milchsäuregärung eingetreten ist, so dass die pH-Werte sehr schnell und sehr stark zurückgingen. Alle Silagen waren im Gärungsverlauf buttersäurefrei. Die Gehalte an Ammoniak und Essigsäure waren durchgehend sehr niedrig, die Restzuckergehalte relativ hoch. Auffallend ist der schnelle Rückgang der Clostridiensporengehalte, auch in den höheren TS-Stufen.

Tabelle 38: Gärqualität und Gehalt an Clostridiensporen in Silagen während des Gärungsverlaufes bei Zusatz von MSB und 0,1 % NO₃-N in TS in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt des Ausgangsmaterials

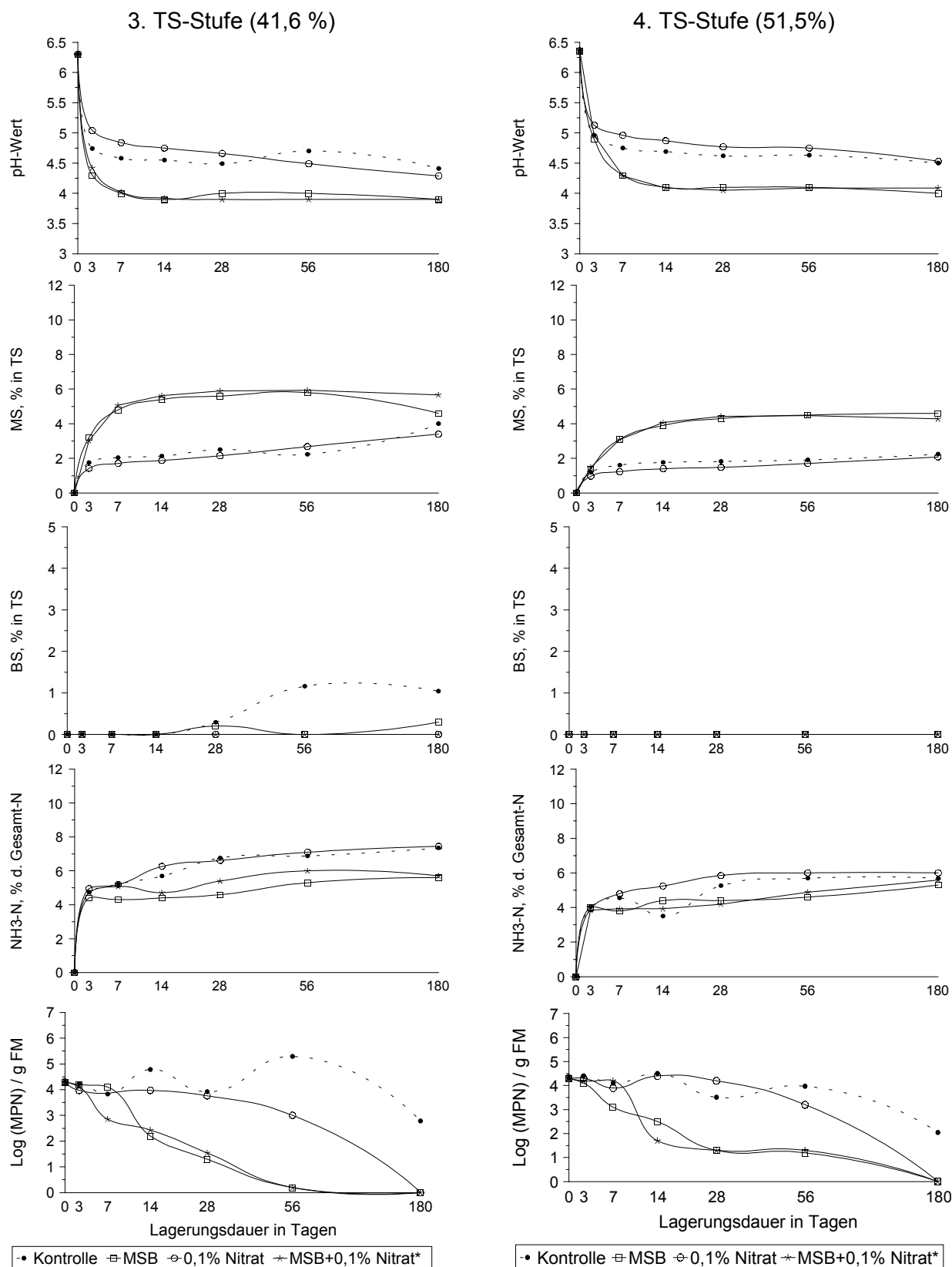
TS-Stufen	Tag (d)	pH	Gärsäuren: % in TS			NH ₃ -N % des- Ges.-N	WLKH ²⁾ g/kg TS	Sporen prog FM
			Milch- säure	Essig- säure	Butter- säure			
1. Stufe (21,7 % TS; Z/PK 3,1)	0	6,2	n.b. ¹⁾	n.b.	n.b.	n.b.	111,9	2,8x10 ⁴
	3	3,7	8,5	0,5	0	2,7	29,8	3,7x10 ³
	7	3,6	9,6	0,5	0	3,2	19,5	2,6x10 ²
	14	3,6	9,9	0,5	0	3,0	20,6	20
	28	3,6	9,4	0,6	0	3,0	21,8	35
	56	3,6	9,5	0,5	0	3,5	23,8	n.n.
	180	3,6	8,2	0,6	0	2,7	29,3	n.n.
2. Stufe (32,5 % TS; Z/PK 2,4)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	91,8	3,4x10 ⁴
	3	4,1	4,8	0,5	0	3,8	35,4	2,4x10 ⁴
	7	3,9	6,7	0,7	0	4,4	17,6	2,3x10 ²
	14	3,8	6,9	0,7	0	4,4	15,9	n.n.
	28	3,8	6,9	0,7	0	4,7	16,6	n.n.
	56	3,9	7,0	0,7	0	6,1	18,8	20
	180	3,8	6,5	1,0	0	5,5	25,5	20
3. Stufe (41,6 % TS; Z/PK 2,0)	0	6,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	78,8	2,0x10 ⁴
	3	4,4	3,0	0,5	0	4,7	42,9	1,3x10 ⁴
	7	4,0	5,1	0,6	0	5,1	20,6	7,0x10 ²
	14	3,9	5,6	0,7	0	4,7	17,2	2,7x10 ²
	28	3,9	5,9	0,7	0	5,4	15,6	35
	56	3,9	5,9	0,7	0	6,5	16,6	n.n.
	180	3,9	5,7	0,9	0	5,0	21,9	n.n.
4. Stufe (51,5 % TS; Z/PK 1,7)	0	6,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	69,0	1,6x10 ⁴
	3	5,0	1,5	0,4	0	3,8	48,3	1,7x10 ⁴
	7	4,3	3,1	0,6	0	3,9	26,3	1,7x10 ⁴
	14	4,1	4,1	0,7	0	3,9	19,2	50
	28	4,1	4,4	0,7	0	4,2	19,5	20
	56	4,1	4,5	0,7	0	4,9	19,1	20
	180	4,1	4,3	0,8	0	5,6	23,6	n.n.

¹⁾ n.b.: nicht bestimmt; ²⁾ Wasserlösliche Kohlenhydrate (WLKH)



* Angabe: % NO₃-N in TS

Abbildung 29: pH-Werte sowie Gehalte an Gärsäuren, Ammoniak und Clostriensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 21,7 % und 32,5 % und bei Zusatz von MSB oder Nitrat bzw. MSB+Nitrat



* Angabe: % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS

Abbildung 30: pH-Werte sowie Gehalte an Gärssäuren, Ammoniak und Clostridiensporen im Gärungsverlauf bei TS-Gehalten von 41,6 % und 51,5 % und bei Zusatz von MSB oder Nitrat bzw. MSB+Nitrat

In den Abbildungen 29 und 30 sind die Merkmale des Gärungsverlaufes sowie der Clostridiensporengleichgewicht für die Zusätze von MSB und 0,1 % $\text{NO}_3\text{-N}$, für die einzelnen TS-Stufen, einzeln und in Kombination gegenübergestellt.

Wie daraus hervorgeht, liegt in allen TS-Stufen für die Kombination beider Präparate eine andere Wirkung auf Gärungsverlauf und Clostridiensporengleichgewicht vor als für die jeweiligen Präparate allein.

Im Hinblick auf die Stimulierung der Milchsäuregärung und pH-Absenkung bestanden zwischen den Varianten MSB und MSB + Nitrat in den einzelnen TS-Stufen kaum Unterschiede. Jedoch ist bei MSB allein Buttersäuregärung in den unteren TS-Stufen nicht unterbunden worden und waren Spuren von Buttersäure auch in der TS-Stufe 41,6 % noch nachweisbar, während in der Kombination mit Nitrat Buttersäuregärung in allen TS-Stufen ausgeschaltet war. Auch ging bei der Kombination der Gehalt an Clostridien sporen selbst in der unteren TS-Stufe von Gärbeginn an zurück. Demgegenüber stieg bei MSB allein in den beiden unteren TS-Stufen der Sporengleichgewicht nach anfänglichem Rückgang mehr oder weniger weit über das Ausgangsniveau an. Erst in den oberen beiden TS-Stufen ging der Sporengleichgewicht auch bei Zusatz von MSB allein zurück.

Bei Zusatz von Nitrat allein war die Intensität der Milchsäurebildung in allen TS-Stufen erheblich geringer als bei MSB und MSB + Nitrat, wenn auch höher als in der Variante ohne Zusatz. Trotzdem waren alle Silagen dieser Variante in jeder TS-Stufe buttersäurefrei.

Der Rückgang des Sporengleichgewichtes im Gärungsverlauf war bei Nitratzusatz allein deutlich langsamer als bei Nitrat plus MSB. Während bei Kombination der Zusätze auch in den oberen TS-Stufen ein relativ schneller Rückgang des Sporengleichgewichtes zu verzeichnen war, blieb der Sporengleichgewicht bei Zusatz von Nitrat allein lange Zeit unverändert. Erst nach dem 56. Tag ging er langsam zurück.

Insgesamt ist demnach festzustellen, dass durch die Kombination der Zusätze von MSB und Nitrat der Gärungsverlauf sowohl im Hinblick auf die Unterbindung von Buttersäurebildung als auch in Bezug auf die Verminderung des Clostridiensporengleichgewichtes positiv beeinflusst worden ist.

Demgegenüber konnten bei alleinigem Zusatz von MSB Buttersäuregärung und Clostridienvermehrung trotz verstärkter Säuerung in dem für die Silierung bedeutsamen TS-Bereich (< 50 %) nicht ausgeschaltet werden.

Bei alleinigem Zusatz von Nitrat konnte zwar das Auftreten von Buttersäure vermieden werden. Die Hemmwirkung auf Clostridien war bei Kombination von Nitrat mit MSB jedoch wesentlich stärker.

5 Diskussion

5.1 Zum Mindestgehalt an Nitrat für die Erzielung buttersäurefreier Silagen

Die Ergebnisse der mehrfaktoriellen Versuche haben verdeutlicht, dass der Konservierungserfolg bei der Silierung, der im wesentlichen am Auftreten von Buttersäure in der Silage gemessen wird, nicht nur vom TS-Gehalt und Z/PK-Quotient im Ausgangsmaterial, sondern auch vom Nitratgehalt und Clostridiensporenbesatz des Grünfutters abhängig ist.

Es wurde festgestellt, dass bei weitgehendem Fehlen von Nitrat im Grünfutter auch in dem als leicht vergärbare einzuschätzenden Ausgangsmaterial in den Silagen Buttersäure auftrat, während beim selben Grünfutter bereits bei geringen Nitratzusätzen buttersäurefreie Silagen erzielt werden konnten (siehe Abb. 2). Der notwendige Nitratgehalt zur Erzielung buttersäurefreier Silagen war um so höher, je niedriger die am VK-Wert gemessene Vergärbarkeit des Grünfutters war, und umgekehrt. Bei erhöhtem Clostridiensporenbesatz des Grünfutters war der notwendige Nitratzusatz in allen Stufen der Vergärbarkeit höher als bei geringem Sporenbesatz und konnten auch bei sehr hohen VK-Werten keine buttersäurefreien Silagen erzielt werden. Bemerkenswert ist, dass die Grenzwertlinien für den Mindest-Nitratgehalt in Beziehung zum VK-Wert für geringen und hohen Clostridiensporenbesatz nicht parallel verlaufen (vgl. Abb. 22). Im Bereich niedriger VK-Werte ist der Mindest-Nitratgehalt für beide Sporenklassen annähernd gleich. Demgegenüber ist im Bereich sehr hoher VK-Werte der MNG bei sporenmäßigem Material wesentlich höher als bei sporenmäßigem Material.

Demnach gibt es keinen allgemeingültigen Mindest-Nitratgehalt für die Erzeugung buttersäurefreier Silagen. Der gesuchte Grenzwert hängt vielmehr von dem im Grünfutter gegebenen Verhältnis von TS-Gehalt zum Z/PK-Quotient und vom Clostridiensporenbesatz des betreffenden Siliergutes ab.

Angaben in der Literatur, die aus einem eher zufällig entstandenen Datenmaterial abgeleitet worden sind, (WEIßBACH und HONIG, 1996), wonach 0,5 g NO₃/kg TS (Weißbach und Honig, 1996), bzw. 1,0 g NO₃/kg TS (WEIßBACH, 1998) ausreichend seien, um buttersäurefreie Silagen zu erzielen, konnten demnach nicht bestätigt werden. Für derart geringe Nitratgehalte, die 0,01 bzw. 0,02 % NO₃-N in TS entsprechen, konnte in den vorliegenden Versuchen keine Hemmwirkung nachgewiesen werden, so dass derartiges Material eher als weitgehend nitratfrei zu bezeichnen ist.

Systematisch abgeleitete Grenzwerte für den Nitratgehalt liegen in der Literatur nur von KAISER (1981) vor. In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei Nitratgehalten unter 0,1 und über 0,3 % NO₃-N in TS höhere VK-Werte zur Erzielung buttersäurefreier Silagen erforderlich waren als im Bereich von 0,1 bis 0,3 % NO₃-N in TS. Aus diesem Ergebnis wurde von der Autorin die Schlussfolgerung gezogen, dass der Nitratgehalt des Grünfutters im Hinblick auf die Vergärbarkeit des Materials nicht berücksichtigt zu werden braucht.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass immer mit der Anwesenheit von Nitrat im Grünfutter zu rechnen sei und dass sich in dem genannten mittleren Bereich der Nitratgehalte die positiven und negativen Effekte des Nitrats auf den Gärungsverlauf im wesentlichen gegenseitig aufheben.

Trotz der bei KAISER (1981) anderen Wichtung des Nitratgehaltes im Hinblick auf die Vergärbarkeit besteht im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kein prinzipieller Widerspruch. Mit der vorliegenden Arbeit wurde vielmehr eine Erweiterung und Präzisierung der Ergebnisse zum Einfluss des Nitrats auf die Vergärbarkeit erreicht.

Zunächst ist zu beachten, dass in der Arbeit von KAISER (1981) nur der VK-Bereich zwischen 28 und 46 erfasst wurde, während in den eigenen Versuchen der VK-Bereich von 28,0 bis 59,5 geprüft worden ist. Für einen VK-Wert von 45, d.h. für einen VK-Wert, bei dem buttersäurefreie Silagen erwartet werden, wird von KAISER (1981) ein MNG von 0,1 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS (entspricht 4,4 g NO_3 je kg TS) genannt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde für VK 45 ein MNG von 3,7 g $\text{NO}_3/\text{kg TS}$ (\cong 0,08 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS für sporenarmes und von 4,9 g $\text{NO}_3/\text{kg TS}$ (\cong 0,11 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) für sporenreiches Ausgangsmaterial ermittelt.

Wie aus den vorliegenden Untersuchungen (vgl. Abb. 22) weiter hervorgeht, nimmt der MNG bei Rückgang der VK-Werte zu. Definitionsgemäß sind bei VK-Werten < 45 jedoch keine buttersäurefreien Silagen zu erwarten bzw. nimmt das Risiko für die Entstehung buttersäurehaltiger Silagen zu. Zwischen den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werten für MNG und dem von KAISER (1981) angegebenen Grenzwert für MNG besteht demnach kein Widerspruch. Nach den eigenen Ergebnissen kann jedoch festgestellt werden, dass buttersäurefreie Silagen auch bei VK-Werten unterhalb von 45 erzielt werden können, wenn der Nitratgehalt des Grünfutters ausreichend hoch ist, selbst bei sporenbelastetem Ausgangsmaterial.

Für VK-Werte oberhalb von 45 liegen in der Literatur keine konkreten Angaben für den notwendigen Nitratgehalt vor. In der Definition der VK-Werte findet dieser Bereich auch keine besondere Berücksichtigung, da bei einem Grünfutter mit $\text{VK} > 45$ (SCHMIDT et al., 1971; WEIßBACH et al., 1993; WEIßBACH und HONIG, 1996) generell buttersäurefreie Silagen erwartet werden.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ausweisen, trifft diese Annahme jedoch nicht zu. Auch in diesem VK-Bereich ist ein Mindest-Nitratgehalt zur Erzielung buttersäurefreier Silagen erforderlich und zwar um so mehr, je höher die Sporenbelastung des Ausgangsmaterials ist.

Für sporenarmes Grünfutter (unter 10^2 Sporen/g FM) wurde bei $\text{VK} = 60$ ein MNG von 1,3 g NO_3 je kg TS ermittelt. Das bedeutet, dass bei hohen VK-Werten auch bei annähernd nitratfreiem Grünfutter buttersäurefreie Silagen erzeugt werden können.

Bei erhöhtem Clostridiensporengehalt des Ausgangsmaterials wurde jedoch für $\text{VK} = 60$ noch ein MNG von 3,5 g $\text{NO}_3/\text{kg TS}$ (\cong 0,08 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS) ermittelt. In Untersuchungen von WEIß (2000) lagen auch bei nitratfreiem Grünfutter (ohne zusätzliche Clostridiensporenkontamination des Grünfutters) bei $\text{VK} 83$ noch Buttersäuregehalte von 1,3 % in TS vor. Bei erhöhter Clostridiensporenbelastung des Grünfutters ist demnach auch bei extrem hohen VK-Werten des Siliergutes noch ein beachtlicher Nitratgehalt erforderlich, um mit hoher Sicherheit buttersäurefreie Silagen erzeugen zu können.

Zum oberen von KAISER (1981) genannten Grenzwert von 0,3 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS (entspricht 13,3 % $\text{NO}_3/\text{kg TS}$) können anhand der vorliegenden Untersuchungen keine Aussagen abgeleitet werden. Angesichts der Tatsache, dass bei hohen Nitratgehalten im Grünfutter aufgrund der NH_3 -Bildung aus dem Nitrat negative Auswirkungen auf den Gärungsverlauf auftreten (HEIN, 1970; KAISER u.a. 1989), ist davon auszugehen, dass ein oberer Grenzwert für den optimalen Nitratgehalt im Grünfutter existiert.

Es ist jedoch zu erwarten, dass es sich auch hierbei nicht um einen unter allen Bedingungen feststehenden Wert handelt.

Es ist vielmehr davon auszugehen, dass im unteren VK-Bereich das Wiederauftreten von Buttersäure schon bei geringeren Nitratgehalten einsetzt als bei höheren VK-Werten (KAISER, 1981). Das bedeutet, dass bei niedrigen VK-Werten die Spanne für den optimalen Nitratgehalt kleiner ist als bei hohen VK-Werten. Dabei ist aber zu beachten, dass bei niedrigen VK-Werten ein relativ hoher Nitratgehalt erforderlich ist (MNG), von dem an die positiven Effekte des Nitrats auf die Unterbindung der Buttersäuregärung wirksam werden. Das "Umkippen" der Nitratwirkung in eine Förderung der Buttersäuregärung (aufgrund der NH_3 -Freisetzung) erfolgt hier wahrscheinlich nur bei wenig höheren Nitratgehalten. Demgegenüber ist bei hohen VK-Werten zwar der notwendige Mindest-Nitratgehalt geringer. Aufgrund der hier besseren Gärungsbedingungen ist mit den negativen Wirkungen des Nitrats aber erst bei relativ hohen Nitratgehalten zu rechnen.

Für diese Hypothese konnte mit der vorliegenden Arbeit kein experimenteller Beweis erbracht werden. Unter Berücksichtigung der Wirkungen des Nitrats auf den Gärungsverlauf ist jedoch anzunehmen, dass die Grenzwertlinie für den oberen zulässigen Nitratgehalt nicht parallel zur Grenze des Mindest-Nitratgehaltes verläuft.

Da hohe Nitratgehalte im Grünfutter unter den gegenwärtigen Produktionsbedingungen eher die Ausnahme darstellen, ist das Risiko negativer Auswirkungen hoher Nitratgehalte auf den Konservierungserfolg unter praktischen Bedingungen als geringer einzuschätzen als das Fehlgärungsrisiko aufgrund zu geringer Nitratgehalte.

Aus den zum Mindest-Nitratgehalt erzielten Ergebnissen kann insgesamt die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass die VK-Werte zur Einschätzung der Vergärbarkeit (SCHMIDT et al., 1971; WEIßBACH et al., 1974) keine unter allen Bedingungen gültigen Grenzwerte darstellen. Zur Einschätzung der Vergärbarkeit des Grünfutters im Hinblick auf den zu erwartenden Konservierungserfolg ist zusätzlich der tatsächlich gegebene Nitratgehalt zu berücksichtigen, wobei auch der Grad der Clostridiensporenbelastung des Grünfutters mit in Rechnung zu stellen ist. Zugleich folgt daraus aber auch, dass die gelegentlich anzutreffende Einschätzung des Nitratgehaltes mit Blick auf die Silierung als niedrig, mittel oder hoch nicht zutreffend sein kann. Die Wertung des Nitratgehaltes im Grünfutter kann in Bezug auf die Silierung nur in Verbindung mit den jeweils vorliegenden VK-Werten vorgenommen werden.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse von KAISER (1981) dürfte für praktische Verhältnisse – in grober Näherung – die Schlussfolgerung abzuleiten sein, dass die Einschätzung der Vergärbarkeit nach VK nur dann Gültigkeit hat, wenn das Grün-

futter mindestens 0,1 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS bzw. 4,4 g NO_3 je kg TS enthält. Bei geringeren Nitratgehalten ist insbesondere im VK-Bereich < 45 das Risiko für die Entstehung von Buttersäure größer als bisher angenommen wurde. Aber auch im Bereich der VK-Werte oberhalb von 45 ist ein bestimmter Gehalt an Nitrat zur Sicherung der Gärqualität erforderlich. Insbesondere bei verschmutztem, stark mit Clostridien sporen belastetem Grünfutter ist die Erhöhung der VK-Werte durch Anwelken allein nicht ausreichend, um Buttersäuregärung zuverlässig zu unterbinden.

Wie die Verlaufsversuche gezeigt haben, konnte bei TS-Gehalten ab etwa 50 % (VK = 65) Clostridienaktivität zwar eingeschränkt werden. Es handelt sich dabei aber um TS-Gehalte, die unter Berücksichtigung der Verdichtbarkeit des Materials für die praktische Silierung nicht mehr nutzbar sind.

5.2 Zur Bedeutung des Nitrats für die Gärqualität der Silagen

Wie die Ergebnisse der mehrfaktoriellen Versuche gezeigt haben, hatte das im Grünfutter enthaltene Nitrat nicht nur Auswirkungen auf die Entstehung von Buttersäure in der Silage sondern auch auf die anderen Merkmale der Gärqualität. Dabei ist bemerkenswert, dass durch die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials, insbesondere durch den Nitratgehalt, nicht nur die Konzentration an einzelnen Gärprodukten sowie der pH-Wert beeinflusst wurden, sondern auch ihr Verhältnis zueinander.

Bezüglich der Milchsäuregehalte war deutlich, dass bei nitratfreiem Grünfutter stets niedrigere Milchsäuregehalte in der Silage vorlagen als bei Material mit Nitratzusatz, auch dann, wenn das Grünfutter ausreichend Zucker enthielt. Die positiven Auswirkungen des Nitratzusatzes waren bei niedrigen VK-Werten besonders ausgeprägt. Sie waren jedoch auch im Bereich hoher VK-Werte deutlich erkennbar. Bei hohem Nitratgehalt im Grünfutter konnte z.T. jedoch auch ein Rückgang der Milchsäuregehalte beobachtet werden, und zwar auch eher bei niedrigen VK-Werten. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von WEIß (2000) überein. Er dürfte mit den unterschiedlichen Auswirkungen des Nitrates auf den Gärungsverlauf zu erklären sein, auch wenn in den durchgeführten mehrfaktoriellen Versuchen die Silagen nur am Ende des Gärungsverlaufes untersucht worden sind.

Nach HEIN (1970) sowie KAISER u.a. (1987) wird unabhängig vom später erreichten Konservierungserfolg zu Gärbeginn immer ein Teil des Nitrats über Nitrit zu nitrosen Gasen umgesetzt, wodurch eine direkte Hemmwirkung auf Clostridien ausgeübt wird (SPOELSTRA, 1983a). Bei nitratfreiem Grünfutter fehlt dieser inhibitorische Effekt, so dass angenommen werden kann, dass hier Clostridien als Nahrungskonkurrenten für Milchsäurebakterien wirksam werden. Dabei kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Nahrungskonkurrenz handelt, oder ob durch Clostridien die bereits gebildete Milchsäure wieder abgebaut wird. Da mit dem Zucker eine sofort verfügbare, leicht lösliche Substratquelle vorliegt und Clostridien zu Gärbeginn eine sehr schnelle Anfangsentwicklung aufweisen, erscheint der Abbau von Zucker und damit die Nahrungskonkurrenz besonders wahrscheinlich. Unabhängig davon, ob Zucker oder Milchsäure dem Abbau von Clostridien bei Fehlen von Nitrat anheim fallen, hat jedoch der Zusatz von Nitrat aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf Clostridien indirekt eine Förderung der Milchsäuregärung (Verbesserung der Milchsäureprodukti-

on) zur Folge. Dieser Effekt wirkt sich offensichtlich um so mehr positiv aus, je schwerer vergärbar das Ausgangsmaterial ist, d.h. je günstiger die Bedingungen im Substrat für Clostridienvermehrung sind.

Die in einigen Varianten beobachteten negativen Effekte hoher Nitratgehalte auf den Milchsäuregehalt (vgl. Abb. 5 und 6) dürften demgegenüber mit der Verknüpfung von Laktatabbau und Nitratreduktion zu erklären sein (KAISER und WEIßBACH, 1989). Da im Zusammenhang mit dem Laktatabbau Nitrat bis zum Ammoniak reduziert wird, kommt es zur Erhöhung des pH-Wertes im Gärungsmedium, wodurch der Laktatabbau weiter beschleunigt wird.

Hohe Nitratgehalte im Ausgangsmaterial sind demzufolge negativ für den Gärungsverlauf zu werten. Wie im Abschnitt 5.1 dargestellt, kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, bei welchen Nitratgehalten derartige Wirkungen auftreten. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zu den Nitratgrenzwerten ist aber damit zu rechnen, dass Auftreten und Ausmaß negativer Effekte des Nitrates auf den Milchsäuregehalt der Silagen einerseits von dem überschüssigen Betrag an Nitrat, der über den notwendigen Mindest-Nitratgehalt hinaus vorliegt, und andererseits vom TS-Gehalt und Säuerungsvermögen sowie von dem Belastungsgrad des Ausgangsmaterials mit Clostridien sporen bestimmt werden.

Bezüglich der Essigsäuregehalte der Silagen wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (KAISER u.a. 1997a,c; POLIP u.a. 1997; WEIß 2000) festgestellt, dass bei Fehlen von Nitrat im Ausgangsmaterial die Essigsäuregehalte nahezu durchgehend sehr niedrig waren. Beziehungen zum Gärungsverlauf konnten hier nicht beobachtet werden. Demgegenüber wurden bei Nitratzusatz zum Grünfutter bei einem großen Anteil der buttersäurehaltigen Silagen Essigsäuregehalte über 3 bis 7 % in TS gefunden. Buttersäurefreie Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter wiesen demgegenüber nur sehr geringe Essigsäuregehalte auf (vgl. Abb. 12b). Nach den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen (ISHIMOTO et al., 1974; YAMAMOTO und ISHIMOTO, 1981; KEITH et al., 1982) ist anzunehmen, dass die hohen Essigsäuregehalte der Silagen bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial auf die Wirkung des Nitrats als Wasserstoffakzeptor beim Laktat- oder Zuckerabbau zurückzuführen sind.

Wie von HEIN (1970) sowie HEIN und WEIßBACH (1977) nachgewiesen wurde, entscheidet die Anwesenheit von Nitrat im Gärsubstrat darüber, zu welchen Endprodukten der Laktatabbau führt. Bei Anwesenheit von Nitrat wurde Essigsäure gebildet. Nachdem das im Gärsubstrat vorhandene Nitrat vollständig reduziert war, entstand direkt Buttersäure. Das Auftreten von Buttersäure während des Laktatabbaus wurde so lange verhindert, wie Nitrat im Gärsubstrat vorhanden war. Solange Nitrat im Gärsubstrat vorhanden war, entstand aus dem Laktat Essigsäure, wobei das Nitrat bis zum Ammoniak reduziert worden ist. Daraus ist die Schlussfolgerung abzuleiten, dass die Höhe der erreichbaren Essigsäuregehalte in der Silage zum einen mit dem Nitratgehalt des Ausgangsmaterials, zum anderen mit den übrigen Gärungsbedingungen, von denen anaerobe Stabilität oder Instabilität (Laktatabbau) bestimmt werden, im Zusammenhang steht. In anaerob stabilen Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter d.h., in denen kein Laktatabbau stattfindet, ist demnach nur die Menge an Essigsäure vorhanden, die während der Hauptphase der Gärung bis zum Erreichen der stabilisierend wirkenden Aziditätsgrenze entsteht. Die Essigsäuregehalte buttersäurefreier Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter sind demzufolge gering.

Wie die Ergebnisse von WEIß (2000) ausweisen, entsteht auch bei nitratfreiem Grünfutter in anaerob stabilen Silagen nur sehr wenig Essigsäure. Da auch während des Laktatabbaus aufgrund des Fehlens von Nitrat als Wasserstoffakzeptor keine nennenswerten Mengen an Essigsäure entstehen, sondern Buttersäure, bleiben hier auch in anaerob instabilen Silagen die Essigsäuregehalte bis zum Ende der Lagerung auf dem zu Gärbeginn erreichten niedrigen Niveau.

Insgesamt ist damit festzustellen, dass die Essigsäuregehalte der Silagen in Abhängigkeit vom Nitratgehalt des Grünfutters in vergleichbaren Gärungsstadien unterschiedlich sind. Während gut konservierte, anaerob stabile Silagen in jedem Falle nur sehr geringe Essigsäuregehalte aufweisen, sind die Essigsäuregehalte im Falle von Fehlgärungen, d.h. bei Laktatabbau in Abhängigkeit vom Nitratgehalt, unterschiedlich. Bei nitratfreiem Grünfutter sind die Essigsäuregehalte ungeachtet des Auftretens und des Ausmaßes der Fehlgärung bzw. der Buttersäuregehalte sehr niedrig. Bei nitrathaltigem Grünfutter steigen demgegenüber die Essigsäuregehalte im Zusammenhang mit Fehlgärungen mehr oder weniger stark an. Für die praktische Silierung folgt daraus, dass die im Hinblick auf die aerobe Stabilität der Silagen angestrebten erhöhten Essigsäuregehalte in gut konservierten milchsauer Silagen nicht erreichbar sind, sondern nur dann, wenn es zu Fehlgärungen in der Silage kommt, und auch nur dann, wenn das Grünfutter Nitrat enthielt.

Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weiter hervorgeht, hatte der Nitratgehalt des Grünfutters auch Auswirkungen auf den NH_3 -Gehalt der Silagen, vor allem aber auf das Verhältnis von Ammoniak zu Buttersäure. Ein direkter Einfluss des Nitratgehaltes im Grünfutter auf den NH_3 -Gehalt der Silagen konnte kaum erwartet werden, weil der in der Silage nachgewiesene Ammoniak bekanntermaßen sowohl durch Reduktion des Nitrats als auch durch den Abbau von Aminosäuren gebildet werden kann. Zur Erklärung der NH_3 -Gehalte in den Silagen sind deshalb neben dem Nitratgehalt des Grünfutters auch die Gärungsprozesse mit heranzuziehen, die mit dem Abbau von Aminosäuren im Zusammenhang stehen.

Da bei nitratfreiem Grünfutter eine NH_3 -Bildung aus Nitrat nicht in Betracht kommt, können die hier gefundenen, z.T. hohen NH_3 -Gehalte, in den buttersäurehaltigen Silagen im wesentlichen nur auf den Aminosäureabbau zurückgeführt werden. Die in den buttersäurefreien Silagen festgestellten geringen NH_3 -Gehalte (vgl. Abb. 13) dürften demgegenüber als Hinweis darauf zu werten sein, dass auch aus den im Grünfutter enthaltenen freien Aminosäuren und anderen leicht löslichen Stickstoff-Verbindungen bei der Silierung Ammoniak gebildet werden kann.

Die NH_3 -Gehalte buttersäurefreier Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter waren ebenfalls gering. In der Tendenz jedoch geringfügig höher als bei nitratfreiem Ausgangsmaterial. Inwieweit hier auch die Nitratreduktion zu NH_3 eine Rolle gespielt haben kann, ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht direkt abzuleiten. HEIN (1970) sowie KAISER u.a. (1987) gehen davon aus, dass während der Phase der Milchsäuregärung bis zur Absenkung des pH-Wertes Nitrat nicht nur zu nitrosen Gasen sondern in geringem Umfang auch bis zum NH_3 abgebaut werden kann. Diese Aussage ist jedoch nur aus dem Gärproduktmuster abgeleitet worden, das am Ende des Gärungsverlaufes vorlag. In Untersuchungen zum Gärungsverlauf wurde von POLIP u.a. (1997) nachgewiesen, dass in solchen Silagen, in denen kein Laktat abgebaut wird, das Nitrat keinen Einfluss auf den NH_3 -Gehalt der Silagen hat. Daraus kann die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass es zu

Gärbeginn bei schneller Absenkung des pH-Wertes im Ergebnis der Milchsäuregärung nicht zu einer nennenswerten Nitratreduktion zu NH_3 kommt, so dass während dieser Gärungsphase keine zusätzliche Pufferwirkung durch NH_3 -Bildung aus Nitrat in Rechnung zu stellen ist.

Gegebenenfalls erhöhte NH_3 -Gehalte in buttersäurefreien Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter sind demnach eher auf eine Nitratreduktion im Zusammenhang mit dem Laktatabbau zurückzuführen, bei dem, wie beschrieben, Essigsäure entsteht.

Offen ist zunächst, inwieweit erhöhte NH_3 -Gehalte in der Silage auf eine Nitratreduktion oder auf Aminosäurenabbau zurückzuführen sind.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass eine enge Beziehung zwischen den Gehalten an Ammoniak und Buttersäure in der Silage besteht, wobei dann das Vorliegen von NH_3 , zumindest bei Gehalten von über 10 % am Gesamt-N, mit einem Aminosäurenabbau gleichgesetzt wird.

Nach neueren, in der Literatur vorliegenden, Ergebnissen trifft diese Annahme aber nur bedingt zu. In Untersuchungen von WEIß (2000) wurde festgestellt, dass ungeachtet des im Grünfutter vorhandenen Nitrats, sofern die stabilisierend wirkende Aziditätsgrenze nicht erreicht oder nicht dauerhaft aufrecht erhalten werden konnte, zunächst Zucker und Laktat abgebaut werden. Im Falle nitrathaltigen Ausgangsmaterials entsteht dabei Essigsäure und zugleich Ammoniak und zwar so lange, bis das Nitrat vollständig reduziert wurde. Danach entsteht keine Essigsäure mehr und es wird Buttersäure gebildet. Im Falle nitratfreien Grünfutters wird das Laktat unmittelbar zu Buttersäure umgesetzt, wobei kein NH_3 gebildet wird. Wie aus dem Verlauf der Stoffabbauprodukte in der Silage abgeleitet werden konnte, werden Aminosäuren erst in fortgeschrittenen Stadien der Fehlgärung abgebaut, nachdem Zucker und Laktat bereits abgebaut worden sind.

Der Verlauf der NH_3 -Bildung in den Silagen ist demnach in Abhängigkeit vom Nitratgehalt des Ausgangsmaterials unterschiedlich. Sofern erhöhte NH_3 -Gehalte in buttersäurefreien Silagen auftreten, so können sie nur auf Nitratreduktion und nicht auf Proteinabbau zurückgeführt werden. Aber auch in buttersäurehaltigen Silagen sind erhöhte NH_3 -Gehalte nicht ohne weiteres ein Ausdruck von Proteinabbau, da es sich hier um eine vorangegangene Nitratreduktion gehandelt haben kann. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten die NH_3 -Gehalte der Silagen erst bei Buttersäuregehalten von etwa 2 % in TS und darüber mit dem Aminosäuren- bzw. Proteinabbau in Zusammenhang gebracht werden. Wie die Ergebnisse weiterhin gezeigt haben, ist allerdings zu beachten, dass die NH_3 -Gehalte in vergleichbaren Stadien der Fehlgärung um so höher sind, je höher der Nitratgehalt des Ausgangsmaterials war.

Im Hinblick auf die Einschätzung der Gärqualität am Ende der Lagerung folgt daraus zum einen, dass aus der Höhe der NH_3 -Gehalte nicht auf das Ausmaß des Proteinabbaus geschlossen werden kann. Zum anderen ist auch zu berücksichtigen, dass je nach Nitratgehalt des Grünfutters das Verhältnis zwischen den Gehalten an Ammoniak und Buttersäure unterschiedlich ist. Hohe NH_3 -Gehalte (etwa über 15 % NH_3 -N am Gesamt-N) sind zwar größtenteils als Ausdruck von Fehlgärung zu werten.

Aus niedrigeren NH_3 -Gehalten (auch unter 10 % NH_3 -N-Anteil) kann jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass keine Fehlgärungen vorgelegen haben, z.B. können niedrige NH_3 -Gehalte dann vorkommen, wenn bei nitratfreiem Ausgangsmaterial Laktatabbau (Fehlgärung) stattfindet. Die Höhe der NH_3 -Gehalte steht demzufolge nicht nur mit dem Grad der Fehlgärung in den Silagen sondern auch mit der chemischen Zusammensetzung des Ausgangsmaterials in Zusammenhang. Da unter praktischen Bedingungen davon auszugehen ist, dass neben nitratfreiem Grünfutter auch solches mit unterschiedlichen Nitratgehalten zur Silierung gelangt, ist die Höhe des NH_3 -Gehaltes in Silagen kein geeignetes Kriterium zur Beurteilung der Gärqualität.

Wie aus den Ergebnissen der Arbeit weiterhin hervorgeht, hatte der Nitratgehalt des Ausgangsmaterials auch Auswirkungen auf den pH-Wert der Silagen. Es hat sich gezeigt, dass das Nitrat nicht nur einen Einfluss auf die Beziehung zwischen dem pH-Wert und dem Buttersäuregehalt der Silage hat. Offensichtlich wird durch das Nitrat auch der kritische pH-Wert zur Unterbindung von Buttersäuregärung beeinflusst.

Der gefundene Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der Silagen und dem Buttersäuregehalt, der erwartungsgemäß in Abhängigkeit vom TS-Gehalt unterschiedlich war, dürfte zunächst auf die Aziditätsabhängigkeit der Clostridienentwicklung zurückzuführen sein.

Wie die Ergebnisse gezeigt haben, war aber in jeder TS-Stufe, in der eine signifikante Beziehung zwischen pH-Wert und Buttersäuregehalt vorgelegen hat, der Anstieg des pH-Wertes mit zunehmendem Buttersäuregehalt bei Vorliegen von Nitrat höher als bei Fehlen von Nitrat, wobei die Zunahme des pH-Anstiegs bei steigendem TS-Gehalt vergrößert war (vgl. Abb. 14). Unter Berücksichtigung der Nitratreduktion zu Ammoniak, die im vorangegangenen Abschnitt diskutiert worden ist, kann dieser Effekt auf die Freisetzung von Basenäquivalenten aus dem Nitratabbau zurückgeführt werden.

Der pH-Wert der Silage, in Beziehung zum TS-Gehalt, stellt in den derzeit gültigen Bewertungsschemata zur Beurteilung der Gärqualität neben den Gärsäuregehalten ein maßgebliches Beurteilungskriterium dar (WEIßBACH und HONIG, 1992; WEIßBACH und HONIG, 1999). Häufig wird vereinfachend auch der pH-Wert im Vergleich zum TS-Gehalt als alleiniges Bewertungsmerkmal verwendet. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss jedoch festgestellt werden, dass der pH-Wert der Silage, ebenso wie der NH_3 -Gehalt, aufgrund seiner Beeinflussbarkeit durch die chemische Zusammensetzung des Ausgangsmaterials, für die Beurteilung der Gärqualität nicht geeignet ist. Bei ein und demselben pH-Wert kann ein sehr unterschiedlicher Grad der Fehlgärung vorliegen.

Darüber hinaus bringt das in Abhängigkeit vom Nitratgehalt veränderte Verhältnis zwischen pH-Wert und Buttersäuregehalt aber auch zum Ausdruck, dass in Gegenwart von Nitrat eine stärkere Hemmwirkung auf Clostridienaktivität vorliegt als bei Fehlen von Nitrat.

Wie aus den Ergebnissen der durchgeführten Versuche hervorgeht (vgl. Abb. 14), ist in Gegenwart von Nitrat der notwendige Aziditätsgrad zur Unterbindung von Buttersäuregärung geringer als bei Fehlen von Nitrat. Das heißt, der kritische pH-Wert liegt bei Fehlen von Nitrat tiefer als bei nitrathaltigem Material. Wie sich ge-

zeigt hatte, trifft der bisher als gültig angesehene kritische pH-Wert (WEIßBACH, 1968; WEIßBACH und HONIG, 1996) nur für nitrathaltiges Material zu. Bei Fehlen von Nitrat im Gärsubstrat liegt der kritische pH-Wert um ca. 0,2 bis 0,5 pH-Einheiten tiefer.

Daraus ist die Schlussfolgerung abzuleiten, dass bei der Silierung von nitratfreiem oder -armem Grünfutter eine deutlich stärkere Aziditätsabsenkung erforderlich ist als bisher angenommen wurde. Ob Clostridienaktivität in der Silage allein durch Säuerung unterbunden werden kann oder ob zusätzlich die Wirkung eines Inhibitors erforderlich ist (und unter welchen Bedingungen), kann daraus aber noch nicht abgeleitet werden.

Aus dem durchgeführten Verlaufsversuch, bei dem der Zusatz von MSB bzw. MSB plus Glucose zu einer starken Säuerung geführt hat, ging hervor, dass bei nitratfreiem Grünfutter Clostridienentwicklung durch Intensivierung der natürlichen Säuerung nicht mit Erfolg verhindert werden konnte, insbesondere im TS-Bereich unter 40 %. Das bedeutet, dass für den Erfolg der Silierung die Förderung der Milchsäuregärung nur bedingt ausreichend ist. Wie aus den Gärverläufen bei Zusatz von Nitrat abzuleiten ist, ist zumindest im unteren TS-Bereich zusätzlich die Hemmwirkung eines Inhibitors in Form von Nitrat oder Nitrit erforderlich. Im oberen TS-Bereich wird zunehmend der inhibitorische Effekt der eingeschränkten Wasseraktivität wirksam, so dass die Bedeutung des Nitratgehaltes hier zunehmend geringer wird. Bei hoher Clostridien sporenbelastung des Ausgangsmaterials ist allerdings auch bei TS-Gehalten über 40 % noch Nitrat erforderlich.

5.3 Zur Bedeutung des Nitrats für den Clostridien sporengehalt in Silagen

Neben der Wirkung des Nitrats auf die von Clostridien gebildeten Stoffwechselprodukte können aus den durchgeführten Versuchen auch Aussagen zur Wirkung auf den Clostridien sporengehalt abgeleitet werden.

Wie aus den Ergebnissen der mehrfaktoriellen Versuche hervor ging, sind hohe Sporengehalte vor allem, aber nicht ausschließlich, in buttersäurehaltigen Silagen aufgetreten. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Buttersäuregehalte und dem Sporengehalt, wie er häufig angenommen wird, war jedoch nicht erkennbar. Hohe Sporengehalte sind vor allem dann aufgetreten, wenn das Ausgangsmaterial nitratfrei war oder nur geringe Nitratgehalte aufwies. Bei Nitratzusatz war in der Tendenz ein Rückgang der Sporengehalte festzustellen.

Die Ergebnisse des Verlaufsversuches, bei dem der Verlauf der Stoffumsetzungen und die Veränderungen der Clostridien sporengehalte während der Gärung von nitratfreiem, sporenbelastetem Ausgangsmaterial geprüft worden sind, haben gezeigt, dass bei erhöhtem TS-Gehalt des Ausgangsmaterials sowohl die Stoffwechselaktivität von Clostridien als auch ihre Sporenbildung eingeschränkt wird. In der niedrigsten TS-Stufe (ca. 20 % TS) ging der Sporengehalt nach der Einlagerung des Grünfutters in den Silo zunächst deutlich zurück. Der anfängliche Rückgang des Sporenbesatzes, der in diesem Zusammenhang durch die Sporenkeimung zu erklären sein dürfte (GIBSON 1965), war um so langsamer und um so weniger ausgeprägt, je höher der TS-Gehalt des Ausgangsmaterials war. Erst zu einem späteren Zeitpunkt trat Buttersäurebildung auf. Etwa zeitgleich mit dem Auftreten von Buttersäure stieg der Sporengehalt wieder an. Das zuletzt genannte

Phänomen setzte um so später ein, je höher der TS-Gehalt des Ausgangsmaterials war, d.h. je geringer die Wasserverfügbarkeit im Gärmedium ist.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass durch Anwelken des Grünfutters die Entwicklung von Buttersäurebakterien bei der Silierung von der Sporenbildung an eingeschränkt wird. Wie aus den Ergebnissen der höheren TS-Stufen abzuleiten ist, tritt eine Sporenkeimung noch bei relativ hohen TS-Gehalten ($\geq 50\%$) ein. Offensichtlich liegt für den Übergang der Keime in die stoffwechselaktive Phase aber ein höherer Anspruch an die Wasserverfügbarkeit vor als für die Sporenkeimung. Das bedeutet, dass die Vermeidung von clostridialer Stoffwechselaktivität (Buttersäurebildung) bei einem vergleichsweise geringerem TS-Gehalt (Anwelkgrad) möglich ist als die Verringerung der ursprünglich im Grünfutter vorhandenen Sporengehalte.

Da nur stoffwechselaktive Zellen auch wieder sporulieren können, folgt daraus für die praktische Silierung, dass zur Vermeidung der Stoffwechselaktivität von Clostridien und deren erneuter Sporulation bei nitratfreiem Ausgangsmaterial ein höherer TS-Gehalt notwendig ist (über 40%) als bisher angenommen wurde. Eine spürbare Einschränkung der im Ausgangsmaterial vorhandenen Sporengehalte (ohne Auftreten von Stoffwechselprodukten) kann aber erst bei TS-Gehalten erreicht werden, die für die praktische Silierung als zu hoch anzusehen sind (über 50%).

In der Phase der zurückgehenden Sporengehalte, (durch Prozesse bei der Umwandlung von Sporen in die vegetative Form) wurde noch keine Buttersäure nachgewiesen. Vermutlich haben nach der Keimung zunächst das Wachstum und die Vermehrung von Zellen stattgefunden, bevor Buttersäure als Ergebnis der Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden konnte.

Bemerkenswert ist, dass der Wiederanstieg der Sporengehalte in jedem Falle erst dann nachzuweisen war, wenn auch Stoffwechselaktivität bzw. Buttersäurebildung stattgefunden hatte. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von MÜLLER u.a. (1989). Er bestätigt auch die Ergebnisse der eigenen mehrfaktoriellen Versuche, wonach hohe Sporengehalte fast ausschließlich in buttersäurehaltigen Silagen zu finden waren.

Nach Angaben in der Literatur (HERRERO, 1983; LONG et al., 1984; WOODS und JONES, 1986) wirken die Gärsäuren, die im Verlauf der Stoffwechselaktivität von Clostridien entstanden sind, hemmend auf die vegetativen Zellen. Diese Hemmwirkung führt zunächst zur Abnahme der Wachstumsrate der Zellen und anschließend zur Auslösung der Sporenbildung. Diese Zusammenhänge wurden von LONG et al. (1984) durch Zusatz von Essigsäure und Buttersäure in nicht sporulierende Kulturen von Clostridien nachgewiesen. Vermutlich stellt die Akkumulation von Buttersäure und Essigsäure im Gärsubstrat die Ursache für die Sporenbildung in Silagen dar.

Die Stimulierung der Säuerung durch Zusatz von Milchsäurebakterien (MSB) bzw. von MSB + Glucose hatte eine deutliche Einschränkung der Buttersäuregehalte zur Folge. Eine erfolgreiche Unterbindung von Clostridienaktivität bei der Silierung von nitratfreiem Material durch Zusatz von MSB bzw. MSB plus Glucose konnte aber erst festgestellt werden, wenn der TS-Gehalt des betreffenden Materials auf 40% oder darüber erhöht war. Im Hinblick auf die Sporenbildung lag ein ähnli-

cher Sachverhalt vor (vgl. Abb. 23 u. 24). In den ersten Stadien der Gärung gingen die Clostridiensporengehalte zwar ebenfalls zurück, sogar deutlich stärker als ohne Zusatz. In den beiden unteren Stufen des TS-Gehaltes stiegen sie danach aber wieder auf ein sehr hohes Niveau an, obwohl die Buttersäuregehalte mit unter 1 % in TS recht niedrig waren. Nur in den beiden oberen TS-Stufen, 41,6 und 51,5 %, lag ein anhaltender Rückgang der Sporengehalte im Gärungsverlauf vor und trat kein Wiederanstieg der Sporenkonzentration ein.

Demnach hat die Intensivierung der Milchsäuregärung, die ihren Niederschlag in wesentlich tieferen pH-Werten gefunden hat, vor allem die Stoffwechselaktivität von Clostridienzellen eingeschränkt. Sie reichte aber nicht aus, um alle Zellen am Wachstum und an ihrer Weiterentwicklung zu hindern, zumindest in den beiden unteren TS-Stufen. Neben der Einschränkung der Stoffwechselaktivität führten die Intensivierung der Säuerung und die damit verstärkte pH-Absenkung zu einer Verzögerung der Sporulationsprozesse. Trotzdem konnte eine umfangreiche Sporenbildung zu einem späteren Zeitpunkt im Gärungsverlauf nicht verhindert werden. Nach dem Vergleich der Sporengehalte in den einzelnen TS-Stufen ist jedoch anzunehmen, dass erfolgreiche Verhinderung von Clostridienwachstum erst in Verbindung mit der zunehmend eingeschränkten Wasseraktivität eingetreten ist. Ob auch eine Abtötung von Clostridien auch in den unteren TS-Stufen stattgefunden hat, kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Offensichtlich waren in den beiden unteren TS-Stufen aufgrund der hohen Wasseraktivität trotz niedrigen pH-Wertes aber noch Bedingungen für Clostridienaktivität gegeben, wenn sie hier auch weniger zu Stoffwechselaktivität geführt hat sondern vielmehr eine umfangreiche Sporulation zur Folge hatte.

Demnach führt die Säuerung im Gärungsmedium allein, ohne Vorliegen eines Clostridieninhibitors, zwar zu einer Einschränkung der Stoffwechselaktivität von Clostridien. Eine erfolgreiche Verhinderung der Sporenvermehrung tritt trotz Säuerung aber erst dann ein, wenn eine inhibitorische Wirkung infolge eingeschränkter Wasseraktivität gegeben ist. Ist eine solche inhibitorische Wirkung verminderter Wasseraktivität nicht vorhanden, d.h. bei relativ niedrigen TS-Gehalten, dann können trotz niedriger Buttersäuregehalte hohe Gehalte an Sporen vorliegen.

Bei Zusatz von Nitrat waren die Silagen während des Gärungsverlaufes in allen TS-Stufen buttersäurefrei, wobei kein Unterschied zwischen den Dosierungsstufen 0,1 und 0,15 % $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS vorgelegen hat (vgl. Abb. 27 und 28). In den beiden unteren TS-Stufen war bei Nitratzusatz zwar eine langsamere pH-Absenkung gegeben als ohne Nitratzusatz. Trotzdem wurde Buttersäurebildung erst bei Vorliegen von Nitrat mit Erfolg verhindert. Der positive Effekt auf die Unterbindung von Clostridienaktivität dürfte deshalb vor allem auf die inhibitorische Wirkung des Nitrats bzw. des aus Nitrat gebildeten Nitrits zurückzuführen sein. Der von Gärbeginn an kontinuierliche Rückgang der Sporengehalte ohne nachweisbare Buttersäurebildung auch in den unteren TS-Stufen, dürfte auf den inhibitorischen Effekt der aus dem Nitrat entstehenden Hemmstoffe zurückzuführen sein. Vermutlich ist die Abtötung nach Auskeimen der Sporen erfolgt, so dass keine clostridialen Stoffumsetzungen und keine erneute Sporulation erfolgen konnten und der Ausgangsgehalt an Sporen zurückging.

Bemerkenswert ist auch hier die Verlangsamung des Sporenrückgangs mit Anstieg der TS-Gehalte, die mit dem verstärkten Wasserentzug erklärt werden kann. Auf die Dynamik der Sporenkeimung dürfte die Anwesenheit von Nitrat im Grün-

futter keinen Einfluss haben. Aber mit der Freisetzung von Hemmstoffen während der Nitratreduktion tritt ein wirksamer inhibitorischer Effekt ein, durch den die Keime schnell zerstört werden, bevor sie in die stoffwechselaktive Form übergehen können (DUCAN und FOSTER, 1968).

Bei nitrathaltigem Grünfutter ist demnach zu erwarten, dass im Bereich der TS-Gehalte, die für die praktische Silierung von Bedeutung sind, durch das Nitrat nicht nur ein positiver Effekt auf die Unterbindung von Buttersäuregärung vorliegt, sondern auf die Vermeidung der Clostridiensporenbildung. Bei höheren TS-Gehalten, etwa oberhalb von 40 %, ist mit einem solchen Effekt auf die Sporengelalte aber nur mit Einschränkung zu rechnen, vermutlich infolge Verlangsamung der Nitratreduktion bei eingeschränkter Wasseraktivität.

Die Kombination der Zusätze von MSB und Nitrat hat in allen TS-Stufen zu einem positiven Ergebnis sowohl bezüglich der Unterbindung von Buttersäuregärung als auch der Verminderung des Clostridiensporengelaltes geführt, wenn auch die Wirkung der Einzelkomponenten in den geprüften TS-Stufen unterschiedlich war (vgl. Abb. 29 und 30). Während in den beiden unteren TS-Stufen (21,7 und 32,5 %) durch den Nitratzusatz sowohl bezüglich der Vermeidung von Buttersäure als auch der Reduzierung der Sporengelalte eindeutig positive Effekte vorgelegen haben, traf dies für den Zusatz von MSB für beide Wirkungsrichtungen nicht zu. Es wurden durch MSB nur die Gelalte an Buttersäure eingeschränkt. Demgegenüber hatte der Zusatz von MSB in den beiden oberen TS-Stufen eine nachhaltige Vermeidung der Sporenanreicherung zur Folge. Bei Nitratzusatz war hier der Rückgang der Sporengelalte mehr oder weniger stark verzögert. Buttersäurebildung war in diesem TS-Bereich bei beiden Zusätzen ausgeschaltet.

Geht man davon aus, dass die inhibitorischen Effekte der hier geprüften Einflussfaktoren nicht auf Clostridiensporen sondern nur auf die vegetativen Keime wirksam werden können, so ist aus dem Vergleich der Kurvenläufe in den Abbildungen 29 und 30 die Schlussfolgerung abzuleiten, dass bei ausreichender Wasseraktivität, die Sporen trotz relativ niedriger pH-Werte auskeimen und in die stoffwechselaktive Phase übergehen können. Offensichtlich ist in dem Feuchtebereich (a_w -Bereich), in dem Stoffwechselaktivität stattfindet, auch die Sporenbildung möglich.

Bei Rückgang der Wasseraktivität, hier bei TS-Gehalten von etwa über 40 %, werden aber nicht nur Stoffwechsel und Sporulation eingeschränkt. Hier tritt dann offensichtlich auch eine Abtötung der Keime ein. Es dürfte sich hierbei nicht allein um eine Hemmwirkung infolge eingeschränkter Wasseraktivität handeln. Es ist eher anzunehmen, dass dieser Effekt auf die höhere Säureempfindlichkeit der Clostridien bei verminderter Wasserverfügbarkeit, der auch im kritischen pH-Wert seinen Ausdruck findet, zurückzuführen ist (WEIßBACH, 1968; McDONALD u.a., 1991).

Im Bereich noch ausreichender Wasserverfügbarkeit, hier bei TS-Gehalten unter

40 %, liegt offensichtlich eine größere Säuretoleranz der Clostridien vor, als bisher angenommen wurde. Hier ist deshalb zusätzlich die Wirkung eines Inhibitors, z.B. in Form des Nitrats (oder Nitrits), erforderlich, um Clostridien abzutöten.

Im TS-Bereich über 40 % war die zusätzliche Wirkung des Nitrats als Inhibitor für die Sporenvermehrung nicht zwingend erforderlich. Wie die Ergebnisse der mehrfaktoriellen Versuche, in Übereinstimmung mit der Literatur (WEIß, 2000) ausweisen, ist bei Fehlen von Nitrat in diesem TS-Bereich jedoch ein Risiko für die Entstehung von Buttersäure gegeben und die Wirkung von Welken und MSB-Zusatz nicht sicher.

Für die praktische Silierung ist aus diesem Ergebnis die Schlussfolgerung abzuleiten, dass durch MSB-Zusatz durch Zusatz von biologischen Siliermitteln in Kombination mit dem Welken auch bei nitratfreiem Grünfütter das Risiko für die Entstehung hoher Buttersäuregehalte eingeschränkt werden kann. Eine sichere Ausschaltung dieses Risikos ist jedoch erst bei TS-Gehalten gegeben, die für die praktische Silierung nicht mehr in Betracht kommen.

Bei TS-Gehalten oberhalb von 40 % ist die Entstehung sporenarmer Silagen zu erwarten. Bei TS-Gehalten unter 40 % ist jedoch trotz verminderter Buttersäuregehalte mit einem mehr oder weniger hohen Clostridiensporenbesatz zu rechnen. Unter Berücksichtigung der bei Nitratzusatz erzielten Ergebnisse dürften hier zur sicheren Ausschaltung von Buttersäuregärung und Clostridiensporenbildung nitrit-haltige Zusätze in Betracht kommen, insbesondere bei nitratfreiem oder nitratarmem Ausgangsmaterial.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht zum Einen darin, den im Grünfutter notwendigen Mindest-Nitratgehalt zur Erzielung buttersäurefreier Silagen zu ermitteln, wobei sowohl TS-Gehalt und Z/PK-Quotient des Ausgangsmaterials als auch dessen Belastungsgrad mit Clostridien sporen berücksichtigt werden.

Zum Anderen sollte die Dynamik der Clostridienentwicklung im Gärungsverlauf in Abhängigkeit vom TS-Gehalt, der Säuerungsintensität sowie dem Nitratgehalt im Gärmedium aufgeklärt werden.

Zur Lösung der genannten Aufgabenstellung wurden 2 Reihen von Laborsiliverversuchen durchgeführt:

- Mehrfaktorielle Versuche zur Ermittlung des Mindest-Nitratgehaltes
- Verlaufsversuche zur Aufklärung der Dynamik der Clostridienentwicklung

In den mehrfaktoriellen Versuchen wurde durch systematische Kombination von Nitratgehalt, TS-Gehalt und Z/PK-Quotient im Ausgangsmaterial eine breite Spanne gezielt variiert. Ausgangsbedingungen geprüft, wobei jede Wertekombination sowohl mit sauber geerntetem als auch mit Clostridien sporen angereicherter Grünfutter angelegt worden ist. Die Silagen wurden bei 25 °C gelagert und nach 180 Tagen untersucht.

In den Verlaufsversuchen wurden 4 Stufen des TS-Gehaltes (20, 30, 40, und 50 %) in Kombination mit MSB bzw. MSB plus Glucose sowie Nitrat (zwei Dosierungen) geprüft. Die Silagen wurden 3, 7, 14, 28, 56 und 180 Tage nach dem Ansatz untersucht.

Die erzielten Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Der Konservierungserfolg bei der Silierung hängt nicht nur vom TS-Gehalt und Z/PK-Quotienten des Grünfutters sondern auch vom Nitratgehalt und Clostridien sporenbesatz des betreffenden Materials ab.
2. Bei Fehlen von Nitrat im Ausgangsmaterial liegt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Buttersäure in der Silage vor, auch im Falle des als leicht vergärbare eingestuftes Grünfutters ($VK \geq 45$) und auch dann, wenn es im sauber geerntetem Zustand einsiliert worden ist. Die Milchsäuregehalte der Silagen sind bei Fehlen von Nitrat meist geringer als bei Zusatz von Nitrat.
3. Der notwendige Mindest-Nitratgehalt zur Erzielung buttersäurefreier Silagen steht im Zusammenhang mit der nach TS-Gehalt und Z/PK-Quotient gemessenen Vergärbarekeit des Grünfutters (VK-Wert) sowie dem Belastungsgrad des Materials mit Clostridien sporen. Für den Bereich von VK 32...60 beträgt
 - MNG (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS für sporenarmes Grünfutter) = $0,24 - 0,0035 \cdot \text{VK}$
 - MNG (% $\text{NO}_3\text{-N}$ in TS für sporenreiches Grünfutter) = $0,20 - 0,0021 \cdot \text{VK}$

4. Bei nitratfreiem Grünfutter weisen alle Silagen, ungeachtet des Gärungsverlaufes, sehr niedrige Essigsäuregehalte auf. Bei nitrathaltigem Grünfutter sind die Essigsäuregehalte der Silagen im Falle von Fehlgärungen erhöht. In fehlgärungsfreien Silagen sind hier die Essigsäuregehalte ebenfalls niedrig.
5. Die Ammoniakgehalte der Silagen resultieren sowohl aus der Nitratreduktion als auch aus dem Proteinabbau, so dass die NH_3 -Gehalte der Silagen durch die chemische Zusammensetzung des Ausgangsmaterials beeinflusst werden. Mit NH_3 -Bildung aus dem Proteinabbau ist erst bei Buttersäuregehalten oberhalb von 1,5 – 2,0 % in TS zu rechnen.
6. Bei Silagen aus nitratfreiem Grünfutter liegt das Niveau des kritischen pH-Wertes um 0,2 – 0,5 pH-Einheiten tiefer als bei nitrathaltigem Ausgangsmaterial. Während in Silagen aus nitrathaltigem Grünfutter bei den bisher als kritisch geltenden pH-Werten keine Buttersäure vorlag, konnten bei den gleichen pH-Werten bei nitratfreiem Material noch etwa 2,0 % Buttersäure in TS nachgewiesen werden.
7. Eine hohe Konzentration an Clostridien sporen ist vor allem in buttersäurehaltigen Silagen zu finden und insbesondere dann, wenn das Ausgangsmaterial weitgehend nitratfrei war. Zwischen der Höhe der Buttersäuregehalte und dem Clostridien sporengesamt besteht jedoch kein direkter Zusammenhang. Nitratzusatz zum Grünfutter hatte einen deutlichen Rückgang der Sporengesamte zur Folge.
8. Während des Gärprozesses wird Clostridienentwicklung besonders durch steigenden TS-Gehalt, d.h. durch Rückgang der Wasseraktivität, eingeschränkt. Das Auskeimen von Clostridien sporen ist offensichtlich noch bei einer geringeren Wasseraktivität möglich als die Vermehrung vegetativer Keime. Ein Rückgang des Sporengesamtes im Vergleich zum Ausgangsmaterial lag erst bei einem TS-Gehalt von etwa 50 % vor.
9. Die Intensivierung der Milchsäuregärung durch entsprechende Zusätze hatte eine Einschränkung der Stoffwechselaktivität von Clostridien zur Folge. Buttersäurebildung war aber erst bei TS-Gehalten von ≥ 40 % ausgeschaltet. Auch die Einschränkung der Sporenbildung konnte erst bei TS-Gehalten von ≥ 40 % erreicht werden.
10. Bei Zusatz von Nitrat blieben die Silagen aller TS-Stufen bis zur Auslagerung buttersäurefrei. Die Sporengesamte gingen im Gärungsverlauf kontinuierlich zurück. Bei steigenden TS-Gehalten war der positive Effekt des Nitrats auf die Inhibierung der Sporenbildung verlangsamt.
11. Die Kombination der Zusätze von MSB und Nitrat führte in jeder TS-Stufe zu einer wesentlich stärkeren Hemmwirkung auf die Clostridienentwicklung als der Zusatz von MSB und Nitrat getrennt. Durch die Kombination konnte nicht nur ein sicherer Erfolg bei der Unterbindung von Buttersäurebildung und Laktatabbau sondern auch eine stärkere Verminderung der Sporengesamte erreicht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adler, A. und H. Lew (1995): Dynamik der epiphytischen Mikroflora auf Grünlandpflanzen im Zusammenhang mit verschiedenen Düngungsvarianten. *Bodenkultur* 46, 223 - 240
- Anderson, R. and P. Christie (1995): Effect of long-term application of animal slurries to grassland on silage quality assessed in laboratory silos. *J. Sci. Food Agric.* 67, 205 - 213
- Ali-Yrkkö und M. Antila (1975): Beobachtungen über den Clostridiengehalt der finnischen Silage und des Kuhmistes. *Milchwissenschaft* 30, 12, 753 - 759
- Ataku, K. (1982): The Role of Nitrate in Silage Fermentation and its Significance, *J. of the College of Dairying, Natural Sci.*; 9, 2, 209 - 319
- Ataku, K. and N. Narasaki (1981): The influence of nitrate on silage quality: 1. the relationship between the nitrate content of the ensiled grass and the quality of resultant silage. *J. of Japan. Society of Grassland Sci.* 27, 3, 308 - 317
- Ataku, K.; M. Horiguchi and T. Matsumoto (1983): Relationship between silage quality and 15N-nitrate reduction during ensilage. *Proceeding of the XIV International Grassland Congress, Lexington (USA)*, 663 - 665
- Adler, A and H. Lee (1995): Dynamik der epiphytischen Mikroflora auf Grünlandpflanzen im Zusammenhang mit verschiedenen Düngungsvarianten. *Bodenkultur*, 46, 3, 223 - 240
- Bachmann, H. -P. (1995): Buttersäuregärung im Käse: eine Literaturzusammenfassung. *Agrarforschung*, 2 (11-12), 523-526
- Barnett, A. J. G. (1953): The reduction of nitrate in mixtures of minced grass and water. *J. Sci. Food Agric.*, 4, 92 - 96
- Blocher, J. C. and F. F. Busta (1983): Bacterial spore resistance to acid. *Food Technology*, November 1983, 87 - 99
- Bucher E. (1970): Beiträge zur Mikrobiologie der Silagegärung und der Gärfutterstabilität. *Dissertation, München*
- Bühler, N. B. (1985): Clostridien in Silage, Dung, Milch und Käse - Spätblähung im Käse. *Abhandlung. Dissertation an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich*
- Carpintero, M.C., A. J. Holding and P. McDonald (1969): Fermentation studies on Lucerne. *J. Sci. Food Agric.*, 20, 677 - 681
- Caskey, W. H. and J. M. Tiedje (1979): Evidence for Clostridia as Agents of Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonium in Soils, *Soil Sci. Society of America Journal*, 43, 5, 931 - 936

- Caskey, W. H. and J. M. Tiedje (1980): The reduction of nitrate to ammonium by a *Clostridium* sp. isolated from soil, *J. Gen. Microbiol.*, 119, 217 - 223
- Crabbendam, P. M.; O. M. Neijssel and D. W. Tempest (1985): Metabolic and energetic aspects of the growth of *Clostridium butyricum* on glucose in chemostat culture. *Arch. Microbiol.*, 142, 375 - 382
- Dasgupta, A. P. and R. R. Hull (1989): Late blowing of swiss cheese: Incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian J. of Dairy Techn.*, Nov., 82 - 87
- Dodds, K. L. and D. L. Collins-Thompson (1984): Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacterial associated with cured meat products. *Intern. J. of Food Microbiol.*, 1, 163 - 170
- Driehus, F.; S. J. W. H. Oude Elferink and S. F. Spoelstra (1999): Anaerobic lactate degradation in maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*. Submitted
- Duncan, Ch. L. and E. M. Foster (1968): Effect of Sodium Nitrite, Sodium Chloride, and Sodium Nitrate on Germination and Outgrowth of Anaerobic Spores. *Applied Microbiology*, 16, 2, 406 - 411
- EßL, A. (1987): *Statistische Methoden in der Tierproduktion*. DLG-Verlag Frankfurt (Main)
- Fenlon, D.R.; A. R. Henderson and J. A. Rooke (1995): The fermentative preservation of grasses and forage crops. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 79, 118S - 131S
- Gibson, T.; A. C. Stirling, R. M. Keddie and R. F. Rosenberger (1958): Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures. *J. Gen. Microbiol.*, 19, 112 - 129
- Gibson, T. (1965): Clostridia in silage. *J. Appl. Bacteriol.*, 28, 1, 56 - 62
- Gross, F.; G. Koch und Th. Beck (1976): Chemische und bakteriologische Untersuchungen bei der Silierung von Wiesenschwingel und Rotklee mit unterschiedlicher Stickstoffdüngung und Vorwelken. *Das wirtschaftseigene Futter*, Bd. 22, H. 1, 50 - 69
- Gudkov, A.V. und G. D. Perfiliev (1981): Begrenzende Faktoren für das Wachstum von sporenbildenden anaeroben Bakterien im Käse. *Milchforschung-Milchpraxis*, 23 3, 64 - 67.
- Hasan, S. M. and J. B. Hall (1975): The physiological function of nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 120 - 128
- Heilmeyer, J. (1985): Der Nachweis von käsereschädlichen Clostridien. *Deutsche Molkereizeitung (dmz)* 7/8, 196 - 199

- Heilmeyer, J. (1988): Nachweismethoden für käseerschädliche Clostridien, insbesondere für *Clostridium tyrobutyricum*. Dissertation TU München.
- Hein, E. (1970): Die Beeinflussung des Gärungsverlaufes bei Grünfuttersilierung durch den Nitratgehalt des Ausgangsmaterials, Dissertation. AdL, Berlin
- Hein, E. and F. Weißbach (1977): Decomposition processes and effects of nitrate in ensiling green forage. XIII International Grassland Congress Leipzig 18 - 27 May, 1977
- Herrero, A. A. (1983): End-product inhibition in anaerobic fermentations. Trends Biotechnol., 1: 49 - 53
- Hickey, C.S. and M. G. Johnson (1981): Effects of pH shifts, bile salts, and glucose on the sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. Appl. and Environm. Microbiol., 41, 1, 124 - 129
- Hippe, H.; J. R. Andreesen and G. Gottschalk (1992): The prokaryote - a handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications - Second edition, vol II, 1801 - 1839
- Hsu, E. J. and Z. J. Ordal (1969): Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restricted growth. J. of Bacteriol., vol 97, no 3, 1511 - 1512
- Hsu, E. J. and Z. J. Ordal (1970): Comparative metabolism of vegetative and sporulating cultures of *Clostridium thermosaccharolyticum*. J. of Bacteriol., vol 102, no 2, 369 - 376
- Hughes, A. D. (1971): The non-protein nitrogen composition of grass silage - III. the composition of spoiled silages. J. agric. Sci. camb., 76, 329 - 336
- Ishimoto, M.; M. Umeyama and S. Chima (1974): Alteration of fermentation products from butyrate to acetate by nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie, Bd. 14, H. 2, 115-121
- Jonsson, A. (1989): The role of yeasts and Clostridia in Silage deterioration. Rapport - Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för Mikrobiologi, no 42
- Jonsson, A. (1990): Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using Neutral Red, D-Cycloserine, and Lactate Dehydrogenase Activity. J. Dairy Sci. 73, 719-725.
- Jonsson, A. (1991): Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and Aerobic Deterioration of grass silage. J. Sci. Food Agric., 54, 557 - 568
- Kaiser, E. (1981): Zum Einfluß von Nitratgehalt, Zuckerart und Lagerungstemperatur auf die Vorhersage des Gärungsverlaufes bei der Grünfuttersilierung, Habilitationsschrift an der Humboldt-Universität zu Berlin
- Kaiser, E. (1994): Zur Bedeutung des Nitratgehaltes im Grünfutter für die Silagequalität. Proc. 106. LUFA-Tagung in Jena, VDLUFA - Kongress, VDLUFA - Verlag, Darmstadt

- Kaiser, E.; F. Weißbach und K. Haacker (1987): Abbauprodukte des Nitrats bei der Grünfuttersilierung, 1. Mitteilung: Nitrose Gase. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin. Math. - Nat. R.* 36 (4), 290 - 294
- Kaiser, E. und F. Weißbach (1988): Abbauprodukte des Nitrats bei der Grünfuttersilierung, 2. Mitteilung: Ammoniak. *Berichte der Humboldt-Universität zu Berlin*, 8, 13, 29 - 38
- Kaiser, E. und F. Weißbach (1989a): Zum Einfluß des Nitratgehaltes im Grünfütter auf den Gärverlauf bei der Silierung. 1. Mitteilung. *Wiss. Zeitschrift der HUB*, 38 (2), 78 - 84
- Kaiser, E. und F. Weißbach (1989b): Zum Einfluß des Nitratgehaltes im Grünfütter auf den Gärverlauf bei der Silierung. 2. Mitteilung. *Wiss. Zeitschrift der HUB*, 38 (2), 85 - 91
- Kaiser, E.; J. Zimmer und K. Schmerbauch (1994): Zur Bedeutung des Nitratgehaltes im Mähgut für Frischverfütterung und Konservierungseignung des Materials - Erste Ergebnisse zur Silierung extensiv erzeugten Grünfutters. *Bornimer Agrarberichte H.* 4, 196 - 205
- Kaiser, E.; K. Weiß und A. Milimonka (1995): Silierbarkeit von nitratarmem Grünfütter, Proc. 107. LUFA-Kongress, Garmisch-Partenkirchen, 777 - 780
- Kaiser, E. und K. Weiß (1997): Zum Gärungsverlauf bei der Silierung von nitratarmem Grünfütter. 2. Mitteilung: Gärungsverlauf bei Zusatz von Nitrat, Nitrit, Milchsäurebakterien und Ameisensäure. *Arch. Anim. Nutr.* 50, 187 - 200
- Kaiser, E.; K. Weiß und J. Zimmer (1997a): Zum Gärungsverlauf bei der Silierung von nitratarmem Grünfütter, 1. Mitteilung: Gärungsverlauf in unbehandeltem Grünfütter. *Arch. Anim. Nutr.* 50, 87 - 102
- Kaiser, E.; I. Polip und K. Weiß (1997b): Neuere Erkenntnisse zum Gärungsverlauf bei der Silierung - Schlußfolgerungen für die Qualitätsbewertung und Qualitätssicherung von Silagen, VDI / MEG Kolloquium Agrartechnik - Institut für Agrartechnik Bornim e.V., 92 - 100
- Kaiser, E.; I. Polip und K. Weiß (1997c): Neuere Erkenntnisse zum Gärungsverlauf und zu den Stoffumsetzungen bei der Grünfuttersilierung, Proc. 109. VDLUFA - Kongress, 191 - 194
- Kaiser, E.; K. Weiß und A. Milimonka (1999): Untersuchungen zur Gärqualität von Silagen aus nitratarmem Grünfütter. *Arch. Anim. Nutr.* 52, 75 - 93
- Kalzendorf, C. (1995): Ursachen hoher Clostridien-Sporenzahlen in der Rohmilch und Maßnahmen zur Vermeidung des Sporeneintrages. *Deutsche Milch-wirtschaft*; 46, 16, 830 und 832 - 834.
- Kalzendorf, C. (1996): Clostridien sporen in der Rohmilch. Ursachen und Maßnahmen zur Vermeidung des Sporeneintrages. *Milchpraxis*, 34, 1, 38 - 41

- Keith, S.M.; G. T. Macfarlane and R. A. Herbert (1982): Dissimilatory nitrate reduction by strain of *Clostridium butyricum* isolated from Estuarine sediments. *Archives of Microbiology*, 132, 62 - 66
- Kemble, A. R. (1956): Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. *J. Sci. Food Agric.*, 7, 125 - 130
- Köhler, W.; G. Schachtel und P. Voleske (1992): *Biostatistik: Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler*, Springer-Verlag
- Köller S. and F. Weißbach (1989): Investigations on spores of clostridia in silages. *Proceedings of the International Symposium on Production, Evaluation and Feeding of Silage (12 th to 16 th June 1989 in Rostock)*, 197 - 203
- Kontova, M and J. Pekoppova (1990): Influence of lysozyme and KNO_3 on growth of clostridia and lactic acid bacteria in milk. *Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Octobre 8-12, vol II*, 352.
- Kutzner, H. J. (1966): Untersuchungen über die Buttersäuregärung in Schnitt- und Hartkäse. *Intern. Milchwi. Kongress in München*, 647 - 658
- Labbe, R. G. and Ch. L. Duncan (1975): Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* Type A. *Applied Microbiology*, vol 29, no 3, 345 - 351
- Lengerken, J. und K. Zimmermann(1991): *Handbuch Futtermittelprüfung*. Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, 1. Auflage
- Long, S.; D. T. Jones and D. R. Woods (1984): Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20, 256 - 261
- Lück, E. (1985): *Chemische Lebensmittelkonservierung – Stoffe, Wirkungen, Methoden*. 2. Auflage Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 41 - 43
- Macpherson, H.T. and P. Violante (1966): The influence of pH on the metabolism of Arginine and Lysine in silage. *J. Sci. Food Agric.*, 17, 128 -130
- Mackey, B. M. und J. G. Morris (1971): Ultrastructural changes during sporulation of *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 66, 1 - 13
- Mafart, P. (1995): Modelling germination kinetics of spores of *Clostridium tyrobutyricum*: a tool for predictive microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 477-480.
- Masuko, T.; T. Otani, Y. Ishimado, N. Kawasaki and K. Awaya (1981): Studies on the disappearance of nitrate in forage crops during ensilage: effect of moisture levels on the disappearance of nitrate. *J. Japan. Grassland Sci.*, 27, 227 - 232
- McDonald, P.; A. R. Henderson and S. J. E. Heron (1991): *The Biochemistry of silage*. 2nd edn. Marlow: Chalcombe Publications.

- Morton, R.D.; V. N. Scott, D. T. Bernard and R. C. Wiley (1990): Effect of Heat and pH on Toxigenic *Clostridium butyricum*. *J. of Food Science*, 55, 6, 1725 - 1727
- Müller, Th.; E. Fehrmann; W. Seyfarth and K. Robowski (1989): The effect of lactic acid bacteria inoculation on grass silage fermentation. *Proceedings of the International Symposium on Production, Evaluation and Feeding of Silage (12 th to 16 th June 1989 in Rostock)*, 101 - 105
- Müller, M. und G. Pahlow (1991): Zusatz von D-Cycloserin in Flüssigmedien zum MPN-Nachweis von Clostridien-Endosporen in Grassilagen. *Das wirtschaftseigene Futter*, 37, 1+2: 157-168
- Ohshima M. and P. McDonald (1978): A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *J. Sci. Food Agric.*, 2, 497 - 505
- Ohshima, M.; P. McDonald and T. Acamovic (1979): Changes during Ensilage in the Nitrogenous Components of Fresh and Additive treated Ryegrass and Lucerne. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 97 - 106
- Oude Elferink, S.J.W.H.; F. Driehus, J. Kronemann, J. C. Gottschal, J.C. and S. F. Spoelstra (1999): *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway: the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propandiol. In: *Proc. of the 12 th intern. Silage Conference, Uppsala*
- Pahlow, G. (1986): Nachweis und Bestimmung der Anzahl von Clostridien-Endosporen. Mitteilung vom Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL).
- Pahlow, G. (1990): Untersuchung des epiphytischen Besatzes von Siliergut mit Milchsäurebakterien. *Methodenvorschrift, FAL Braunschweig-Völkenrode*
- Polip, I. und E. Kaiser (1997): Zum Einfluß des Clostridiensporengehaltes im Ausgangsmaterial auf die Buttersäuregärung beim Silieren in Abhängigkeit von verschiedenen Hemmstoffzusätzen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol. Bd. 6*, 107
- Polip, I.; E. Kaiser und K. Weiß (1997): Gärungsverlauf bei der Grünfuttersilierung in Abhängigkeit von den Substratbedingungen, *Proc. 109. VDLUFA-Kongress, Leipzig*, 291 - 294
- Polip, I. und E. Kaiser (1998): Zur Bedeutung von Nitratgehalt und Clostridiensporenbefall des Grünfutters für die Grenzwerte der Vergärbarkeit. *Proc. Soc. Nutr. Physiol. 7*, 92
- Rammer, C.; C. Östling, P. Lingvall and S. Lingren (1994): Ensiling of manured crops - effects on fermentation. *Grass and Forage Sci.*, 49, 343 - 351
- Rammer, C. (1997): Quality of grass silage infected with spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *Grass and Forage Sci.*, 51, 88 - 95

- Rammer, Ch. and P. Lingvall (1997): Influence of farmyard manure on the quality of grass silage. *J. Sci. Food Agric.*, 75, 133 - 140
- Roberts, A. T. (1975): The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1755-1760
- Rogosa, M. (1961): Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 24, 401 - 408
- Roux, C. and J.-L. Bergère (1977): Caractères taxonomiques de *Clostridium tyrobutyricum*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 128a, 267 - 276
- Rutzmoser, K. und B. Spann (1995): Nitratgehalte im Grundfutter (Bayern 1994 und 1995). Kongressband, 107. VDLUFA-Kongress, 417 – 420
- Schlegel, H. G. (1992): *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Schmidt, L.; F. Weißbach, K.-D. Wernecke und E. Hein (1971): Erarbeitung von Parametern für die Vorhersage und Steuerung des Gärungsverlaufes bei der Grünfuttersilierung. Forschungsbericht Oskar-Kellner-Institut für Tierernährung Rostock
- Slanetz, L. W. and C. H. Bartley (1957): Numbers of enterococci in water, sewage and faeces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriology* 74, 591 - 595
- Sofos, J. N. and F. F. Busta (1981): Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Protect.* 44, 614
- Sommer, S (1995): Löcher in Käse und Portemonnaie. *Schweizerische Milchzeitung*, 121, 15, 1
- Spoelstra, S. F. (1983a): Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 145 - 152
- Spoelstra, S. F. (1983b): A laboratory silo permitting repeated sampling. *Neth. J. Agric. Sci.*, 31, 89 - 92
- Spoelstra, S. F. (1984): Nitrate degradation during silage fermentation. 7th silage conference: Silage production & utilization: summary of papers/ ed. E. J. Gerdon, E. F. Unsworth. -Belfast: Queens university of Belfast 11, 11 - 12.
- Spoelstra, S. F. (1985): Nitrate in silage - A review. *Grass and Forage Sci.*, 40, 1 -11
- Spoelstra, S. F. (1987): Degradation of nitrate by enterobacteria during silage fermentation of grass. *Netherlands J. of Agric. Sci.*, 35, 43 - 54
- Spoelstra, S. F. (1990): Comparison of the content of clostridial spores in wilted grass silage ensiled in either laboratory, pilot-scale or farm silos. *Netherlands J. of Agric. Sci.*, 38, 423 - 434

- Thylin, I.; P. Schuisky, S. Lindgren and J. C. Gottschal (1995): Influence of pH and lactic acid concentration on *Clostridium tyrobutyricum* during continuous growth in a pH-auxostat. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 663-670.
- Uchida, S.; M. Uchida and T. Horigome (1979): The change of nitrate nitrogen in silage-making: 1 The influences of glucose, Urease, and calcium carbonate additives on the disappearance of nitrate nitrogen during the storage. *Scientific reports of Faculty of Agriculture, Okayama University*, 54, 51 - 57
- Usher, C.D. and G. M. Telling (1975): Analysis of Nitrate and Nitrite in Foodstuffs: a critical review. *J. Sci. Food Agric.*, 2, 1793 - 1805.
- Wang, L. Ch. and R. H. Burris (1960): Mass spectrometric study of nitrogenous gases produced by silage. *J. Agric. and Food Chem.*, 8, 3, 239 - 242
- Weber, E. (1972): *Grundriss der Biologischen Statistik*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- Weiß, K. und E. Kaiser (1995): Milchsäurebestimmung in Silageextrakten mit Hilfe der HPLC, *Das wirtschaftseigene Futter*, 41, 1, 69 - 80
- Weiß, K. (2000): Gärungsverlauf und Gärqualität von Silagen aus nitratarmem Grünfutter. Dissertation. Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
- Weißbach, F. (1968): Beziehungen zwischen Ausgangsmaterial und Gärungsverlauf bei der Grünfuttersilierung. *Habilitationsschrift an der Landw. Fakultät der Uni. Rostock*
- Weißbach, F. (1998): Untersuchungen über die Beeinflussung des Gärungsverlaufes bei der Bereitung von Silage durch Wiesenkräuter verschiedener Species im Aufwuchs extensiv genutzter Wiesen. *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 185*
- Weißbach, F.; Schmidt, L. und Hein, E. (1974): Method of anticipation of the run of fermentation in silage making, based on the chemical composition of green fodder. *Proc. XII intern. grassland Congr., Moskau, vol 3, part 2, 663 - 673*
- Weißbach, F. und K. Haacker(1988): Über die Ursachen der Buttersäuregärung in Silagen aus Getreideganzpflanzen. *Das wirtschaftseigene Futter*, 34, 88 - 99
- Weißbach, F.; B. Reuter and D. Kruse (1989): About the testing and evaluation of silage additives, *Proceedings of the International Symposium on Production, Evaluation and Feeding of Silage (12 th to 16 th June 1989 in Rostock)*, 107 - 116
- Weißbach, F.; H. Honig and E. Kaiser (1993): The effect of nitrate in the silage fermentation. *Proc. 10 th Intern. Confer. on Silage Res. Dublin*, 122 - 123

- Weißbach, F. und H. Honig (1996): Über die Vorhersage und Steuerung des Gärungsverlaufs bei der Silierung von Grünfütter aus extensivem Anbau. *Landbauforschung Völkenrode* 46., H. 1, 10 - 17
- Wieringa, G. W. (1958): The effect of wilting on butyric acid fermentation in silage. *Netherlands J. Agric. Sci.* 6, 204 - 210
- Wieringa, G. W. (1966): The influence of nitrate on silage fermentation. *Proc. X Intern. Grassland Congress, Helsinki, Sect. 2*, 537 - 540
- Wolf, G.; E. K. Arendt; U. Pfähler and W. P. Hammes (1990): Hem-dependent and hem-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products. *Intern. J. of Food Microbiol.*, 10, 323 - 330.
- Woods, L. F. J.; J. M. Wood and P. A. Gibbs (1981): The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *J. gen. Microbiol.*, 125, 399 - 406
- Woods, D. R. and D. T. Jones (1986): Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Advances in Microbial physiology* (Academic press), 28, 25 - 64
- Woolford, M. K. (1984): *The silage fermentation*, Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- Yamamoto, I. and M. Ishimoto (1981): Oxidation of lactate in comparison with that of glucose in nitrate respiration of *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27, 11 - 20