

Die Effekte von EM-behandelter Grassilage auf die Produktion von Methan und flüchtigen Fettsäuren im Pansen

Ein Bericht von:
Feed Innovation Services (FIS)



Aarle-Rixtel
Niederlande

April 2003

Auftraggeber:
EM Agriton BV
Noordwolde

INHALT

1. EINLEITUNG	3
2. METHANPRODUKTION IN PANSEN	4
2.1 Produktion in Pansen	4
2.2 Mögliche Aufgabe von Impfmitteln	5
3. MATERIAL UND METHODEN DES IN VITRO EXPERIMENTES	6
4. ERGEBNISSE	9
5. SCHLÜSSE UND EMPFEHLUNGEN	12

1. EINLEITUNG

Methan, das zweite wichtige Treibhaus-Gas, trägt immerhin mit 18% zum Treibhauseffekt (der Erde, d. Übersetzer) bei. Dessen Erzeugung in dem Verdauungstrakt von Haustieren macht vermutlich 22% der anthropogenen Methan-Quellen aus. Es entsteht vor allem im Pansen der Wiederkäuer. Zusätzlich verringert das Methan die Energie, die für das Tier verfügbar ist. Bis zu 10% der Gesamtenergie im Futter geht als Methan verloren. (Jouany, 1994). Deshalb ist es für die Tierernährer ein wichtiges Ziel, die Methanproduktion durch Lenkung der mikrobiellen Aktivität im Pansen zu senken.

Grassilage ist der größte Bestandteil der Futtermittelration von Milchkühen. Eine Silage hoher Qualität erreicht man durch eine geeignete Fermentation. EM [EM-Silage] ist ein Impfmittel dafür, das dem Gras während des Siliervorganges zugesetzt wird. Es enthält ausgesuchte Arten von Mikroorganismen einschließlich vorherrschender Stämme von Milchsäurebakterien und Hefen und kleinerer Anteile von Photosynthesebakterien, Actinomyceten und anderer Typen von Mikroorganismen.

Das Anliegen dieser Studie ist die Durchführung eines Experimentes, das den Einfluß von Grassilage, die mit EM fermentiert wurde, auf die flüchtigen Fettsäuren und die Methanproduktion in vitro [im nachgestellten Laboraufbau] ermittelt.

2. METHANERZEUGUNG IN PANSEN

2.1 Erzeugung von Methan in Pansen

Die Endprodukte des Zerfalls von Kohlehydraten im Pansen sind vor allem Hexosen und Pentosen. Diese werden von den Mikroben entweder in das Kohlenstoffskelett ihrer Biomasse eingebaut oder als Energiequelle für Erhaltung und Wachstum genutzt.

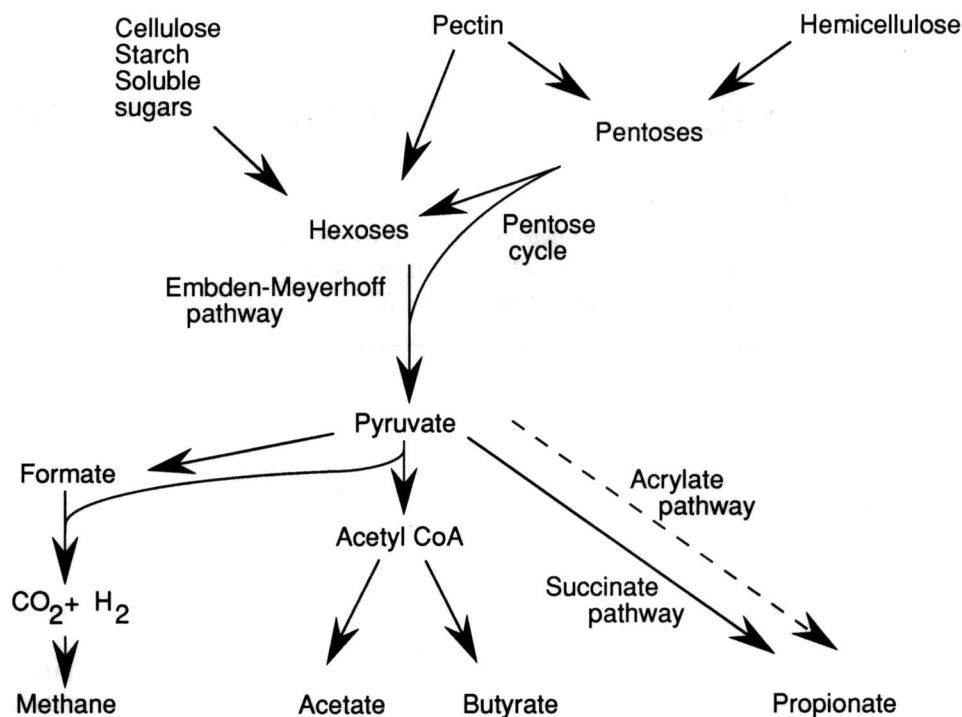
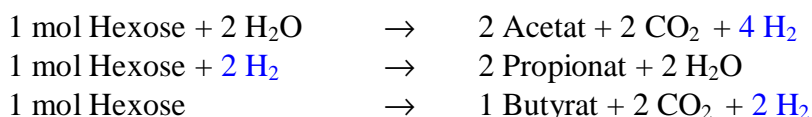


Fig. 5.1. A schematic representation of the major pathways of carbohydrate metabolism in the rumen.

Fig. 5.1 Eine schematische Darstellung der wesentlichen Pfade der Kohlehydrat-Umsetzungen im Pansen

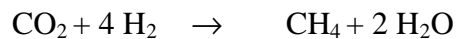
Energie wird bei dem Abbau von Hexosen und Pentosen [Stärke] in VFA [flüchtige Fettsäuren: Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure] freigesetzt. Der wichtigste Pfad der Fermentation von Hexosen ist der Embden-Meyerhoff-Pfad. Die Oxydation eines Moleküles Glucose führt zu zwei Molekülen von Pyruvat und zur Reduktion von zwei Co-Faktoren NAD. Das Pyruvat wird dann zu VFA zerlegt, vorallem zu Acetat (HAc), Propionat (HPr) und Butyrat (HBr).

Die Stöchiometrie der Fermentation von einem Molekül Glucose ist wie folgt (Hungate, 1966):



Die Bildung von Propionsäure ist dabei die einzige Reaktion, in der H₂ [Wasserstoff] aufgenommen wird. Die anderen Reaktionen führen zur Freisetzung von Wasserstoff. Das Verhältnis, in dem die VFA erzeugt werden, ist wichtig, da die verschiedenen VFA später im Körper nicht den selben Nutzen bringen. Alle die VFA können genutzt werden, um im intermediären Stoffwechsel ATP zu erzeugen, aber, anders als Essig- und Buttersäure, kann Propionsäure später eine Vorstufe der Glucose sein (Dijkstra, 1993).

Obwohl H₂ eines der wichtigen Endprodukte der Fermentation durch Protozoen, Pilze und Bakterien ist, sammelt es sich im Pansen nicht an, weil es sofort von anderen Bakterien verwendet wird. Die Stöchiometrie der Methanbildung im Pansen ist:



Diese Gleichung zeigt, daß die Methanerzeugung durch Fäulnisbakterien ein möglicher Weg der Wasserstofffermentation ist. Es wird angenommen, daß 90% des Wasserstoffs in der Methanerzeugung verbraucht wird. Andere wichtige Pfade sind die Propionerzeugung und die Hydratation ungesättigter Fettsäuren.

2.2 Möglicher Einfluß der Verwendung von Impfmitteln für Grassilage auf die Methanerzeugung im Pansen

Both Cushnahan (1995) und Huhtanen et al. (1997) verglichen den Zusatz eines Fermentationsblockers (Ameisensäure) mit dem Zusatz eines Fermentationsaktivierers (Milchsäurebakterien) in Grassilage. In beiden Untersuchungen stieg die Propionsäureproduktion im Pansen der Milchkühe und die Essigsäureproduktion ging bei der beimpften Grassilage zurück. Es muß angemerkt werden, daß beide Untersuchungen mit einer Grassilage durchgeführt wurden, die für holländische Verhältnisse niedrigen Trockensubstanzgehalt aufwies. Die Methanerzeugung im Pansen wurde in beiden Untersuchungen nicht gemessen. Es wird aber eine verringerte Methanerzeugung erwartet, weil sich die Erzeugung der flüchtigen Fettsäuren verschoben hat und das zu einer Verringerung des Wasserstoffüberschusses im Pansen führt.

3. MATERIAL UND METHODEN DES IN VITRO EXPERIMENTES

Das Anliegen dieser Studie ist die Durchführung eines Experimentes, das den Einfluß von Grassilage, die mit EM fermentiert wurde, auf die flüchtige Fettsäure und die Methanerzeugung ermittelt. Die Geschwindigkeit der Fermentation wird durch Messung der kumulierten Gasproduktion bestimmt. Zusätzlich wird mit der Gaschromatographie die Zusammensetzung von Gas und VFA zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Das Prinzip der Messung der kumulierten Gasproduktion ist die Messung des erzeugten Gases im Kopfraum einer abgedichteten Serumflasche (Williams, 2000) mit Hilfe eines manuell bedienten Druckfühlers. Diese Untersuchung benötigt gemahlene Substrat als Energiequelle und eine gemischte Mikrobepopulation als Impfstoff. Das ausgewogene Substrat wird in einem Mittel gelöst, auf 39°C erwärmt und dann wird frisch gewonnener Pansensaft als Impfmittel zugesetzt. Von dem Augenblick an wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten die

Gasproduktion aufgezeichnet. Dieses Experiment wurde an und mit Hilfe der Universität Wageningen, Abteilung Tierernährung, durchgeführt.

Probenvorbereitung

Zwei durchschnittliche Grassilagen wurden vom ID-Lelystad gestellt. Eine Probe diente der Kontrolle, eine war mit EM behandelt. Je 0.5 ± 0.0001 g der Substrate wurde in eine Flasche eingewogen.

Die Nährlösungen

Das Medium B ist ein komplexes, nur halb definiertes Mittel (einige Komponenten sind bekannt, andere nicht), das die meisten der Mikroorganismen gemäß ihrer Bedürfnisse versorgt – mit Ausnahme von Energie, die vom Substrat kommt (Williams, 2000). Diese Nährlösung ist für Mikroben zusammengestellt, die strikt anaerob sind. Deshalb muß es unter anaeroben Bedingungen vorbereitet werden und alle Komponenten müssen vor Gebrauch steril gehandhabt werden.

Serumflaschen von 100 ml, in die das Substrat bereits eingewogen war, wurden unter CO₂-Athmosphäre mit 82 ml der Nährlösung befüllt, die wie folgt zusammengesetzt war:

- 76 ml Basislösung
- 1 ml Vitamin/Phosphat-Lösung
- 4 ml Bikarbonat-Puffer
- und 1 ml Reduktionsmittel

Das Impfmittel

Am Tage der Impfung wurde ein Liter von Pansenflüssigkeit mit Futterpartikeln darin vor der Morgenfütterung von drei verschiedenen Kühen gesammelt. Diese wurde in einer beheizten Thermoskanne bewahrt und mit CO₂ abgedeckt, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Dann wurde die Pansenflüssigkeit der drei Kühe in einem größeren Becher unter CO₂ gemischt. Diese Mischung wurde dann in einem Trichter durch ein doppelt liegendes Käsetuch gefiltert, indem es mit CO₂ in einen Becher gepreßt wurde, um möglichst viel Flüssigkeit zu erhalten.

Beimpfung der Flaschen

Vor der Impfung wurden die Flaschen mit dem Substrat und der Nährlösung auf 39°C erwärmt und etwas Reduktionsmittel wurde nachgegeben, da der Farbindikator immer noch rosa war. Die Flaschen wurden zum Zeitpunkt t_0 mit 5 ml der Pansenflüssigkeit beimpft. Es muß angemerkt werden, daß die Beimpfung mit den 72-Stunden-Flaschen begann und mit den 0-Stunden-Flaschen aufhörte. Wegen der großen Zahl an Flaschen und der Tatsache, daß die Pansenflüssigkeit nicht konstant auf 39°C gehalten werden konnte, war die Temperatur der Pansenflüssigkeit gegen Ende der Beimpfung auf 25°C abgesunken.

Der Versuchsablauf

Für die VFA wurden die Flaschen zu jedem Zeitpunkt autoklaviert. Die Gasmessung wurde an drei anderen Flaschen zu 19 Zeitpunkten ausgeführt und die Gaszusammensetzung wurde

an der selben Flasche bestimmt. Diese Flaschen wurden am Ende des Durchganges autoklaviert, um die VFA zu bestimmen. Jede Behandlung wurde zu jedem Zeitpunkt in drei Wiederholungen ausgeführt.

Tabelle 3.1: Ablauf

Zeitpunkte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stunden (h)	0	2	4	6	9	12	15	18	21	24	28	32	36	42	48	54	60	66	72
VFA-Analy.	√			√		√				√									√
Gasmischung				√		√				√									√
Gasmessung	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Es wurde die manuelle total-additive Gasmessung durchgeführt. Dank der Meßsonde konnte der Druck in den Flaschen zu jedem Zeitpunkt bestimmt und automatisch in die Datenverarbeitung eingelesen werden. Zudem wurde das Gasvolumen mit Hilfe einer Spritze gemessen (wenn der Druck in der Flasche zu Null wurde, wurde an der Spritze abgelesen). Solange die Gaszusammensetzung nicht gemessen werden mußte, wurde das Gas entspannt, um Druck und Gasvolumen in der Flasche zu Null zu bringen.

Gaszusammensetzung

Nach der Gasmessung wurde das Gas in der Flasche belassen und genau 2 ml des Gases wurden mit einer Spritze gesammelt und in einen Vakutainer (No 367614 with HenGard® safety closure; Becton Dickinson) übertragen zur Analyse (H₂, CH₄, CO₂) mit der Gaschromatographie.

VFA -Analyse

Die Flaschen wurden mit 39°C inkubiert. Dabei saß eine Nadel im Verschuß, um das Gas entweichen zu lassen. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Flaschen je Substrat 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Es muß angemerkt werden, daß die Flaschen in den kalten Autoklaven gestellt wurden. So ist während der Aufheizphase des Autoklaven die Fermentation weitergegangen. Danach wurden die Flaschen herunter gekühlt und dann in einem Kühlraum aufbewahrt.

Zur Probenahme wurde die Flaschen entsiegelt. Mit einer Spritze wurden 5 ml der Pansenflüssigkeit entnommen, um die VFA zu bestimmen und 5 ml für die Ermittlung des NH₃-Gehaltes. Dabei wurde darauf geachtet, kein Teilchen des Futters mitzunehmen. Für die VFA-Analyse wurden 0.250 ml von 85%-tiger Phosphorsäure und 5 ml von Trichloressigsäure (TCA) für die NH₃-Bestimmung zugefügt. Diese Proben wurden dann eingefroren. Zudem wurde im selben Augenblick der pH-Wert der Lösung gemessen.

Die VFA wurden mit der Gaschromatographie analysiert. Die Proben wurden aufgetaut, 1 ml wurde entnommen und bei 12300 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. 0.5ml der aufschwimmenden Phase wurden in eine automatische Pipette genommen und mit 0.2 ml Wasser und 0.3 ml des inneren Standards (Caproic acid) gemischt. Die VFA wurden dann mit

dem Gaschromatographen bestimmt (Ref: HRGC mega 2 von Carbo Erba; die Säule war 6 Fuß lang mit einem inneren Durchmesser von 2 mm und einem äußeren Durchmesser von 0,25 inch. Die Säule war gefüllt mit Chromabsorb bei einer Temperatur von 190°C; direkte Injektion in die Säule mit Flammenionisationsdetektor (FID); die Temperatur der Injektion war 185°C und die des Detektors 225°C; das Trägergas war ultrareiner Stickstoff gesättigt mit Ameisensäure und die Datenanalyse wurde mit der „chromcard“ von Fison instrument ausgeführt.)

Trockenmasse und verbliebene organische Masse

Der Inhalt der Flaschen wurde mit vorbehandeltem Sand auf Schmelztiiegel (N₂) filtriert, die zuvor gewaschen, getrocknet und gewogen waren. Die Schmelztiiegel wurden mit heißem demineralisiertem Wasser gewaschen. Sie wurden für vier Stunden mit 120°C getrocknet und dann für eine Stunde im Exsikkator gekühlt, bevor sie gewogen wurden, um die verbliebene Trockenmasse zu bestimmen. Schließlich wurden die Schmelztiiegel bei 550°C für 2 Stunden verascht und dann im Exsikkator für 1 Stunde und 30 Minuten gekühlt, um schließlich auch hier die verbliebene Trockenmasse zu wiegen.

Statistische Analyse

Die Daten wurden mit dem Statistik-Paket SAS analysiert. Die Analyse der Differenzen wurden mit der Tukey-Kramer-Methode bestimmt. Differenzen mit $P < 0.05$ wurden als signifikant betrachtet. Das Modell für jede abhängige Variable war das folgende:

- $Y_{ijk} = U + a_i + b_j + w_{ij} + e_{ijk}$
 mit: a_i , Effekt des Substrates $i = (1,2)$
 b_j , Effekt der Zeiten $j = (1, \dots, 4)$
 w_{ij} , Interaktion der zwei Faktoren
 Und e_{ijk} , Der Fehler-Term ($k = 1,2$)

Die abhängigen Variablen (Y_{ijk}) waren:

- Acetat, Propionat, Butyrat, erzeugt je Gramm inkubierter OM
- VFA erzeugt je Gramm konsumierter OM (Ausbeute)
- NGR Verhältnis: $(HAc + HiBu + HBu + HiVal + HVal)/(HPr + HiVal + HVal)$
- Das Acetat : Propionat Verhältnis
- Methan berechnet;
 $CH_4 = 0.5 HAc - 0.25 HPr + 0.5 (HBu + HiBu) - 0.25 (HVal + HiVal)$
- Ammonium nach 72 Stunden
- Abbau der organischen Masse
- Methan nach Analyse
- Wasserstoff und Kohlendioxid nach Analyse

4. ERGEBNISSE

Zwei repräsentative Grassilagen kamen von der ID-Lelystad, die zuvor ein Experiment durchgeführt hatte, um den Einfluß von EM auf den Silierprozeß und die aerobe Stabilität der Silage nach Anbruch zu ermitteln (Bericht Nr. 2165, ID-Lelystad). In der nächsten Tabelle sind die Ergebnisse dieses Experimentes mit Blick auf die Zusammensetzung der Grassilagen wiedergegeben.

Tabelle 4.1 Effekt von EM auf die Eigenschaften der Silage nach zwei Monaten Inkubation (Wikselaar et al., 2000)

	Kontrolle	+ EM
Trockenmasse (g/kg)	451	440
Gewichtsverlust (g/kg)	11.5	24.0
pH	5.11	4.42
Hefen (log kve / g)	2.15	< 2
Schimmel (log kve / g)	< 2	< 2
Milchsäure (g / kg dm)	41.9	79.3
Essigsäure (g / kg dm)	7.6	36.2
Ethanol (g / kg dm)	11.2	17.7
1,2-Propandiol (g / kg dm)	0	10.0
2,3-Butandiol (g / kg dm)	0.3	0.3
Propionsäure (g / kg dm)	2.2	2.4
1-Propanol (g / kg dm)	0	2.3
Ammonium (g / kg dm)	2.5	3.5

Verglichen mit der Kontrollsilage zeigte die EM-behandelte Silage höhere Gewichtsverluste und höhere Gehalte an Milch- und Essigsäure. Konsequenterweise lag der pH-Wert der EM-behandelten Silage tiefer.

Die Ergebnisse der chemischen Analysen der Silagen, ausgeführt von der Universität Wageningen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 4.2 Chemische Analysen von Grassilagen (in g/kg d.m.)

	Kontrolle	+ EM
Trockenmasse (g / kg)	905.4	928
N	30.15	31.99
NDF	369	391
rohes Fett	29.1	36.6
Asche	86.9	93.0

In den nächsten Tabellen 4.3 und 4.4 sind die Ergebnisse des *in vitro* Experimentes dargestellt. Die Ergebnisse sind ein Mittel aus den Messungen zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 72 Stunden (wenn nicht anders angegeben).

Tabelle 4.3 Effekt der Anwendung von EM zu Grassilage auf die Erzeugung individueller VFA, auf den Abbau organischer Masse (OM) nach 72 Stunden, das NGR Verhältnis, auf den Ammonium-Gehalt nach 72 Stunden und auf die berechnete Methanerzeugung.

Parameter	Einheit	Grassilage	
		Kontrolle	+ EM
Hac	mmol/ g om	3,76	3,39 *
Hpr	mmol/ g om	1,40	1,48 *
Hibr	mmol/ g om	0,060	0,064
Hbr	mmol/ g om	0,52	0,57 *
Hival	mmol/ g om	0,13	0,11
Hval	mmol/ g om	0,12	0,10
Hac	%	64,3	60,9 *
Hpr	%	23,0	25,4 *
Hbr	%	8,5	9,7 *
Hac/Hpr		2,85	2,42 *
Abbau der organischen Masse	%	87	85
NGR		3,33	3,02 *
NH ₃	Mg/l	429	438
CH ₄ berechnet	mmol/ g os	1,75	1,59 *

: Differenz zur Kontrollsilage ist signifikant (: p<0,01).

Tabelle 4.4 Effekt von Grassilage behandelt mit EM auf den analysierten Gehalt von H₂, CO₂ und CH₄ je g inkubierter (inc) und abgebauter (deg) organischer Masse. Die Ergebnisse sind berechnet je g inkubierter (inc.) und abgebauter (deg) organischer Masse

Parameter	Unit	Grassilage	
		Kontrolle	+ EM
H ₂	μl/ 2 ml/ g om inc	22,7	28,2 #
H ₂	μl/ 2 ml/ g om deg	26,1	33,3
CO ₂	μl/ 2 ml/ g om inc	3929	3803
CO ₂	μl/ 2 ml/ g om deg	4464	4492
CH ₄	μl/ 2 ml/ g om inc	444	406
CH ₄	μl/ 2 ml/ g om deg	510	479
CH ₄ /CO ₂	%	10,2	9,6

#: Differenz zur Kontrollsilage ist signifikant (#: p<0,1).

Sowohl die Erzeugung von Essigsäure mmol/g OM als auch der molare Prozentsatz von Essigsäure waren signifikant niedriger in der EM-behandelten Grassilage. Die Erzeugung von

Butter- und von Propionsäure (in mmol/g OM und dem molaren Prozentsatz) war signifikant höher. Als Folge dieser Verschiebung in der Erzeugung von flüchtiger Fettsäuren fielen das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure und des NGR-Verhältnisses. Ebenso fiel die Methanerzeugung berechnet über die Erzeugung der flüchtigen Fettsäuren signifikant.

In der gemessenen Gaszusammensetzung war nur die Wasserstoffmenge der EM-behandelten Silage signifikant verschieden von der Kontrollsilage. Obwohl nicht signifikant verschieden, war ein klarer Effekt von EM auf die gemessenen Methanerzeugung sichtbar (ausgedrückt als Gramm inkubierter organischer Masse und als Gramm abgebauter organischer Masse).

5. SCHLÜSSE UND EMPFEHLUNGEN

- In der Literatur finden sich Hinweise, daß eine Veränderung der Produktion flüchtiger Fettsäure im Pansen gefunden werden kann, wenn man ein Impfmittel zusetzt, daß Milchsäurebakterien enthält. Der Grund dieser Veränderung ist bis heute nicht klar. Der höhere Gehalt an Milchsäure in der mit dem Impfmittel behandelten Silage könnte dabei eine Rolle spielen.
 - Die mit EM-Silage behandelte Grassilage zeigte eine signifikant höhere Produktion an Propionsäure und eine signifikant niedrigere Essigsäureproduktion im Vergleich zur unbehandelten Silage. Das resultiert in einer Verringerung der berechneten Methanproduktion, welche auf der Produktion flüchtiger Fettsäure basiert und auf einem (nicht signifikant unterschiedenen) Abfall in der mit einer Gasanalytik gemessenen Methanerzeugung.
 - In vielen Futterrationen für Milchkühe (besonders bei Rationen mit hohem Anteil an Grassilage) ist das glucogene Eiweiß begrenzend. Eine Erhöhung der Produktion an Propionsäure wirkt sich positiv auf die Menge von Milch und Milcheiweiß aus.
 - Aus dieser in vitro Untersuchung kann geschlossen werden, daß EM einen positiven Einfluß auf die Verringerung der Methanproduktion im Pansen und auf die Erhöhung der glucogenen Eiweiße hat. Wegen des hohen praktischen Potentials der Ergebnisse dieses Experimentes ist es von Bedeutung, mehr Wissen über die Wirkungen von EM in Grassilagen zu erarbeiten.
-