



## TEST AF ENSILERINGSMIDLET SILOSOLVE® FC I GRÆSENSILAGE

STØTTET AF

# Promilleafgiftsfonden for landbrug

Artikel om forsøg med tilsætning af et biologisk ensileringsmiddel (SiloSolve FC) til sommerslæt af kløvergræsensilage.

*Forsøg hos 16 mælkeproducenter viste, at behandling af 2. og 3. slæt græsensilage med ensileringsmidlet SiloSolve® FC påvirkede ensilagens aerobe stabilitet samt fermenteringsprofil. Ved behandling med SiloSolve® FC blev der fundet en signifikant forbedring af den aerobe stabilitet og et signifikant højere indhold af eddikesyre sammenlignet med ubehandlet ensilage.*

### INTRODUKTION

Der kan findes store forskelle mellem høstede og opfodrede udbytter af grovfoder. Tabet af organisk stof på lageret kan udgøre en betydelig del af denne difference og kan skyldes en række forhold – herunder saftfløb, iltningstab ved varmedannelse og kassation af fordærvet ensilage. Tab af organisk stof ved en normal ensileringsproces er uundgåelig, da organismene i plantematerialet under aerobe forhold, som der er i første del af ensileringen, vil forbrænde vandopløselige næringsstoffer. I den efterfølgende fermenteringsfase omsættes letomsættelige substrater, primært sukker til især mælke- og eddikesyre, der har fundamental betydning for ensilagens fermenteringskvalitet og stabilitet.

For at ensileringsprocessen kan finde sted, kræves der som minimum tilstedeværelsen af naturligt forekommende mælkesyrebakterier med rådighed over en tilstrækkelig mængde substrat. Bakterierne omdanner substraterne til syrer, hvoraf mælkesyre typisk dominerer kvantitativt. Dermed sænkes pH, hvilket giver den konserverende effekt. Imidlertid viste et dansk praksisforsøg (Kristensen *et al.*, 2010), at anvendelse af homofermentative mælkesyrebakterier under høst af 1. slæt græsensilage forringer ensilagens aerobe stabilitet. Flere forsøg i laboratorieskala med græsensilage (De Boever *et al.* 2013) og majsensilage (Danner *et al.* 2003) behandlet med den heterofermentative mælkesyrebakterie *Lactobacillus buchneri* viser sammenlignet med en kontrolbehandling en markant forbedret aerob stabilitet.

Sammenlignet med 1. slæt kløvergræsensilage er erfaringen, at sommerslæt ofte har en ringere aerob stabilitet, hvilket kan give et betydeligt lager- og opfodringstab af ensilagen. Formålet med dette projekt var at undersøge, hvilken effekt tilsætning af et ensileringsmiddel, der indeholder såvel homo- som heterofermentative mælkesyrebakterier, til sommerslæt af kløvergræs har på ensilagens aerobe stabilitet, fermenteringsprofil samt mikrobielle sammensætning under praksisforhold sammenlignet med kontrol.

### MATERIALER OG METODER

### Ensilering

Undersøgelsen blev gennemført i 2. og 3. slæt kløvergræs hos 16 mælkeproducenter fordelt ligeligt mellem Bøvlingbjerg Maskinstation ved Lemvig og Bredebro Maskinstation i Sønderjylland. Der indgik to forsøgsbehandlinger:

- Kontrol med inaktivt bærestof (maltodextrin)
- SiloSolve® FC fra Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Danmark (Inokulering med  $1,24 \times 10^5$  *Lactococcus lactis* O-224 (DSM11037/1k2081) CFU/g grønmasse og  $1,24 \times 10^5$  *Lactobacillus buchneri* (DSM22501/1k20738) CFU/g grønmasse).

Kløvergræsset blev høstet og behandlet med selvkørende finsnittere af mærket Claas Jaguar 950 ved teoretiske snitlængder på 12-14 og 20-21 mm hos henholdsvis Bredebro Maskinstation og Bøvlingbjerg Maskinstation. Forsøgsbehandlingerne blev tilstræbt appliceret med 1 liter vand pr. ton grønmasse. Én pose á 200 g behandlede 100 ton grønmasse, og der blev derfor brugt én pose pr. 100 liter vand.

Maskinstationerne tilsatte midlerne efter følgende vejledning:

- Hæld vand i en grundigt rengjort tank
- Vandmængden skal være mindst 5 liter mindre end den ønskede totale volumen af færdigblanding
- Tjek flow og dyser på doseringsudstyr
- Lav en forblanding ved at hælde midlet i en rengjort vandbeholder med 5 liter vand (20° C) og bland grundigt
- Der bruges 1 pose á 200 g pr. 100 liter færdigblanding = 5 liter forblanding + 95 liter rent vand.

Værtsbedrifterne indenfor maskinstation blev blokket efter græsblanding for at sikre, at forsøget var balanceret så godt som muligt med hensyn til græssets botaniske sammensætning. Herefter blev behandlingerne tilfældigt allokeret ved lodtrækning, så halvdelen indenfor hver maskinstation fik tilsat ensileringsmiddel for hvert slæt. De, der ikke fik tilsat ensileringsmiddel ved 2. slæt, fik til gengæld ensileringsmiddel ved 3. slæt og omvendt. Den høstede afgrøde blev opbevaret i plansilo, markstak eller på betonplads. Ensilering i forsøget strakte sig fra 24. juni til 18. juli samt 17. juli til 9. september 2015 for henholdsvis 2. og 3. slæt. Forsøget blev udført som et blindforsøg, og mælkeproducenter, rådgivere samt forsøgsteknikere blev derfor ikke informeret om identiteten af de enkelte behandlinger, før prøveopsamlingerne var afsluttet.

### Prøveudtagning

Føreren af gummigeden udtog 10 delprøver af den friske afgrøde i forbindelse med indlægning i silo eller stak. Prøveudtagningen foregik jævnt fordelt over den tid, som det tog at høste græsset. Delprøverne blev straks pakket i plastposer og pakket i kølebokse med frosne køleelementer. Senest den efterfølgende dag blev prøverne fragtet til SEGES, Kvægbrugets ForsøgsLaboratorium (KFL) i Skejby, hvor de 10 delprøver blev blandet og efterfølgende kegleneddelt til de ønskede mængder og antal prøver. Håndtering af prøverne foregik så sterilt som muligt, idet der blev anvendt éngangshandsker ved prøveudtagning og -håndtering samt ethanol til desinfektion af underlag og remedier på laboratoriet.

Der blev udtaget ensilageprøver cirka 60 og 90 dage efter ensilering af både 2. og 3. slæt. Der blev udtaget cirka 2500 g prøvemateriale ved brug af mekanisk bor i ensilagens fulde højde (35 mm skærehoved, Frøsalget, Vejen). Prøverne blev pakket i plastikposer og pakket i kølebokse med frosne køleelementer. Prøverne blev samme dag transporteret til KFL, hvor delprøverne blev blandet og efterfølgende kegleneddelt. Håndtering af prøverne foregik sterilt, idet der blev anvendt éngangshandsker samt ethanol til desinfektion af underlag og remedier under hele forløbet fra prøveudtagning til behandling på laboratoriet.

### Analyser

Tørstofindholdet i prøver af frisk og ensileret afgrøde blev bestemt i tørreskab med luftcirkulation ved 60 °C i mindst 36 timer. Tørstofindholdet i ensilageprøverne blev korrigeret for tab af flygtige syrer (VFA) som beskrevet af Åkerlind *et al.* (2011). Prøver af frisk græs og ensilage blev desuden analyseret kemisk hos Eurofins Agrotesting Danmark (Vejen) for aske, råprotein, sukker, neutral detergent fiber (NDF) og in vitro fordøjelighed af organisk stof (IVOS).

Vandigt ekstrakt af ensilageprøverne blev fremstillet i blender (BL-1200, Wilfa A/S) af 100 g ensilage med 1000 g deioniseret vand i 2 x 30 sek. Homogenatet blev straks herefter filtreret først gennem osteklæde og dernæst filtreret (Kvælstoffri rundfilter MN 321). I ekstraktet blev indholdet af ethanol, propanol, ethylacetat, 2-butanol og propylacetat analyseret ved anvendelse af gaskromatografi/masse spektroskopi (Kristensen *et al.* 2007, Kristensen *et al.* 2010). Ammonium blev analyseret enzymatisk med glutamat dehydrogenase metode. Ekstraktets indhold af

kortkædede fedtsyrer og DL-mælkesyre blev analyseret ved gaskromatografi med FID efter æter ekstraktion og silylering. pH blev målt i ekstraktet med pH-meter kalibreret ved pH 4,005 og 7,000 (HQ430d flexi, HACH). Bestemmelse af den mikrobielle sammensætning i den friske såvel som den ensilerede afgrøde omfattede optælling af antal koloniformende enheder (colony forming units, CFU) af mælkesyrebakterier, coliforme bakterier, gær og skimmel på agarplader (Kristensen *et al.* 2010). Analyser af ekstrakter og bestemmelse af mikrobiel sammensætning blev udført ved Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet.

#### *Aerob stabilitet*

Ensilageprøver blev inkuberet i en 1,5-L spand med en temperaturprobe placeret i midten af prøven. Spanden blev placeret i inkubationsskab (KB 8400, Termaks A/S) ved en konstant referencetemperatur på 20 °C. Ensilagens temperatur blev logget kontinuerligt, og den aerobe stabilitet blev angivet som tiden målt i timer, det tog for temperaturen at stige 2,5° C over referencetemperaturen. Ensilager, der var stabile i mere end 240 timer, blev taget ud og sat til en stabilitet på 240 timer.

#### *Beregninger og statistisk analyse*

Næringsstofsammensætningen i prøverne af frisk og ensileret afgrøde er angivet som g/kg tørstof. Ensilagens indhold af tørstof er korrigeret som beskrevet i Åkerlind *et al.* (2011). Data blev analyseret ved anvendelse af Proc MIXED i SAS Studio (Statistical Analysis System Studio version 3.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). Modellen beskrev effekten af behandling (kontrol, SiloSolve® FC), slætnummer (2. eller 3. slæt), udtagningstidspunkt (60 eller 90 dage efter høst) og vekselvirkningen behandling x slætnummer x udtagningstidspunkt. Besætningsnummer var inkluderet som tilfældig effekt, og udtagningstidspunkt blev analyseret som gentagne målinger. De angivne gennemsnit er beregnet som mindste kvadraters gennemsnit ± residual fejl på gennemsnittet. Signifikans er accepteret ved sandsynlighed  $P \leq 0,05$ .

Forsøget, der var baseret på analyser af ensilageprøver, var ikke balanceret. Fra en enkelt bedrift kunne der ikke udtages prøver af 3. slæt græsensilage, mens der for en anden bedrift ikke kunne udtages prøver af 3. slæt græsensilage 90 dage efter høst. Indholdet af propionsyre, smørsyre, propylenglykol samt coliforme bakterier, gær og skimmel var med enkelte undtagelser alle under grænseværdien for kvantifikation.

Målingerne for den aerobe stabilitet var åbenlyst ikke normalfordelte. Data for ensilager udtaget hhv. 60 og 90 dage efter høst blev inddelt i særskilte datasæt og analyseret ved anvendelse af Proc LOGIST i SAS Studio (Statistical Analysis System Studio version 3.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). Observationer for aerob stabilitet blev analyseret som binært respons ved inddeling af observationer < 240 og observationer = 240 timer. Modellen beskrev effekten af behandling (kontrol, SiloSolve® FC) og slætnummer (2. eller 3. slæt). De angivne gennemsnit er beregnet som rå gennemsnit ± standardafvigelsen. Signifikans er accepteret ved sandsynlighed  $P \leq 0,05$ .

## RESULTATER OG DISKUSSION

#### *Frisk græs*

Forsøget var balanceret med hensyn til de i tabel 1 nævnte variable med undtagelse af den mikrobielle sammensætning. Indholdet af sukker var højere i 2. slæt samt i kontrolbehandlingerne. Der var desuden lavere fordøjelighed af organisk stof i 3. slæt. Indholdet af coliforme bakterier var højere i det friske græs, som var behandlet med ensileringsmiddel. Prøverne af det friske græs blev vurderet til at være sammenlignelige og dermed grundlag for analyse af ensileringsmidlets effekt på ensilagens egenskaber.

Tabel 1. Analyseresultater for indhold af tørstof, aske og næringsstoffer samt IVOS og mikrobiologi i prøver af frisk græs udtaget ved indlægning i silo eller stak (hver værdi er gennemsnit af 8 partier).

Variabel	2. slæt		3. slæt		SEM	P-værdier	
	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC		Beh.	Slæt
Tørstof, g/kg	371	375	357	323	28	0,59	0,26
Aske, g/kg TS	94	88	91	97	3	0,97	0,37
Råprotein, g/kg TS	140	141	148	154	7	0,40	0,07
NDF, g/kg TS	394	417	406	408	16	0,40	0,90
Sukker, g/kg TS	186	173	162	135	8	0,02	<0,01

IVOS, % af OS	79,4	78,6	76,9	75,2	0,9	0,17	<0,01
<b>Mikrobiologi</b>							
Mælkesyrebakterier, log <sub>10</sub> CFU/g	6,58	6,56	6,21	6,96	0,35	0,21	0,96
Coliforme bakterier, log <sub>10</sub> CFU/g	5,82	6,25	6,07	6,51	0,19	0,03	0,18
Gær, log <sub>10</sub> CFU/g	6,14	6,24	6,19	6,13	0,17	0,91	0,86
Skimmel, log <sub>10</sub> CFU/g	5,07	5,31	5,72	5,19	0,15	0,27	0,06

#### Ensilagens næringsstofsammensætning

Indholdet af råprotein var højest i 3. slæt, hvilket der også var tendens til i den friske afgrøde. Sammenlignet med prøvetagningen 60 dage efter høst blev der desuden observeret en højere andel NDF 90 dage efter høst. Restsukkerindholdet blev påvirket i retning af lavere indhold ved behandling med ensileringsmiddel.

#### Fermenteringsprodukter og aerob stabilitet

Der blev fundet en signifikant positiv effekt af behandling på ensilagens aerobe stabilitet 60 og 90 dage efter høst. Desuden var den aerobe stabilitet bedre i 2. slæt sammenlignet med 3. slæt både 60 og 90 dage efter høst (tabel 3). Der blev ikke fundet effekt af behandling på ensilagens pH, der varierede fra 3,65 til 5,39. Der blev fundet en markant effekt af behandling på eddikesyreindholdet, som var signifikant højere i behandlet ensilage sammenlignet med kontrol. Indholdet af mælkesyre var ikke påvirket af behandling. Det højere indhold af eddikesyre formodes at have haft positiv effekt på ensilagens aerobe stabilitet. Der blev observeret små forskelle mellem 2. og 3. slæt for indhold af ethanol og ammoniak samt tendens til forskel i 2-butanol.

#### Mikrobiologi

Antallet af coliforme bakterier, gær og skimmel lå alle under kvantifikationsgrænsen (3 log<sub>10</sub> CFU/g) i ensilagen. Der blev ikke fundet effekt af behandling på antallet af mælkesyrebakterier. Det formodes, at den signifikant bedre stabilitet af ensilagerne behandlet med ensileringsmiddel skyldes disses højere indhold af eddikesyre, der inhiberer gærvæksten under iltning af ensilagen.

Tabel 2. Analyseresultater for indhold af tørstof, aske, næringsstoffer og fermenteringsprodukter samt IVOS, pH og mikrobiologi af 2. og 3. slæt græsensilage behandlet med et homo- og heterofermentativt ensileringsmiddel (SiloSolve® FC) eller ingen behandling (kontrol) udtaget med ensilagebor 60 og 90 dage efter ensilering (mindst kvadraters gennemsnit).

Variabel	2. slæt				3. slæt				SEM	P-værdier		
	60		90		60		90			Beh.	Tid	Slæt
	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC				
Tørstof, g/kg	362	365	386	372	341	303	353	295	44	0,43	0,17	0,13
Aske, g/kg TS	98	101	101	101	106	106	103	109	4	0,46	0,60	0,08
Råprotein, g/kg TS	143	146	141	147	157	159	156	159	7	0,49	0,68	0,01
NDF, g/kg TS	424	422	385	398	388	421	397	427	11	0,09	<0,01	0,91
Sukker, g/kg TS	55	37	66	36	49	21	40	16	12	0,02	0,80	0,09
IVOS, % af OS	78,2	77,7	79,2	78,0	77,0	75,9	76,3	74,5	0,9	0,12	0,70	<0,01
pH	4,02	4,07	4,04	4,07	4,18	4,04	4,18	3,99	0,12	0,61	0,83	0,66
<b>Fermenteringsprofil</b>												
Mælkesyre, g/kg TS	88,0	78,6	82,4	75,9	84,4	82,6	82,0	88,1	12,5	0,80	0,64	0,79
Eddikesyre, g/kg TS	21,6	32,7	20,9	33,0	16,3	31,8	15,5	34,7	3,9	<0,01	0,54	0,52
Propionsyre, g/kg TS	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NA	NA	NA	NA
Smørsyre, g/kg TS	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NA	NA	NA	NA
Ethanol, g/kg TS	6,61	5,43	6,68	6,24	8,66	7,94	11,07	7,84	1,39	0,24	0,17	0,04
Propanol, g/kg TS	0,31	1,42	0,16	1,31	1,25	0,44	1,08	0,62	0,77	0,10	0,45	0,85
2-Butanol, g/kg TS	0,03	0,04	0,02	0,05	0,07	0,05	0,05	0,04	0,02	0,91	0,25	0,06
Ethylacetat, g/kg TS	0,05	0,06	0,03	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	0,01	0,20	<0,01	0,10

Propylacetat, g/kg TS	0,004	0,016	0,025	0,012	0,003	0,005	0,002	0,005	0,006	0,12	0,12	0,30
Ammoniak, g/kg TS	5,20	4,62	4,64	5,83	7,04	6,67	9,44	10,81	0,92	0,43	0,01	<0,01
<b>Mikrobiologi</b>												
Mælkesyrebakterier, log <sub>10</sub> CFU/g	7,14	6,85	6,52	6,35	6,41	7,08	6,70	7,08	0,41	0,74	0,19	0,77
Coliforme bakterier, log <sub>10</sub> CFU/g	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	NA	NA	NA	NA
Gær, log <sub>10</sub> CFU/g	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	NA	NA	NA	NA
Skimmel, log <sub>10</sub> CFU/g	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	NA	NA	NA	NA

Tabel 3. Analyseresultater for aerob stabilitet af 2. og 3. slæt græsensilage behandlet med et homo- og heterofermentativt ensileringsmiddel (SiloSolve® FC) eller ingen behandling (kontrol) udtaget med ensilagebor 60 og 90 dage efter ensilering (rå gennemsnit ± spredning).

Variabel	2. slæt				3. slæt				P-værdier			
	60		90		60		90		60		90	
	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC	Kontrol	SiloSolve FC	Beh. Slæt	Beh. Slæt	Beh. Slæt	Beh. Slæt
Aerob stabilitet, timer	207±61	240±0	202±57	240±0	143±76	210±62	147±78	188±70	0,03	0,03	0,05	0,03

## KONKLUSION

Behandling af 2. og 3. slæt græsensilage med SiloSolve® FC havde en signifikant positiv effekt på ensilagens aerobe stabilitet med et signifikant højere indhold af eddikesyre.

## ANERKENDELSER

Der rettes en tak til Bredebro Maskinstation v/ Otto Bossen og Bøvlingbjerg Maskinstation v/ Jan Jensen for godt samarbejde og professionelt udført arbejde med tilsætning af ensileringsmiddel og kontrol samt udtagning af friske græsprøver.

Desuden rettes en tak til følgende mælkeproducenter for at stille deres græsafgrøde og ensilage til rådighed for forsøget:

Berndt Mamsen	Toghale 1	6270	Tønder
Niels Martin Krag	Nørrebyen 11	6280	Højer
Krüger Fæ	Arnåvej 1	6240	Løgumkloster
I/S Abterpgaard	Abterp 27	6261	Bredebro
Henning Christensen	Kummerlev 19	6261	Bredebro
Jens Winther	Abterp 40	6261	Bredebro
Åge Seidelin	Hedegårdsvej 15	6261	Bredebro
Erling Christensen	Parkvej 29	6261	Bredebro
Guido Reinhard	Fladhedevej 8	7620	Lemvig
Benny Mathiasen	Rammevej 64	7620	Lemvig
Aksel Præstegård	Stationsvej 33	7620	Lemvig
Brian Birch	Kobberholmvej 3	7620	Lemvig

I/S Olesen-Mølgård	Kærvej 74	7650	Bøvlingbjerg
Hans Hansen	Hegnsgårdvej 7	7620	Lemvig
Henry Jensen	Møltrupvej 8	7650	Bøvlingbjerg
Mogens Juul	Kikkenborgvej 45	7570	Vemb

Kvægrådgiver Jens F. Thomsen, Lemvigegnens Landboforening og kvægbrugskonsulent Mette Deleuran Kyrstein, Syddansk Kvæg takkes for samarbejde om koordinering og prøveudtagning.

Seniorforsker Mogens Larsen og seniorforsker Ole Højberg, Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet takkes for henholdsvis analyser af ensilageekstrakter og mikrobiologiske analyser.

Endelig rettes en tak til Chr. Hansen for at stille SiloSolve® FC til rådighed for forsøget samt til Kristian Lybek Witt og Natasja Grønlund Nielsen for samarbejde om planlægning og gennemførelse af forsøget.

### **Litteratur**

Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E. og Braun, R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 69:562-567.

De Boever, J. L., Dupon, E., Wambacq, E. og Latré, J. 2013. The effect of a mixture of *Lactobacillus* strains on silage quality and nutritive value of grass harvested at four growth stages and ensiled for two periods. *Agricultural and Food Science*. 22:115-126.

Kristensen, N. B., Storm, A., Raun, B. M. L., Røjen, B. A. og Harmon, D. L. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1364-1377.

Kristensen, N. B., Højberg, O. og Thøgersen, R. Virkning af ensileringsmidler i græs – ensilering 2009. I: Kristensen, N. B. 2010. *Ensilering af majs og græs*. Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet, Tjele.

Kristensen, N. B., Sloth, K. H., Højbjerg, O., Spliid, N. H., Jensen, C. og Thøgersen, R. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J. Dairy Sci.* 93:3764-3774.

Åkerlind, M., Weisbjerg, M., Eriksson, T., Thøgersen, R., Udén, P., Ólafsson, B. L., Harstad, O. M. og Volden, H. 2011. Feed analyses and digestion methods. I: Volden, H. (2011): *NorFor - the Nordic Feed Evaluation System*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.