Institut für Nutztierwissenschaften Fachgebiet Tierernährung Universität Hohenheim Prof. Dr. Markus Rodehutscord



## Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* bei Variation der Grobfutter- und Stickstoffquellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von Dipl.-Agr.Biol. Karin Helga Renate Zuber (geb. Müller) geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt

2017

Die vorliegende Arbeit wurde am 12.12.2016 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2017
Dekan der Fakultät Agrarwissenschaften:	Prof. Dr. Ralf T. Vögele
Leitung des Kolloquiums:	Prof. Dr. Jens N. Wünsche
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Markus Rodehutscord
Berichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. Andreas Susenbeth
3. Prüfer:	JunProf. Dr. Uta Dickhöfer

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (Geschäftszeichen BO 2960/1-2).

## Inhaltsverzeichnis

Abk	ürzu	ingsver	zeichnis	III
Ver	zeicł	nnis der	r Texttabellen	.VII
Ver	zeicł	nnis der	r Anhangstabellen	IX
Ver	zeicł	nnis der	r Abbildungen	XI
1.	Ein	leitung		1
2.	Hin	tergrun	nd und Zielstellung	3
	2.1	Hinter	grund	3
	2.2	Zielste	ellung	8
3.	<i>In v</i> Gra	<i>vitro</i> -Ui s- und	ntersuchungen zur Variation der Gasbildungskinetik verschiedener Mais-, Luzernesilagen	11
	3.1	Mater	ial und Methoden	11
		3.1.1	Silagen	11
		3.1.2	In vitro-Untersuchungen im Hohenheimer Futterwerttest	13
		3.1.3	Analysen	17
		3.1.4	Berechnungen, regressionsanalytische Anpassung und grafische Aufbereit	ung 18
		3.1.5	Statistische Auswertung	20
	3.2	Ergeb	nisse	21
		3.2.1	Gasbildungskinetik	21
		3.2.2	Konzentration an Ammoniak-Stickstoff im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf	24
	3.3	Disku	ssion	28
4.	Effe Zeit	ekte de tverlau	r Grobfutterquelle auf die Konzentration an Ammoniak-Stickstoff im f im Rusitec	33
	4.1	Mater	ial und Methoden	33
		4.1.1	Silagen	33
		4.1.2	In vitro-Inkubationen im Pansen-Simulationssystem Rusitec	34
		4.1.3	Probennahmen und Probenaufarbeitung	37
		4.1.4	Analysen	38
		4.1.5	Berechnungen und statistische Auswertung	39
	4.2	Ergeb	nisse	40
	4.3	Disku	ssion	42

5.	Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Stickstoff-Ergänzungen auf die ruminale Fermentation und die mikrobielle Proteinsynthese bei der <i>in vitro</i> -Inkubation von					
Maissilage						
	5.1 Material und Methoden					
		5.1.1	Analysen auf flüchtige Bestandteile4	17		
		5.1.2	Verdaulichkeitsbestimmungen4	9		
		5.1.3	In situ-Inkubationen5	51		
		5.1.4	In vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest5	55		
		5.1.5	Effekte einer Ergänzung von Maissilage mit unterschiedlichen Stickstoff- Ouellen auf die Pansenfermentation im Rusitec	57		
	5.2	Ergeb	nisse	50		
	0.2	5.2.1	Verdaulichkeitsbestimmungen	50		
		5.2.2	In situ-Inkubationen	51		
		5.2.3	In vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest	55		
		5.2.4	Effekte einer Ergänzung von Maissilage mit unterschiedlichen Stickstoff-			
			Quellen auf die Pansenfermentation im Rusitec	57		
	5.3	Disku	ssion7	'1		
6.	Übe	rgreife	nde Diskussion, Schlussfolgerungen und Ausblick	31		
	6.1	Fehler	diskussion	31		
	6.2 Mikrobielle Proteinsynthese					
	6.3	Mögli Rusite	che Einschränkungen im Vergleich zwischen <i>in vivo</i> -Untersuchungen und der ec	m 39		
	6.4	Schlus	ssfolgerungen und Ausblick	)1		
7.	Zus	ammer	ıfassungç	)3		
8.	Summary					
Que	llenv	verzeic	hnis 10	)1		
Anh	ang			.1		

## Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems, der deutschen Rechtschreibung laut Duden und den Symbolen chemischer Elemente des Periodensystems wurden folgende Abkürzungen verwendet:

a	schnell abbaubare Fraktion, Auswaschverluste (in %)						
ADF	Säure-Detergenzien-Faser, acid detergent fibre						
ADFom	Säure-Detergenzien-Faser nach Veraschung						
ADL	Säure-Detergenzien-Lignin, acid detergent lignin						
AfBN	Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie						
AFRC	Agricultural and Food Research Council						
aNDF	Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit $\alpha$ -Amylase						
aNDF <sub>om</sub>	Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit $\alpha$ -Amylase und Veraschung						
AS	Aminosäuren						
b	potenziell abbaubare Fraktion (in %)						
b <sub>Gas</sub>	potenzielle Gasbildung (in ml)						
c	Abbaurate von b (in %/h)						
CGas	Gasbildungsrate (in %/h)						
СР	crude protein						
C <sub>2</sub> :C <sub>3</sub>	Verhältnis von Acetat zu Propionat						
Deg	Abbau nach t Stunden (in %)						
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft						
ED	Effektiver Abbau (in %)						

EMPS	Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese
Gb	Gasbildung nach t Stunden (in ml/200 mg organische Masse)
Gbt	kumulative Gasbildung der Probe zum Zeitpunkt der Ablesung nach t Stunden (in ml/200 mg organische Masse)
Gb <sub>0,t</sub>	mittlere Gasbildung der Blindwerte zum Zeitpunkt der Ablesung nach
	t Stunden (in ml)
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GS	Grassilage
GS01 bis GS05	Grassilage (Charge 1 bis Charge 5)
HCl <sub>Probe</sub>	Verbrauch an Salzsäure zur Titration bei der Analyse der Probe (in ml)
HCl <sub>BW</sub>	mittlerer Verbrauch an Salzsäure zur Titration bei der Analyse der Blindwerte (in ml)
HFT	Hohenheimer Futterwerttest
HS	Harnstoff
k	Passagerate (in %)
LAM	Flüssigkeit-assoziierte Mikroorganismen, liquid-associated microbes
LS	Luzernesilage
LS01 bis LS03	Luzernesilage (Charge 1 bis Charge 3)
ME	Umsetzbare Energie
MPS	Mikrobielle Proteinsynthese
MS	Maissilage
MS01 bis MS05	Maissilage (Charge 1 bis Charge 5)
MS + AS	Maissilage mit Zulage einer Aminosäuren-Mischung
MS + HS	Maissilage mit Zulage von Harnstoff

MS + Pep	Maissilage mit Zulage eines Erbsenpeptons
MS + Pro	Maissilage mit Zulage eines Erbsenproteins
n. a.	nicht analysiert
NDF	Neutral-Detergenzien-Faser, neutral detergent fibre
N-Effizienz	Effizienz der N-Nutzung
NEL	Nettoenergie-Laktation
NfE	Stickstoff-freie Extraktstoffe, N-free extracts
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH4Cl	Ammoniumchlorid
NH <sub>3</sub> -N	Ammoniak-Stickstoff
n. n.	nicht nachweisbar
NRC	National Research Council
nXP	nutzbares Rohprotein am Duodenum
OM	organische Masse
Rusitec	Pansensimulationstechnik, rumen simulation technique
SAM	Partikel-assoziierte Mikroorganismen, solid-associated microbes
SCFA	kurzkettige Fettsäuren, short-chain fatty acids
t	Zeit (in h)
ТМ	Trockenmasse
UDP	im Pansen nicht abgebautes Futterrohprotein, undegraded protein
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
Vt	Volumen zum Zeitpunkt der Ablesung nach t Stunden (in ml)
XA	Rohasche

- XF Rohfaser
- XL Rohfett
- XP Rohprotein

## Verzeichnis der Texttabellen

Tabelle 1: Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern und
Stärke der verwendeten Chargen Mais-, Gras- und Luzernesilage
Tabelle 2: Geschätzte Funktionsparameter der untersuchten Silagen (Mittelwerte,
Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 16$ )
Tabelle 3: P-Werte der Behandlungseffekte und deren Wechselwirkungen für die Ammoniak-
Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch ( $n \ge 5$ pro Zeitpunkt)24
Tabelle 4: Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern und
Stärke der verwendeten Silagen
Tabelle 5: pH-Wert, Gas- und Methanproduktion, Nährstoffabbau über 48 h, kurzkettige
Fettsäuren und Ammoniak-N im Effluenten sowie mikrobielle Proteinsynthese
(Mittelwerte, Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 4$ )
Tabelle 6: pH-Werte, Gehalte an Trockenmasse, Gärsäuren, Alkoholen und Ammoniak der
verwendeten Maissilage und Grassilage48
Tabelle 7: Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern,
Hemicellulose, Cellulose, Zucker und Stärke der für die Verdaulichkeitsbestimmungen
verwendeten Teilprobe der Maissilage und Grassilage51
Tabelle 8: Gehalte an Trockenmasse, Rohprotein, Detergenzien-Fasern, Hemicellulose,
Cellulose und Stärke der für die in situ-Inkubationen verwendeten Teilprobe der
Maissilage und Grassilage53
Tabelle 9: Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern, Zucker
und Stärke der für die in vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest verwendeten
Teilprobe der Maissilage und Grassilage56
Tabelle 10: Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern,
Zucker, Stärke und Reineiweiß der für die in vitro-Inkubationen im Rusitec verwendeten
Teilprobe der Maissilage und Grassilage59
Tabelle 11: Verdaulichkeit der Nährstofffraktionen sowie berechnete Energiekonzentrationen
der Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte, n = 5)61

Tabelle 12: Geschätzte in situ-Abbauparameter der Trockenmasse, des Rohproteins und der
Stärke der Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte,
n = 3)
Tabelle 13: Geschätzte in situ-Abbauparameter der aNDF, der ADF, der Hemicellulose und
der Cellulose der Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und P-
Werte, n = 3)63
Tabelle 14: Geschätzte Funktionsparameter der Maissilage und Grassilage (Mittelwerte,
Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 24$ )
Tabelle 15: P-Werte der Behandlungseffekte und deren Wechselwirkung für die Ammoniak-
Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch ( $n \ge 6$ pro Zeitpunkt)66
Tabelle 16: pH-Wert, Gas- und Methanproduktion, Nährstoffabbau über 48 h, kurzkettige
Fettsäuren und Ammoniak-N im Effluenten sowie mikrobielle Proteinsynthese (LS-
Means, Standardfehler und <i>P</i> -Werte, n = 5)68
Tabelle 17: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit
für die untersuchten Behandlungen (in mmol NH3-N/L; Mittelwerte und
Standardabweichungen, n $\geq$ 4 pro Zeitpunkt, <i>P</i> -Werte siehe Abbildung 9)69

### Verzeichnis der Anhangstabellen

verwendeten Maissilage, Grassilage und Amino-N-Quellen (in g/kg Trockenmasse) .. 113

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Kumulative Gasbildung der untersuchten Silagen über 72 Stunden (in
mL/200 mg organische Masse) und angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2)
(Mittelwerte und Standardabweichungen, $n \ge 16$ , geschätzte Funktionsparameter, siehe
Tabelle 2)
Abbildung 2: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch des
Blindwertes und der Maissilagechargen (MS01 bis MS05) über 48 Stunden (in mmol
NH <sub>3</sub> -N/L, Mittelwerte, Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 5$ pro Zeitpunkt;
*** <i>P</i> < 0,001)
Abbildung 3: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch der
Grassilagechargen (GS01 bis GS05) und Luzernesilagechargen (LS01 bis LS03) über
48 Stunden (in mmol NH <sub>3</sub> -N/L, Mittelwerte, Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 5$
pro Zeitpunkt; * <i>P</i> < 0,05; *** <i>P</i> < 0,001)27
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Pansensimulation Rusitec (verändert
nach Czerkawski und Breckenridge 1977)
Abbildung 5: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit
für Maissilage, Grassilage und Blindwert (in mmol NH3-N/L; Mittelwerte,
Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, n $\ge$ 4 pro Zeitpunkt; * <i>P</i> < 0,05; *** <i>P</i> < 0,001) 42
Abbildung 6: In situ-Abbau der Trockenmasse und der Nährstofffraktionen der Maissilage
(durchgezogene Linie) und Grassilage (gepunktete Linie) über 96 Stunden (in %) und
angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 4) (Mittelwerte und
Standardabweichungen, $n = 3$ , geschätzte Funktionsparameter, siehe Tabelle 12 und
Tabelle 13)
Abbildung 7: Kumulative Gasbildung der Maissilage und Grassilage über 72 Stunden (in
mL/200 mg organische Masse) und angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2)
(Mittelwerte und Standardabweichungen, $n \ge 24$ , geschätzte Funktionsparameter, siehe
Tabelle 14)
Abbildung 8: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch der
Maissilage, Grassilage und des Blindwertes über 48 Stunden (in mmol NH <sub>3</sub> -N/L;
Mittelwerte, Standardabweichungen und <i>P</i> -Werte, $n \ge 6$ pro Zeitpunkt; * <i>P</i> < 0,05;
***P < 0,001)

Abbildung 9: Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit für die untersuchten Behandlungen (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L; Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 4$  pro Zeitpunkt; \**P* < 0,05; \*\*\**P* < 0,001) ... 70

#### 1. Einleitung

Silagen stellen wichtige Grobfuttermittel für Wiederkäuer in Europa dar (Givens und Rulquin 2004). Hierbei spielen besonders Maissilage (MS) und Grassilage (GS) eine Rolle, da diese häufig in Rationen für hochleistende Wiederkäuer eingesetzt werden. Allerdings unterscheiden sich MS und GS deutlich in ihrer Nährstoffzusammensetzung und im Abbauverhalten ihrer Nährstofffraktionen im Pansen. Dies hat zur Folge, dass sich das Angebot und die Verfügbarkeit an Energie und Rohprotein (XP) für die Mikroorganismen des Pansens zwischen MS und GS deutlich unterscheiden und dadurch die mikrobielle Proteinsynthese (MPS) beeinflusst wird. Des Weiteren können sich verschiedene Chargen einer Silageart deutlich hinsichtlich ihrer Qualität unterscheiden. In der Fütterung von hochleistenden Nutztieren ist die Optimierung der Zusammensetzung der verwendeten Rationen ein grundlegendes Anliegen. Dies ist erforderlich, um das Leistungspotenzial der Tiere ausschöpfen zu können und gleichzeitig Nährstoffverluste zu minimieren. Aufgrund dessen ist die Kenntnis der Nährstoffzusammensetzung, des Abbauverhaltens der unterschiedlichen Nährstofffraktionen und des Futterwertes der Rationskomponenten von grundlegender Bedeutung. Für Wiederkäuer kann das Abbauverhalten und die Verfügbarkeit der Nährstofffraktionen mit Hilfe von in vivo, in situ oder in vitro-Verfahren ermittelt werden. Hierbei haben in vitro-Methoden unter anderem den Vorteil, dass sie kostengünstiger sind und den Einsatz von Versuchstieren reduzieren. Weit verbreitet ist das semi-kontinuierliche Pansen-Simulationssystem Rusitec (rumen simulation technique) nach Czerkawski und Breckenridge (1977), mit welchem sich Kenngrößen der mikrobiellen Fermentation im Pansen bestimmen lassen.

Bei Wiederkäuern ist ein großer Teil des am Darm anflutenden Rohproteins (nXP = nutzbares Rohprotein am Duodenum) mikrobiellen Ursprungs und nur bei einem kleineren Anteil handelt es sich um unabgebautes Futterrohprotein (UDP, undegraded protein). Aufgrund dieser Bedeutung des mikrobiellen Proteins kann die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (EMPS) einen starken Einfluss auf die nXP-Versorgung der Wiederkäuer haben. Deshalb stellt die EMPS eine wichtige Kenngröße der Fermentation dar und wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* häufig bestimmt. Jedoch sind Ergebnisse bezüglich der EMPS für MS und GS bzw. MS- und GS-basierte Rationen widersprüchlich, die in vergangenen *in vivo-* und *in vitro*-Untersuchungen ermittelt wurden (Givens und Rulquin 2004, Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c). Dies könnte mit einer fehlenden Simulation des ruminohepatischen Kreislaufs *in vitro* zusammenhängen und damit bei Inkubation von MS zu einem Mangel an verfügbarem Stickstoff für die Mikroorganismen im Vergleich zu GS führen. Diese Hypothese

wurde zuvor bereits untersucht, indem der XP-Gehalt einer MS mit Hilfe einer Harnstoff-Supplementierung an das Niveau einer GS angepasst wurde (Hildebrand et al. 2011c). Dies resultierte jedoch nicht in einer ähnlichen EMPS wie für GS beobachtet. Das Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss unterschiedlicher Stickstoff-Quellen auf die Fermentation und die EMPS von MS im Vergleich zu GS zu untersuchen und Fermentationseigenschaften der eingesetzten Silagen umfassend zu charakterisieren.

#### 2. Hintergrund und Zielstellung

#### 2.1 Hintergrund

Es gibt bereits umfassende Übersichtsartikel (Bach et al. 2005, Clark et al. 1992, Dewhurst et al. 2000, Firkins et al. 1998, Hoover und Stokes 1991, Jouany 1996, Lapierre und Lobley 2001, National Research Council 2001, Stern et al. 1994), die sich mit dem Stickstoff-Stoffwechsel und der MPS im Pansen beschäftigen, weshalb auf diese verwiesen wird und im Folgenden auf eine detaillierte Darstellung der Thematik verzichtet wird.

Bei Wiederkäuern setzt sich das nXP aus im Pansen synthetisiertem mikrobiellem XP, UDP und zu einem deutlich geringeren Anteil aus endogenem XP zusammen (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, GfE 2001). Da sich ein großer Teil der von Wiederkäuern im Dünndarm absorbierten Aminosäuren (AS) von mikrobiellem XP ableitet, stellt dieses eine wichtige Proteinquelle für selbige dar (Dewhurst et al. 2000). Dabei weisen die Mikroorganismen des Pansens ein variables, aber üblicherweise gutes AS-Muster auf (Dewhurst et al. 2000). So ist das AS-Muster der Mikroorganismen günstig für die Synthese von Milchprotein, weshalb es lohnenswert ist durch gezielte Fütterungsstrategien die MPS zu fördern (National Research Council, NRC 2001). Die Menge an mikrobiellem XP, die den Darm erreicht, hängt von der Verfügbarkeit von N und Kohlenhydraten und der Effizienz der Nutzung dieser Nährstofffraktionen durch die Bakterien des Pansens ab (Bach et al. 2005). Aufgrund dessen kann der N-Stoffwechsel im Pansen unterteilt werden in den XP-Abbau, der N-Quellen für die Bakterien liefert, und die MPS (Bach et al. 2005).

Da davon ausgegangen wird, dass die zur Verfügung stehende Energie die MPS am stärksten begrenzen kann, wird die EMPS in der Regel beurteilt, indem die Menge an mikrobiellem N bestimmt wird, die pro kg abgebauter organischer Masse gebildet wurde (Bach et al. 2005). Eine Maximierung der EMPS ist von Interesse, weil sie in einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Wiederkäuer resultiert (Hackmann und Firkins 2015). Zusätzlich wird häufig die Effizienz der N-Nutzung (N-Effizienz) bestimmt (Bach et al. 1999, Griswold et al. 2003). Eine Maximierung der N-Effizienz führt sowohl zu einer Erhöhung des nXP als auch zu einer Reduzierung von N-Verlusten (Bach et al. 2005).

Es gibt verschiedene Aspekte, die die MPS und die EMPS beeinflussen können. So nehmen Protozoen Bakterien als wichtigste Proteinquelle auf und können deshalb die Menge an mikrobiellem XP beeinflussen und dadurch zu einer Verminderung der EMPS führen (Dewhurst et al. 2000, Jouany 1996, Newbold et al. 2015). Deshalb kann eine Defaunierung, also eine Eliminierung der Protozoen im Pansen, den ruminalen N-Stoffwechsel verbessern, weil hierdurch die bakterielle Biomasse im Pansen und der Fluss an bakteriellem N aus dem Pansen gesteigert werden (Koenig et al. 2000). Außerdem kann eine Defaunierung zu einer Verminderung des Abbaus der organischen Masse (OM) im Pansen führen (Jouany 1996, Newbold et al. 2015). Sowohl die größere Menge an mikrobiellem XP als auch der niedrigere OM-Abbau aufgrund der Defaunierung resultieren in einer höheren EMPS.

Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die MPS durch ein synchrones Angebot an fermentierbarer Energie und abbaubarem XP im Pansen gesteigert wird (Dewhurst et al. 2000), weil die Mikroorganismen des Pansens beide Komponenten gleichzeitig nutzen können (Yang et al. 2010). Denn eine asynchrone Freisetzung von Ammoniak (NH<sub>3</sub>) und Energie im Pansen führt zu einer ineffizienten Nutzung der fermentierbaren Bestandteile der Futtermittel und einer reduzierten MPS (NRC 2001). Grundsätzlich wird die Synchronisation des Energie- und XP-Angebots im Pansen durch das Abbauverhalten der Nährstofffraktionen innerhalb eines Futtermittels, durch das Abbauverhalten verschiedener Futtermittel und durch die Fütterungsfrequenz verschiedener Futtermittel beeinflusst. Besonders bei Grobfuttermitteln kann der Aspekt der Synchronisation eine wichtige Rolle spielen, da bei diesen die Menge und die Freisetzung wichtiger Nährstoffe üblicherweise asynchron ist (Hersom 2008). In diesem Zusammenhang sind vor allem Silagen zu erwähnen, bei welchen während der Silierung bereits ein bedeutender Anteil der schnell abbaubaren Kohlenhydratfraktion verloren geht, weshalb die Abbaubarkeit der Kohlenhydratfraktionen und die Abbaubarkeit des XP in Silagen schlecht zusammenpassen (Beever 1993). Deshalb kann besonders bei einer Fütterung von Grobfuttermitteln durch eine Ergänzung von Energie- oder N-Quellen die Fermentation im Pansen verbessert werden (Yang et al. 2010). Denn besteht ein Überangebot an XP oder ein Ungleichgewicht in der Versorgung mit AS, so führt dies zu N-Verlusten über den Urin, welche wiederum eine Belastung für die Umwelt darstellen (Kaswari et al. 2007). Trotzdem wurden in der Vergangenheit von teilweise widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Einflusses eines synchronen Angebots an Energie und N im Pansen berichtet (Yang et al. 2010). Dies kann unter anderem mit der Komplexität des Ökosystems Pansen zusammenhängen, denn wenn das Nährstoffangebot für eine spezielle Mikroorganismenpopulation synchron ist, dann ist es dennoch möglich, dass dies für eine andere Population nicht zutrifft (Bach et al. 2005). Außerdem kann die N-Rezyklierung in den Pansen über den ruminohepatischen Kreislauf zu einer Stabilisierung der MPS beitragen, wenn das N-Angebot asynchron ist (Bach et al. 2005, Reynolds und Kristensen 2008), so dass Vorteile durch eine Synchronisation des

Nährstoffangebots *in vivo* möglicherweise nicht beobachtet werden können. Allerdings lässt sich die N-Rezyklierung in Pansensimulationen nicht nachahmen, weshalb ein asynchrones Angebot an N und Energie die MPS und die EMPS *in vitro* negativ beeinflussen kann. Aufgrund dessen könnten sich Schätzungen bezüglich der EMPS zwischen *in vivo-* und *in vitro-*Studien unterscheiden (Grings et al. 2005).

Grobfutter werden überwiegend als Silage konserviert (Spiekers et al. 2009). Deshalb sind Silagen aller Art wichtige Grobfuttermittel für Wiederkäuer in Europa (Givens und Rulquin 2004). Hierbei werden vor allem MS und GS häufig in Rationen für hochleistende Wiederkäuer eingesetzt. Allerdings unterscheiden sich diese beiden Silagearten deutlich in ihrer Nährstoffzusammensetzung und im Abbauverhalten ihrer Nährstofffraktionen im Pansen. So weisen MS üblicherweise höhere Gehalte an OM sowie Nicht-Struktur-Kohlenhydraten auf, hierbei handelt es sich vorwiegend um Stärke (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, DLG 1997). Dagegen beinhalten GS verhältnismäßig niedrige Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten und ein großer Teil der Energie-Zufuhr leitet sich von fermentierbaren Faserfraktionen ab (Juniper et al. 2008). Zusätzlich haben GS in der Regel höhere XP-Gehalte als MS (DLG 1997). Noch höhere XP-Gehalte weisen Luzernesilagen (LS) auf (DLG 1997), die laut Orozco-Hernández et al. (1997) einen ähnlichen Futterwert wie GS haben. Allerdings können sich auch verschiedene Chargen einer Silageart deutlich hinsichtlich ihrer Qualität unterscheiden. Der Zusammenhang ist darin zu sehen, dass der Pflanzenbestand, das Entwicklungsstadium der Pflanzen und die Düngung die Nährstoffzusammensetzung, insbesondere den Zuckergehalt des Erntegutes beeinflussen (Jeroch et al. 2008, Spiekers et al. 2009). Der Zuckergehalt des Erntegutes hat bei der Silierung wiederum einen Einfluss auf den Umfang der Milchsäuregärung und damit auf die Qualität der Silagen (Spiekers et al. 2009). Fehlgärungen während der Silierung können zu Energieverlusten und Eiweißabbau führen (Spiekers et al. 2009). Außerdem finden während der Silierung umfangreiche Änderungen in der chemischen Zusammensetzung des Erntegutes statt (Keady et al. 2013). Zum einen werden wasserlösliche Kohlenhydrate vornehmlich zu Milchsäure und anderen flüchtigen Fettsäuren umgewandelt, zum anderen nimmt der schnell lösliche Bestandteil des XP durch Proteolyse und Desaminierungsprozesse zu (Keady et al. 2013). Die hohe Löslichkeit der resultierenden Kombination aus N-Verbindungen in den Silagen hat eine bedeutende Auswirkung auf deren Nutzung durch die Mikroorganismen des Pansens und das Wirtstier (Givens und Rulquin 2004). Generell zeigen GS größere Variationen in ihrer Nährstoffstoffzusammensetzung und ihrem Futterwert als MS aufgrund größerer Unterschiede bezüglich des Nutzungsstadiums und des Pflanzenbestandes (DLG 1997). Aufgrund der in diesem Absatz beschriebenen Aspekte unterscheidet sich das Angebot und die Verfügbarkeit an Energie und XP für die Mikroorganismen des Pansens deutlich zwischen MS, GS und LS und beeinflusst dadurch die Fermentation sowie die MPS und damit die Leistung der Wirtstiere.

*In vivo*-Befunde zeigten bei schrittweisem Ersatz von GS durch MS einen linearen Anstieg bzw. Abfall der Verdaulichkeit, abhängig von der Nährstofffraktion (Browne et al. 2005, Hildebrand et al. 2011a, Juniper et al. 2008). Allerdings sind die Ergebnisse bezüglich der Verdaulichkeit einzelner Nährstofffraktionen aus MS- und GS-basierten Rationen teilweise widersprüchlich in der Literatur beschrieben. Außerdem resultierten zunehmende MS-Anteile in einer Ration mit GS und MS-basierte Rationen im Vergleich zu GS-basierten Rationen in höheren Trockenmasse-Aufnahmen der Tiere (Browne et al. 2005, Mulligan et al. 1999, Mulligan et al. 2002). Des Weiteren wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass sich MS positiv auf die Leistung von Milchkühen auswirkt (Mulligan et al. 2002, O'Mara et al. 1998). Für eine Total-Mischration, die auf LS basierte, ermittelten Bulang et al. (2006) eine höhere Trockenmasse-Aufnahme für LS im Vergleich zu GS wurde auch von Dewhurst et al. (2003) und Broderick et al. (2002) beschrieben, die in diesen Untersuchungen in einer höheren Milchmenge resultierte.

In vivo-Daten, die von Givens und Rulquin (2004) zusammengefasst wurden, weisen auf eine höhere EMPS für MS-basierte Rationen im Vergleich zu GS-basierten bzw. LS-basierten Rationen hin. Die höhere EMPS für MS-basierte Rationen wurde von Givens und Rulquin (2004) hauptsächlich mit der großen Menge an leicht fermentierbarer Stärke in Verbindung gebracht und dadurch mit einer synchroneren Bereitstellung von Energie und XP für die Mikroorganismen des Pansens. Dagegen wird bei GS die rasche und asynchrone Freisetzung von N im Verhältnis zu den Kohlenhydraten als wichtigste Ursache für die niedrige EMPS genannt (Siddons et al. 1985). Im Gegensatz zu den in vivo-Daten deuten in vitro-Daten, die durch die Inkubation verschiedener Total-Mischrationen im Rusitec gewonnen wurden, darauf hin, dass MS einen negativen Einfluss auf die EMPS hat (Boguhn et al. 2006). Diese Beobachtung wurde von Hildebrand et al. (2011b) und Hildebrand et al. (2011c) sowohl bei der alleinigen Inkubation von MS und GS als auch bei der Inkubation von Rationen mit unterschiedlichen Anteilen an MS und GS bestätigt, die mit Sojaextraktionsschrot supplementiert waren. Die Autoren vermuteten, dass ein Mangel an verfügbarem N auf Grund des fehlenden ruminohepatischen Kreislaufs in vitro die Fermentation und die EMPS bei Inkubation von MS bzw. von Rationen mit hohen MS-Anteilen im Vergleich zu GS bzw. Rationen mit hohen GS-Anteilen beeinträchtigt haben könnte (Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c). Diese Hypothese wurde von Hildebrand et al. (2011c) durch eine Supplementierung von Harnstoff (HS) zu MS untersucht, die den N-Gehalt der MS an den der GS anpasste. Die HS-Supplementierung zu MS resultierte in selbiger Untersuchung tatsächlich in einer gesteigerten EMPS verglichen mit der unsupplementierten MS. Allerdings konnte der Wert, der für GS beobachtet wurde, auch bei HS-Supplementation der MS nicht erreicht werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass bei der in vitro-Inkubation von MS nicht nur die zur Verfügung stehende N-Menge das mikrobielle Wachstum begrenzt, sondern auch die Verfügbarkeit geeigneter N-Quellen. Denn laut Russell et al. (1992) nutzen cellulolytische Mikroorganismen NH<sub>3</sub> als N-Quelle zur MPS, wohingegen amylolytische Mikroorganismen sowohl NH<sub>3</sub> als auch AS verwenden. Im Gegensatz dazu können Protozoen kein NH<sub>3</sub> verwerten (NRC 2001). Allerdings benötigen cellulolytische Bakterien für ihr Wachstum auch verzweigtkettige kurzkettige Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA) und diese stammen aus der Fermentation von verzweigtkettigen AS (Russell et al. 1992). Ein Mangel an verzweigtkettigen SCFA könnte laut Russell et al. (1992) dann vorgefunden werden, wenn Rationen mit hohem Grobfutter-Anteil einen niedrigen Gehalt an Reinprotein aufweisen und mit Nicht-Protein-N ergänzt werden. Dies trifft auf eine Supplementierung von MS mit HS zu. Somit könnte bei der Untersuchung von Hildebrand et al. (2011c) bei der MS-Behandlung mit HS-Supplementierung zusätzlich ein Mangel an verzweigtkettigen SCFA bestanden haben.

Wie dem Übersichtsartikel von Bach et al. (2005) zu entnehmen ist, wurde in früheren Untersuchungen bereits gezeigt, dass eine Ergänzung von AS oder Peptiden zu einem Anstieg des bakteriellen Wachstums und des Faserabbaus führt. So deuten die Ergebnisse von Carro und Miller (1999) aus der *in vitro*-Inkubation im Rusitec darauf hin, dass sowohl für ein maximales Wachstum der cellulolytischen Mikroorganismen des Pansens als auch für einen maximalen Abbau der Faserfraktionen andere N-Formen als NH<sub>3</sub> benötigt werden. Auch die *in vitro*-Ergebnisse von Griswold et al. (1996) weisen darauf hin, dass Proteine, Peptide und AS für den Nährstoffabbau und die MPS erforderlich sind. Möglicherweise werden AS oder Peptide in diesem Zusammenhang intakt durch die Bakterien aufgenommen und direkt oder nach einer Transaminierung in das bakterielle Protein eingebaut (Demeyer und Fievez 2004). Allerdings wird für die Aufnahme einer AS nahezu genauso viel Energie verbraucht wie zur *de novo* Synthese einer AS (Russell 1998, Russell 2007). Somit sollte eine Aufnahme von intakten AS oder Peptiden keinen energetischen Vorteil für die Bakterien darstellen. Des Weiteren ist Amino-N (AS, Peptide, Protein) nur dann vorteilhaft, wenn die Fermentationsrate der Kohlenhydrate schnell ist und ein Überschuss an Kohlenhydraten besteht (Russell 1998,

Van Kessel und Russell 1996). Ein relativer Überschuss an Kohlenhydraten liegt für die Bakterien des Pansens hauptsächlich dann vor, wenn die Verfügbarkeit von N begrenzt ist, jedoch kann auch ein Mangel an Amino-N hierzu führen (Russell 1998). In Rationen für Wiederkäuer kann die Verfügbarkeit an N niedrig sein, wenn MS die einzige Grobfutterquelle darstellt (Hackmann und Firkins 2015). Außerdem könnte ein Überschuss an Kohlenhydraten zusätzlich verstärkt werden, wenn der zur Verfügung stehende N hauptsächlich in Form von NH<sub>3</sub> vorliegt (Van Kessel und Russell 1996). Steht Bakterien dagegen Amino-N zur Verfügung, erhöht sich deren Wachstumsgeschwindigkeit und die Raten der katabolen und anabolen Reaktionen sind besser aufeinander abgestimmt, was zu einer verbesserten Ausnutzung der Energie führt (Russell 2007, Van Kessel und Russell 1996). In der Summe resultiert dies in einer Verbesserung der EMPS (Russell 1998). Denn wenn die Rate der katabolen Reaktionen die der anabolen Reaktionen überschreitet, verschwenden viele Bakterien das überschüssige ATP (Russell 2007). Wie Hackmann und Firkins (2015) in ihrem Übersichtsartikel zusammenfassen, können verschiedene Mikroorganismen des Pansens, wie Beispiel Protozoen, bei einem Überschuss an Kohlenhydraten zusätzlich zum akkumulieren und während einer Reservekohlenhydrate späteren Limitierung an Kohlenhydraten diese wieder mobilisieren. Dies kann jedoch auch ATP verbrauchen und so die EMPS verringern (Hackmann und Firkins 2015). Somit hängt eine verbesserte EMPS, die im Zusammenhang mit einer Ergänzung mit Amino-N beobachtet wird, unter anderem mit einer verbesserten Ausnutzung der Energie und einer verminderten Synthese von Reservekohlenhydraten durch die Mikroorganismen des Pansens zusammen. Außerdem beruht laut Argyle und Baldwin (1989) die stimulierende Wirkung des Amino-N auf das mikrobielle Wachstum mehr darauf wie viele verschiedene AS den Bakterien in einer bestimmten Mischung zur Verfügung stehen als auf spezifischen AS, die das Wachstum begrenzen.

#### 2.2 Zielstellung

Aufgrund der zahlreichen Einflüsse, die die Qualität verschiedener Silagearten und Silagechargen beeinflussen können, war es das erste Ziel dieser Arbeit, die Variation verschiedener Silagearten und Silagechargen anhand ihrer *in vitro*-Gasbildungkinetik im Hohenheimer Futterwerttest zu bestimmen. Zusätzlich sollte die Konzentration an Ammoniak-Stickstoff (NH<sub>3</sub>-N) im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf ermittelt werden.

MS und GS unterscheiden sich deutlich in ihrer Nährstoffzusammensetzung und im Abbauverhalten ihrer Nährstofffraktionen. Deshalb ist auch das Angebot und die Verfügbarkeit

8

an Energie und XP für die Mikroorganismen des Pansens bei Inkubation von MS und GS *in vitro* verschieden und beeinflusst dadurch die Fermentation sowie die MPS. Allerdings wurden die beiden Silagen in den meisten vorausgegangenen Untersuchungen mit Konzentratfuttermitteln kombiniert. Aufgrund dessen war es das zweite Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Grobfutterquelle (MS im Vergleich zu GS) ohne eine Konzentrat-Ergänzung sowohl auf die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf als auch auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* zu untersuchen.

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde die niedrigere Fermentation der OM und der Faserfraktionen sowie die niedrigere EMPS bei Inkubation von MS bzw. Rationen mit hohen MS-Anteilen auf einen Mangel an verfügbarem N im Vergleich zu GS bzw. Rationen mit hohen GS-Anteilen zurückgeführt (Hildebrand et al. 2011a, Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c). Infolgedessen wurde von Hildebrand et al. (2011c) MS mit HS supplementiert, um den N-Gehalt der MS-Behandlung an den der GS-Behandlung anzugleichen. Jedoch führte die HS-Supplementierung zu MS in selbiger Untersuchung lediglich zu einer Verbesserung der EMPS, jedoch nicht zu einer Angleichung auf das Niveau der GS. Deshalb war es das dritte Ziel dieser Arbeit, den Einfluss unterschiedlicher N-Ergänzungen zu MS im Vergleich zu GS auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens in vitro zu untersuchen. Hierbei wurde vermutet, dass eine Ergänzung von MS mit Amino-N (AS, Peptide, Protein) eine größere Zunahme in der EMPS ermöglicht als zuvor für eine HS-Supplementierung beschrieben (Hildebrand et al. 2011c) und in ähnlichen Werten für die EMPS resultiert wie für GS. Denn in vivo wird die niedrige N-Verfügbarkeit aus MS normalerweise durch eine Ergänzung von Futtermitteln mit hohem XP-Gehalt ausgeglichen, die neben NH<sub>3</sub> auch Amino-N liefern.

# 3. *In vitro*-Untersuchungen zur Variation der Gasbildungskinetik verschiedener Mais-, Gras- und Luzernesilagen

Ziel dieses Teils der Arbeit war es die Variation verschiedener Silagearten und Silagechargen anhand ihrer *in vitro*-Gasbildungkinetik im Hohenheimer Futterwerttest (HFT) zu bestimmen. Zusätzlich sollte die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf ermittelt werden.

#### 3.1 Material und Methoden

#### 3.1.1 Silagen

Für den ersten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt fünf Chargen MS (MS01 bis MS05), fünf Chargen GS (GS01 bis GS05) und drei Chargen LS (LS01 bis LS03) von unterschiedlichen landwirtschaftlichen Betrieben bezogen (siehe Tabelle A1). Alle MS- und GS-Chargen stammten aus Baden-Württemberg und wurden im Jahr 2011 eingefahren. Die drei Chargen LS wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt Hofgut Neumühle in Rheinland-Pfalz zur Verfügung gestellt und wurden bis auf eine Charge, die bereits im Jahr 2010 geerntet wurde, ebenfalls im Jahr 2011 eingefahren. Für die anschließenden in vitro-Inkubationen wurden die frisch aus den Fahrsilos oder Siloballen entnommenen Silagechargen zunächst bei 40 °C für mindestens 48 Stunden in einem Umlufttrockenschrank getrocknet und danach mit Hilfe einer Schneidmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) auf einen Siebdurchgang von 1 mm vermahlen. Die Analysen auf Weender Rohnährstoffe, Detergenzien-Fasern und Stärke (für die MS-Chargen) erfolgten wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die Analysenergebnisse können Tabelle 1 entnommen werden und zeigen, dass sich die Silagearten ebenso wie die Chargen innerhalb einer Silageart deutlich in ihren Gehalten an Rohnährstoffen und Detergenzien-Fasern unterschieden. Die MS-Chargen hatten im Vergleich zu den GS- und LS-Chargen, die im Mittel ähnliche Gehalte an OM aufwiesen, die höchsten Gehalte an OM. Die Gehalte an OM innerhalb der MS lagen zwischen 94,3 % der Trockenmasse (TM) für MS02 und 96,4 % TM für MS05. Die drei Chargen LS schwankten lediglich zwischen 90,0 % TM (LS01) und 91,0 % TM (LS03). Die GS unterschieden sich am stärksten in ihren Gehalten an OM, diese lagen zwischen 83,9 % TM für GS03 und 91,8 % TM für GS01. Bezüglich des XP hatten die GS- und LS-Chargen deutlich höhere Gehalte als die MS-Chargen. Die Gehalte an XP schwankten zwischen 7,3 % TM und 9,4 % TM bei den MS, zwischen 14,0 % TM und 21,6 % TM bei den GS und zwischen 13,9 % TM und 16,8 % TM bei den LS.

Silage	TM	OM	XP	XL	XF	aNDFom	ADF	ADL	Stärke
	%	% TM	% TM	% TM	% TM				
<b>MS01</b>	94,3	94,9	8,5	2,9	20,7	40,1	24,4	2,1	32,2
<b>MS02</b>	94,5	94,3	9,4	3,2	23,2	44,3	28,1	3,6	25,0
<b>MS03</b>	95,2	95,6	7,9	2,9	23,3	48,8	26,4	2,0	26,5
<b>MS04</b>	94,4	96,2	7,3	3,7	12,8	29,6	16,0	1,0	44,8
<b>MS05</b>	95,4	96,4	7,3	3,2	20,2	42,6	23,0	1,7	30,2
<b>GS01</b>	92,1	91,8	16,9	4,1	24,5	41,9	27,8	2,2	n. a.
<b>GS02</b>	91,8	91,7	14,0	3,1	28,5	47,0	31,3	2,4	n. a.
GS03	91,7	83,9	18,2	4,5	30,1	49,9	34,2	2,4	n. a.
<b>GS04</b>	95,0	88,7	21,6	4,1	24,0	34,4	27,0	3,5	n. a.
GS05	92,7	89,4	14,1	2,7	29,1	49,0	34,1	4,2	n. a.
LS01	93,1	90,0	13,9	1,9	43,2	58,0	48,9	8,5	n. a.
LS02	93,3	90,1	15,4	2,6	25,8	39,3	30,0	3,9	n. a.
LS03	95,6	91,0	16,8	2,3	31,6	44,9	37,8	6,8	n. a.

**Tabelle 1:** Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern undStärke der verwendeten Chargen Mais-, Gras- und Luzernesilage

MS = Maissilage (Chargen 1 bis 5); GS = Grassilage (Chargen 1 bis 5); LS = Luzernesilage (Chargen 1 bis 3); TM = Gehalt an Trockenmasse nach Trocknung bei 40 °C über mindestens 48 Stunden; OM = organische Masse;  $XP = Rohprotein; XL = Rohfett; XF = Rohfaser; aNDF_{om} = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit <math>\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; n. a. = nicht analysiert

Die Gehalte an Rohfett (XL) schwankten weniger stark zwischen den Silagen, hier hatten die GS im Mittel die höchsten Gehalte, gefolgt von den MS. Die Werte lagen zwischen 2,7 % TM und 4,5 % TM für die GS, zwischen 2,9 % TM und 3,7 % TM für die MS und für die LS zwischen 1,9 % TM und 2,6 % TM. Die Gehalte an Rohfaser (XF) ebenso wie die Gehalte an Neutral-Detergenzien-Faser (NDF), Säure-Detergenzien-Faser (ADF) und Säure-Detergenzien-Lignin (ADL) waren im Mittel für die LS-Chargen am höchsten und für die MS-Chargen am niedrigsten. Den niedrigsten XF-Gehalt hatte MS04 mit 12,8 % TM und den höchsten XF-Gehalt innerhalb der MS hatte MS03 mit 23,3 % TM. Die GS hatten XF-Gehalte zwischen 24,0 % TM und 30,1 % TM und die LS zwischen 25,8 % TM und 43,2 % TM. Die Gehalte an Stärke wurden lediglich in den MS-Chargen analysiert und lagen zwischen 25,0 % TM für MS02 und 44,8 % TM für MS04.

#### 3.1.2 In vitro-Untersuchungen im Hohenheimer Futterwerttest

Zur Bestimmung der Gasbildungskinetik im Zeitverlauf und zur Bestimmung der Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf wurden alle 13 Silagechargen im HFT, wie von Menke et al. (1979) beschrieben, auf Grundlage der amtlichen Methode 25.1 des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA 1976) inkubiert. Das Prinzip dieses *in vitro*-Verfahrens ist, dass eine definierte Menge einer Probe in einen Kolbenprober eingewogen und mit einem Pansensaft-Puffer-Gemisch bei 39 °C in einem Brutschrank für eine bestimmte Zeit inkubiert wird und die Gasbildung ermittelt wird. Durchgeführt wurden insgesamt 8 Durchgänge des HFT mit jeweils 146 Kolbenprobern.

#### Vorbereitungen

Pro Silagecharge wurden jeweils 200 mg ( $\pm$  5 mg) der auf 1 mm Siebdurchgang vermahlenen getrockneten Silagecharge (siehe Kapitel 3.1.1) unter Verwendung einer Feinwaage abgewogen und mit Hilfe eines Wägeschiffchens auf den Boden eines Kolbenprobers verbracht. Die verwendeten Kolbenprober hatten ein Volumen von 100 mL und waren auf 1 mL graduiert, wodurch eine Ablesegenauigkeit von 0,5 mL gegeben war. An der schmalen Öffnung jedes Kolbenprobers war ein Silikonschlauch mit Schlauchklemme angebracht, der zum Befüllen der Kolbenprober notwendig war. Im Anschluss an das Einwiegen der Proben wurde jeweils ein mit Vaseline eingefetteter Kolben in jeden Kolbenprober eingeführt. Das Einfetten der Kolben mit Vaseline hat den Zweck, dass sowohl der Reibungswiderstand verringert wird als auch die Kolbenprober dadurch gas- und wasserdicht sind. Pro Durchgang wurden auf diese Weise jeweils 10 Kolbenprober jeder Silagecharge vorbereitet. Ebenso wurden pro Durchgang jeweils 10 Kolbenprober ohne Futterprobe vorbereitet, welche als Blindwerte dienten. Zusätzlich wurden pro Durchgang jeweils 3 Kolbenprober mit einem Heu-Standard und 3 Kolbenprober mit einem Kraftfutter-Standard vorbereitet. Während des Einwiegens der Kolbenprober wurden gleichzeitig repräsentative Proben der 13 Silagechargen gewonnen, die anschließend im institutseigenen Labor hinsichtlich ihrer Gehalte an Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern und Stärke analysiert wurden (siehe Kapitel 3.1.3).

Nach dem Einwiegen und Einfetten der insgesamt 146 Kolbenprober jedes Durchganges wurden diese waagerecht liegend in einem Trockenschrank aufbewahrt und die Kolbenprober samt enthaltener Probe auf 39 °C vortemperiert, um ein Abkühlen des Pansensaft-Puffer-Gemisches beim Befüllen der Kolbenprober zu verhindern.

#### Spendertiere und Pansensaftgewinnung

Unmittelbar vor dem Start jedes Durchganges wurde der zur Inkubation benötigte Pansensaft am Morgen nach dem Melken, vor der Bereitstellung von frischem Futter, von zwei Pansenfistulierten Milchkühen der Rasse Jersey mittels Saugrohr und Vakuumpumpe gewonnen. Hierbei wurde der Pansensaft randvoll in einen auf 39 °C vorgewärmte Thermobehälter gefüllt und dort bis zur weiteren Verwendung im Labor gelagert. Eine Entnahme vor der Morgenfütterung der Spendertiere, wie in der Methode 25.1 (VDLUFA 1976) vorgegeben, war nicht möglich, da die Tiere kontinuierlich Zugang zu einer Total-Mischration hatten und zusätzlich Heu zur ad libitum-Aufnahme vorliegen hatten. Die Durchführung der insgesamt 8 Durchgänge erstreckte sich aufgrund der versuchstechnischen Auslastung der Spendertiere und der Laborkapazitäten über einen Zeitraum von circa vier Monaten. Dadurch war es unvermeidbar, dass während des Versuches ein Wechsel des Laktationsstadiums der Spendertiere und dadurch ein Wechsel in der Zusammensetzung der gefütterten Total-Mischrationen stattfand. Während der ersten 3 Durchgänge wurde Pansensaft von zwei Tieren gewonnen, die sich in der Spätlaktation befanden. Während der Durchgänge 4 bis 6 wurde jeweils Pansensaft von einem trockenstehenden Tier und einem Tier in der Spätlaktation zur Inkubation verwendet. Während der letzten beiden Durchgänge stammte der verwendete Pansensaft von zwei trockenstehenden Tieren. Die Total-Mischration der Tiere in der Spätlaktation bestand aus MS, GS, Heu, Kraftfutter, Rapsextraktionsschrot und zugesetzten Vitaminen und Mineralstoffen. Die Ration enthielt in der TM 15 % XP, 20 % XF und 6,5 MJ/kg Nettoenergie-Laktation (NEL). Die Total-Mischration für trockenstehende Tiere enthielt MS, GS, Heu, Gerstenstroh, HS, Vitamine, Mineralstoffe, Mono-Natrium-Phosphat und Magnesiumoxid und hatte einen XP-Gehalt von 9 % TM, einen XF-Gehalt von 30 % TM und einen NEL-Gehalt von 5,3 MJ/kg TM.

Bevor der Pansensaft mit den vorbereiteten Reagenzien gemischt werden konnte, wurde er im Labor durch ein Leinentuch gegeben und dabei von Schwebstoffen und kleinen Futterpartikeln befreit. Im Anschluss wurde eine Mischprobe aus beiden Spendertieren hergestellt.

#### **Reagenzien**

Das Pansensaft-Puffer-Gemisch, welches jeweils am Starttag in die Kolbenprober gefüllt wurde, konnte bis auf die Reduktionslösung und den Pansensaft vor dem Start jedes Durchganges bereits im Voraus vorbereitet werden. Dabei wurden die folgenden Bestandteile in der Reihenfolge ihrer Nennung zusammengegeben und homogenisiert: 1860 ml destilliertes Wasser, 0,48 ml Spurenelementlösung, 930 ml Pufferlösung, 930 ml Mengenelementlösung und 4,8 ml Resazurinlösung (ausreichend für 171 Kolbenprober). Die Zusammensetzungen der genannten Lösungen entsprachen den Angaben der amtlichen Methode 25.1 (VDLUFA 1976), lediglich die verwendete Pufferlösung enthielt 33 g Natriumhydrogencarbonat und 6 g Ammoniumhydrogencarbonat pro 1 L destilliertem Wasser anstelle 35 g von Natriumhydrogencarbonat und 4 g Ammoniumhydrogencarbonat pro 1 L destilliertem Wasser. Eine Änderung der Zusammensetzung war aufgrund der im Anschluss an die Inkubation erfolgende NH<sub>3</sub>-Bestimmung notwendig. Die für die Inkubation vorbereitete Mediumlösung wurde wie die Kolbenprober jeweils vor Beginn der Inkubation auf 39 °C vortemperiert und am Starttag der Inkubation mit Hilfe eines Wasserbades mit Einhängethermostat aufrechterhalten. Zusätzlich wurde die Mediumlösung mit einem Magnetrührer homogen gehalten. Die in der Mediumlösung noch fehlende Reduktionslösung wurde unmittelbar vor dem Start der Inkubation jeweils frisch aus 186 ml destilliertem Wasser, 7,8 ml Natronlauge und 1200 mg Natriumsulfat (Na<sub>2</sub>S·7 H<sub>2</sub>O) angesetzt und anschließend der vorbereiteten Mediumlösung unter Rühren und Begasung mit CO2 zugegeben. Durch Zugabe der Reduktionslösung zu der Mediumlösung schlug die zunächst leicht bläuliche Lösung über einen rötlichen Farbton ins Farblose um (Methode 25.1, VDLUFA 1976). Im Anschluss an den Farbumschlag des Indikators ins Farblose wurden 1950 ml des gefilterten und gemischten Pansensaftes unter weiterer CO<sub>2</sub>-Begasung zugegeben. Nach 15 Minuten konnte dann mit dem Befüllen der Kolbenprober mit dem Pansensaft-Puffer-Gemisch begonnen werden.

#### Versuchsdurchführung

Zum Befüllen der Kolbenprober mit dem Pansensaft-Puffer-Gemisch wurden die auf 39 °C vorgewärmten Kolbenprober jeweils paarweise aus dem Trockenschrank entnommen und mittels Dispenser nacheinander über den Silikonschlauch mit 30 ml des Pansensaft-Puffer-Gemisches befüllt. Anschließend wurden Luftblasen und Verklumpungen des Substrates durch leichtes Schütteln beseitigt, die Schlauchklemme geschlossen und das genaue Volumen zum

Zeitpunkt 0 Stunden anhand des Kolbenstandes abgelesen und notiert. Unmittelbar danach wurden die Kolbenprober waagerecht in einen Rotor eingesteckt (1 Rotorumdrehung pro Minute), der sich in einem der drei verwendeten Brutschränke befand. Die Brutschränke waren ebenfalls auf 39 °C vortemperiert. Das Pansensaft-Puffer-Gemisch wurde während des Abfüllens die gesamte Zeit im Wasserbad bei 39 °C gelagert, mit CO<sub>2</sub> begast und mittels Magnetrührer homogenisiert.

In jedem der 8 Durchgänge wurden 10 Kolbenprober pro Silagecharge und Blindwert, ebenso wie 3 Kolbenprober mit Heu-Standard und 3 Kolbenprober mit Kraftfutter-Standard inkubiert. Die Blindwerte, die lediglich 30 ml Mediumlösung enthielten, wurden inkubiert, um aufzuzeigen welches Gasvolumen ausschließlich auf Bestandteile des Pansensaftes zurückzuführen ist. Der Heu- und Kraftfutter-Standard wurden lediglich über 24 Stunden inkubiert, da ihre Gasbildung bis 24 Stunden bekannt ist. Diese Standards sind bei der Schätzung der Nettoenergie-Laktation auf Grundlage der Gasbildung zu 24 Stunden und der Rohnährstoffanalyse methodisch vorgeschrieben (Methode 25.1, VDLUFA 1976), dienten hier allerdings lediglich als Referenz. Die insgesamt 146 Kolbenprober mussten zur Inkubation auf 3 Brutschränke aufgeteilt werden, da die Rotoren in den Brutschränken nicht mehr als 57 Kolbenprober fassten. Die Aufteilung der Kolbenprober in die Brutschränke erfolgte gleichmäßig und sah wie folgt aus: Schrank 1 enthielt 4 Kolbenprober pro Silagecharge und Blindwert und 1 Kolbenprober mit Heu-Standard, Schrank 2 enthielt 4 Kolbenprober pro Silagecharge und Blindwert und 1 Kolbenprober mit Kraftfutter-Standard, Schrank 3 enthielt 2 Kolbenprober pro Silagecharge und Blindwert und jeweils 2 Kolbenprober mit Heu-Standard und mit Kraftfutter-Standard.

In jedem Durchgang wurde bei 3 der insgesamt 10 Kolbenprober der Silagechargen und Blindwerte das gebildete Gasvolumen zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48 und 72 Stunden abgelesen und notiert (n = 24). Hierzu wurden die Kolbenprober einzeln aus dem Rotor entnommen. Wurde ein Wert oberhalb der 60 ml Markierung ermittelt, wurden die Kolbenprober auf ihren Startwert zurückgestellt. Dazu wurden die Kolbenprober senkrecht mit dem Silikonschlauch nach oben gehalten, die Schlauchklemme geöffnet und durch Zurückschieben des Kolbens das gebildete Gas entfernt.

Zusätzlich zur Gasbildung wurde in jedem Durchgang die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf bestimmt. Hierfür wurden die übrigen 7 der insgesamt 10 Kolbenprober der Silagechargen und Blindwerte pro Durchgang verwendet (n = 8 pro Zeitpunkt). Diese wurden nacheinander zu 7 Zeitpunkten (1, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden)

aus dem Brutschrank entnommen und sofort auf Eis gelegt, um eine weitere Fermentation zu unterbinden. Im Anschluss daran wurde das Pansensaft-Puffer-Gemisch in den Kolbenprobern auf seinen Gehalt an NH<sub>3</sub>-N analysiert (siehe Kapitel 3.1.3). Am Ende jedes Durchganges verblieben pro Silagecharge und Blindwert somit maximal die 3 Kolbenprober (insgesamt 42 Kolbenprober), die zur Bestimmung der Gasbildung im Zeitverlauf herangezogen wurden. Bereits nach 24 Stunden konnten alle bis dahin verbliebenen 56 Kolbenprober in Brutschrank 3 zusammengeführt werden.

#### 3.1.3 Analysen

#### <u>Nährstoffanalysen</u>

Die repräsentativen Proben der 13 Silagechargen wurden zur Analyse im Labor auf einen Siebdurchgang von 0,5 mm vermahlen und anschließend auf Grundlage der offiziellen Methoden des VDLUFA-Methodenbuches (VDLUFA 1976) auf die Weender Rohnährstoffe analysiert: TM (Methode 3.1), Rohasche (XA, Methode 8.1), XP (Methode 4.1.1), XL (Methode 5.1.1 b) und XF (Methode 6.1.1). Die Analyse der NDF erfolgte nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und mit Veraschung der organischen Masse des Rückstandes zur Bestimmung des Glühverlustes (Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung, aNDF<sub>om</sub>, Methode 6.5.1, VDLUFA 1976). Die Analyse der ADF wurde nach Methode 6.5.2 (VDLUFA 1976) durchgeführt und enthielt säureunlösliche mineralische Bestandteile. Die ADL wurde nach Methode 6.5.3 (VDLUFA 1976) analysiert. Die Stärkegehalte der MS wurden mit dem polarimetrischen Verfahren nach Methode 7.2.1 (VDLUFA 1976) bestimmt.

#### Bestimmung des Ammoniak-Stickstoffes im Pansensaft-Puffer-Gemisch

Die Analyse des NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch erfolgte mittels Wasserdampfdestillation (Vapodest; C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland) und anschließender Titration (Titrator TR 154; Schott AG, Mainz, Deutschland) nach den Angaben von Wischer et al. (2013a). Hierfür wurde zunächst das im Kolbenprober enthaltene Pansensaft-Puffer-Gemisch in ein Aufschlussglas überführt, welches sich austariert auf einer Analysenwaage befand, und die Masse der so erhaltenen Probe notiert. Unmittelbar vor der Wasserdampfdestillation wurden 15 mL eines 0,25 M Phosphatpuffers (90 g  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O/L$ , mit Natronlauge eingestellt auf einen pH-Wert von 11,0) zu der jeweiligen Probe hinzugegeben, um den pH-Wert der Probe auf einen Wert zwischen 10,0 und 10,5 einzustellen. Anschließend wurde das in der Probe enthaltene NH<sub>3</sub> durch die Destillation in die Vorlage einer 3% igen Borsäure übergetrieben und mit einer 0,05 N Salzsäure (Titer = 0,05 M) titriert.

#### 3.1.4 Berechnungen, regressionsanalytische Anpassung und grafische Aufbereitung Gasbildungskinetik

Zunächst wurde für jeden Kolbenprober die Gasbildung je Zeiteinheit kumulativ berechnet. Dann wurde für jeden Ablesezeitpunkt ein Mittelwert der kumulativen Gasbildung der Blindwerte (pro Durchgang aus maximal 3 Blindwerten) berechnet, um anschließend jeden Kolbenprober der Substrat enthielt um die mittlere Gasbildung der Blindwerte (Gb<sub>0,t</sub>) desselben Durchganges zum jeweiligen Zeitpunkt zu korrigieren. So wurde gewährleistet, dass lediglich die Gasbildung, die aus dem jeweiligen Substrat stammte berücksichtig wird. Da sich die Silagechargen deutlich in ihren Gehalten an OM unterschieden (siehe Kapitel 3.1.1) und weil die Gasbildung primär aus dem Abbau der OM stammt, wurden die um die Blindwerte korrigierten Gasbildungsvolumina zum Schluss auf eine Einwaage von genau 200 mg OM umgerechnet.

Gleichung 1

$$Gb_t\left(\frac{ml}{200 \ mg \ OM}\right) = \frac{\left[(V_t - V_{t-1} + Gb_{t-1}) - Gb_{0,t}\right] \cdot 200}{Einwaage \ in \ mg \ OM}$$

- Gb<sub>t</sub> = kumulative Gasbildung der Probe zum Zeitpunkt der Ablesung nach t Stunden (in ml/200 mg OM)
- OM = organische Masse
- V<sub>t</sub> = Volumen zum Zeitpunkt der Ablesung nach t Stunden (in ml)
- $V_{t-1}$  = Volumen zum Zeitpunkt der Ablesung nach t-1 Stunden (in ml)
- $Gb_{t-1}$  = unkorrigierte Gasbildung der Probe zum Zeitpunkt der Ablesung nach t-1 Stunden (in ml)
- Gb<sub>0,t</sub> = mittlere Gasbildung der Blindwerte zum Zeitpunkt der Ablesung nach t Stunden (in ml)

Im Anschluss an die Berechnungen der kumulativen Gasbildung zu den unterschiedlichen Ablesezeitpunkten wurde die folgende exponentielle Funktion (Seifried et al. 2016) an die Daten jedes einzelnen Kolbenprobers mit der Software GraphPad Prism (Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) angepasst:

Gleichung 2

$$Gb = b_{Gas}(1 - e^{-c_{Gas} \cdot t})$$

Gb = Gasbildung nach t Stunden (in ml/200 mg organische Masse)

- b<sub>Gas</sub> = potenzielle Gasbildung (in ml)
- $c_{Gas}$  = Gasbildungsrate (in %/h)

t = Zeit (in h)

#### Ammoniak-Stickstoff im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf

Zur Berechnung der Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch in mmol/L wurde zunächst die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in mg/L berechnet. Da das Volumen der Proben sehr stark schwankte und eine genaue Ermittlung des Volumens nicht möglich war, wurde zur Berechnung anstelle des Volumens der Probe in mL die Masse der Probe in g verwendet. Anschließend wurde die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in mg/L durch Division durch die molare Masse von N (14,007 g/mol) in mmol/L umgerechnet. Die Berechnung der Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch erfolgte anhand folgender Gleichung:

Gleichung 3

$$\frac{mg NH_3 - N}{L} = \frac{\left[14\ 007\frac{mg}{mol} \cdot 0,05\frac{mol}{L} \cdot (HCl_{Probe} - HCl_{BW})\right]}{Volumen\ Probe}$$

NH <sub>3</sub> -N	= Ammoniak-Stickstoff
14 007 mg/mol	= molare Masse von Stickstoff
0,05 mol/L	= Titer der zur Titration verwendeten Salzsäure
HCl <sub>Probe</sub>	= Verbrauch an Salzsäure zur Titration bei der Analyse der Probe
	(in ml)

 HCl<sub>BW</sub> = mittlerer Verbrauch an Salzsäure zur Titration bei der Analyse der Blindwerte (in ml)
Volumen Probe = vor der Analyse ermitteltes Volumen der Probe (in ml), hier wurde statt des Volumens die Einwaage der Probe verwendet (in g)

Die grafische Aufbereitung der Daten zum NH<sub>3</sub>-N im Zeitverlauf erfolgte ebenfalls mit der Software GraphPad Prism (Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

#### 3.1.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) mit einem Signifikanzniveau von P < 0.05. Für die Gasbildungskinetik wurden die beiden Behandlungseffekte Silageart und Charge berücksichtigt und für den NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf die Behandlungseffekte Silageart, Charge und Zeitpunkt und deren Wechselwirkung.

Aufgrund technischer Ausfälle mussten die Daten von 74 (4 bis 8 Kolbenprober pro Silagecharge) der insgesamt 312 Kolbenprobern für die Gasbildungskinetik und 101 (6 bis 9 Kolbenprober pro Silagecharge bzw. Blindwert) der insgesamt 784 Kolbenprobern für den NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch von der Auswertung ausgeschlossen werden. Als technische Ausfälle wurden hierbei zum einen Temperaturen in den Brutschränken gewertet, die nicht den angestrebten 39 °C entsprachen (30 °C bis 44 °C). Da die Kolbenprober der Silagechargen und des Blindwertes gleichmäßig auf die verwendeten Brutschränke aufgeteilt waren, wurden pro Silagecharge und Blindwert gleich viele Kolbenprober auf Grund zu niedriger bzw. zu hoher Temperaturen aus der Auswertung zur Gasbildungskinetik und zum NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch ausgeschlossen. Außerdem wurden diejenigen Kolbenprober als technischer Ausfälle behandelt und aus der Auswertung zur Gasbildungskinetik und zum NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch ausgeschlossen, die erkennbar undicht waren. Bezüglich des NH3-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch wurden zusätzlich Kolbenprober nicht in die Auswertung mit einbezogen, bei welchen es während der Analyse des NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch zu Problemen kam. Bezüglich der Gasbildungskinetik verblieben pro Silagecharge mindestens 16 Wiederholungen der
ursprünglichen 24 Wiederholungen, hinsichtlich des NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch verblieben pro Silagechargen bzw. Blindwert mindestens 5 Wiederholungen pro Zeitpunkt der ursprünglich 8 Wiederholungen pro Zeitpunkt.

#### 3.2 Ergebnisse

#### 3.2.1 Gasbildungskinetik

Bei der Inkubation der 13 Silagen im HFT hatte sowohl die Silageart als auch die Charge einen signifikanten Einfluss auf die potenzielle Gasbildung (bGas, in mL/200 mg OM) und auf die Gasbildungsrate (c<sub>Gas</sub>, in %/h) (Tabelle 2). Bezüglich der potenziellen Gasbildung unterschieden sich alle drei Silagearten signifikant voneinander. Für die Gasbildungsrate bestand ein signifikanter Unterschied zwischen LS und den beiden anderen Silagearten. MS und GS unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Beim Vergleich der Chargen innerhalb einer Silageart zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Gasbildung und der Gasbildungsrate. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen Gasbildungen der 13 Silagen über 72 Stunden und die jeweils angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2) sind in Abbildung 1 dargestellt. Bei den MS unterschieden sich alle Chargen bis auf MS01 und MS05 signifikant in ihrer potentiellen Gasbildung. MS04 zeigte sowohl die größte potenzielle Gasbildung (74,2 mL/200 mg OM) als auch die größte Gasbildungsrate (7,3 %/h) im Vergleich zu den anderen MS-Chargen. MS02 hatte mit 62,5 mL/200 mg OM die niedrigste potenzielle Gasbildung. Bezüglich der Gasbildungsrate zeigten MS01 und MS03 die niedrigsten Werte. Bei den GS-Chargen hatten GS01 und GS02 die größte potenzielle Gasbildung mit 64,5 mL/200 mg OM bzw. 64,9 mL/200 mg OM. Die niedrigste potenzielle Gasbildung der GS-Chargen hatte GS04 mit 56,0 mL/200 mg OM und zeigte gleichzeitig mit GS01 die größte Gasbildungsrate. GS03 hatte sowohl verglichen mit den anderen GS-Chargen als auch verglichen mit allen Silagen die niedrigste Gasbildungsrate. Die LS-Chargen unterschieden sich sowohl hinsichtlich ihrer potenziellen Gasbildung als auch hinsichtlich ihrer Gasbildungsrate signifikant voneinander. LS02 hatte für beide Funktionsparameter die höchsten Werte, gefolgt von LS03.

Silage	b <sub>Gas</sub> <sup>1)</sup>	c <sub>Gas</sub> <sup>1)</sup>		
	(mL/200 mg OM)	(%/h)		
<b>MS01</b>	72,1 <sup>b</sup> 3,82	5,5 ° 1,15		
<b>MS02</b>	62,5 <sup>d</sup> 4,45	6,0 <sup>b</sup> <i>1,29</i>		
<b>MS03</b>	69,8 ° 3,91	5,9 ° 1,24		
<b>MS04</b>	74,2 <sup>a</sup> 4,19	7,3 <sup>a</sup> 1,55		
<b>MS05</b>	72,8 <sup>b</sup> 2,69	6,0 <sup>b</sup> 1,39		
GS01	64,5 <sup>a</sup> 2,69	6,9 <sup>ab</sup> 1,66		
<b>GS02</b>	64,9 <sup>a</sup> 2,89	6,7 <sup>b</sup> 1,57		
GS03	58,0 <sup>b</sup> 4,63	3,8 <sup>d</sup> 1,01		
<b>GS04</b>	56,0 ° 3,22	7,1 <sup>a</sup> 1,66		
GS05	58,4 <sup>b</sup> 3,19	6,0 ° 1,53		
LS01	39,9 ° 2,32	5,0 ° 1,22		
LS02	59,6 <sup>a</sup> 2,96	7,7 <sup>a</sup> 1,92		
LS03	45,8 <sup>b</sup> 2,85	7,0 <sup>b</sup> 1,63		
Silageart	***	***		
Charge	***	***		

**Tabelle 2:** GeschätzteFunktionsparameterderuntersuchtenSilagen(Mittelwerte,Standardabweichungen und P-Werte,  $n \ge 16$ )

MS = Maissilage (Chargen 1 bis 5); GS = Grassilage (Chargen 1 bis 5); LS = Luzernesilage (Chargen 1 bis 3);  $b_{Gas}$  = potenzielle Gasbildung;  $c_{Gas}$  = Gasbildungsrate; OM = organische Masse; <sup>1)</sup>kalkuliert anhand Gleichung 2; <sup>a-d</sup>unterschiedliche Hochbuchstaben innerhalb einer Silageart kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Chargen (P < 0.05); \*\*\*P < 0.001



Abbildung 1: Kumulative Gasbildung der untersuchten Silagen über 72 Stunden (in mL/200 mg organische Masse) und angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2) (Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n \ge 16$ , geschätzte Funktionsparameter, siehe Tabelle 2)

# 3.2.2 Konzentration an Ammoniak-Stickstoff im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf

Die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen im Pansensaft-Puffer-Gemisch des Blindwertes und der 13 Silagen über 48 Stunden sind in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt. Sowohl die Silageart als auch die Charge und der Zeitpunkt sowie deren Wechselwirkungen hatten einen signifikanten Einfluss auf die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch (Tabelle 3). Da die Silageart einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N hatte werden die drei Silagearten und der Blindwert im Folgenden getrennt betrachtet. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wird im Folgenden auf eine Darstellung des Vergleichs der NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen der Zeitpunkte verzichtet.

**Tabelle 3:** *P*-Werte der Behandlungseffekte und deren Wechselwirkungen für die Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch ( $n \ge 5$  pro Zeitpunkt)

Effekt	P-Wert
Silageart	***
Charge	***
Zeitpunkt	***
Charge × Zeitpunkt	***
Silageart × Zeitpunkt	***

\*\*\**P* < 0,001

Bei Inkubation des Blindwertes stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch über 48 Stunden unabhängig von Substratabbau kontinuierlich an. Bei den MS-Chargen zeigte sich für alle Chargen ein ähnliches Muster im Kurvenverlauf mit einem kontinuierlichen Abfall der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration beginnend 2 Stunden nach Start der Inkubation. Die niedrigste NH<sub>3</sub>-N-Konzentration wurde dabei 12 Stunden nach Start der Inkubation ermittelt. Danach stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bei allen MS-Chargen bis zu einem Maximalwert nach 48 Stunden an. Trotz ähnlicher Kurvenverläufe unterschieden sich alle fünf MS-Chargen bis auf MS01 und MS03 signifikant voneinander. Dabei hatte MS02 die höchsten Konzentrationen und MS04 die niedrigsten Konzentrationen an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch. Auch die GS-Chargen hatten bis auf GS04 ähnliche Kurvenverläufe. Für GS01, GS02 und GS05 stagnierten die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen von 4 Stunden bis 12 Stunden nach Start der Inkubation bzw. fielen teilweise leicht ab. Danach stiegen die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen im Pansensaft-Puffer-Gemisch bei diesen drei Silagechargen ebenfalls auf einen Maximalwert zum letzten Messzeitpunkt bei 48 Stunden an. Bei GS03 stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bis 8 Stunden an, fiel dann bis 12 Stunden wieder leicht ab, bevor sie anschließend wie bei den anderen GS-Chargen bis 48 Stunden nach Start der Inkubation anstieg. GS04 zeigte im Gegensatz zu den anderen GS-Chargen vom ersten Messzeitpunkt (1 Stunde) bis zum letzten Messzeitpunkt (48 Stunden) einen kontinuierlichen Anstieg in der NH3-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch und hatte zusätzlich die höchsten NH3-N-Konzentrationen. Die niedrigsten NH3-N-Konzentrationen hatten GS02 und GS05. Insgesamt unterschieden sich alle GS-Chargen signifikant voneinander. Auch die drei LS-Chargen unterschieden sich alle signifikant voneinander in ihrer Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch. Dabei stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bei Inkubation von LS03 vom ersten bis zum letzten Messzeitpunkt kontinuierlich an. Bei den beiden anderen Chargen waren die NH3-N-Konzentrationen bis zum Messzeitpunkt nach 12 Stunden leicht schwankend, danach stiegen diese ebenfalls bis zum Erreichen eines Maximalwertes nach 48 Stunden an. Beim Vergleich der Gasbildungs-Kurven mit den Kurven zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration innerhalb einer Silageart zeigte sich für MS, dass die Rangierung der MS-Chargen anhand der Gasbildung in umgekehrter Reihenfolge zur Rangierung der Chargen anhand der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration war. Ähnliches war auch bei den GS-Chargen zu erkennen, wenn auch nicht so eindeutig wie bei den MS-Chargen.



**Abbildung 2:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch des Blindwertes und der Maissilagechargen (MS01 bis MS05) über 48 Stunden (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L, Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 5$  pro Zeitpunkt; \*\*\**P* < 0,001)





**Abbildung 3:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch der Grassilagechargen (GS01 bis GS05) und Luzernesilagechargen (LS01 bis LS03) über 48 Stunden (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L, Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 5$  pro Zeitpunkt; \**P* < 0,05; \*\*\**P* < 0,001)

#### 3.3 Diskussion

Die für diesen Teil der Arbeit verwendeten 13 Silagen zeigten große Variationen in ihrer Nährstoffzusammensetzung. Es ist allgemein bekannt, dass sich unterschiedliche Chargen einer Silageart deutlich hinsichtlich ihrer Qualität unterscheiden können. Dabei zeigen GS generell größere Variationen in ihrer Nährstoffstoffzusammensetzung und ihrem Futterwert als MS aufgrund größerer Unterschiede bezüglich des Nutzungsstadiums und des Pflanzenbestandes (DLG 1997). Im Allgemeinen ist die kumulative Gasbildung für MS höher als für GS, wobei für beide Grobfutterquellen eine große Bandbreite in den ermittelten Gasbildungsparametern bekannt ist (García-Rodriguez et al. 2005). Innerhalb der MS wurde für MS04 die größte potenzielle Gasbildung und die größte Gasbildungsrate ermittelt. Dies könnte auf den auch im Vergleich zu Literaturwerten überdurchschnittlich hohen Stärke-Gehalt und die gleichzeitig niedrigen Gehalte an XF, Detergenzien-Fasern und XP zurückzuführen sein (De Boever et al. 2005, DLG 1997, García-Rodriguez et al. 2005). Denn De Boever et al. (2005) ermittelten eine positive Korrelation zwischen dem Stärke-Gehalt und der Gasbildung, die während einer 72stündigen Inkubation von 30 verschiedenen MS-Proben gemessen wurde. Auch Getachew et al. (2004) zeigten in ihrer Untersuchung eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Nicht-Faser-Kohlenhydraten und der potenziellen Gasbildung von Wiederkäuerfutter. So war für MS04 sowohl die ermittelte potenzielle Gasbildung als auch die Gasbildungsrate auch im Vergleich zu den in anderen in vitro-Untersuchungen angegebenen Werten deutlich höher (De Boever et al. 2005, García-Rodriguez et al. 2005, Getachew et al. 2004). Die niedrigsten Stärkegehalte und die höchsten Gehalte an XP, ADF und ADL sowie die zweithöchsten Gehalte an NDF innerhalb der MS-Chargen wies MS02 auf. Dies könnte aufgrund der in der Literatur beschriebenen negativen Korrelationen zwischen dem Ausmaß der Gasbildung und den Gehalten an NDF, ADF und XP (De Boever et al. 2005, García-Rodriguez et al. 2005, Getachew et al. 2004) zu der im Vergleich zu den anderen MS-Chargen signifikant niedrigeren potenziellen Gasbildung geführt haben. Die niedrigsten Gasbildungsraten innerhalb der MS-Chargen zeigten MS01 und MS03, die sich jedoch in ihrer potenziellen Gasbildung und hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzung vor allem bezüglich des Gehaltes an NDF und Stärke deutlich unterschieden. Getachew et al. (2004) fanden keine signifikanten Korrelationen zwischen der Gasbildungsrate und dem Gehalt an XP, NDF und Nicht-Faser-Kohlenhydraten unterschiedlicher Futtermittel für Wiederkäuer. Dagegen beschrieben García-Rodriguez et al. (2005) signifikant negative Korrelationen zwischen der Gasbildungsrate und den Gehalten an XP, NDF, ADF, ADL und Cellulose für MS. Außerdem wurde für die von diesen Autoren untersuchten 67 MS-Proben auch eine signifikant positive Korrelation zwischen der Gasbildungsrate und dem Gehalt an Stärke ermittelt. Somit scheint bei MS ein hoher Stärkegehalt das Ausmaß der Gasbildung und die Gasbildungsrate positiv zu beeinflussen, wohingegen sich hohe Gehalte an Faserfraktionen und XP negativ auswirken. Der Zusammenhang ist darin zu sehen, dass mit fortschreitendem Vegetationsstadium der Maispflanze der Stärke-Gehalt durch den zunehmenden Anteil des Maiskolbens an der Gesamtpflanze deutlich ansteigt. Gleichzeitig sinken die Gehalte an XP und Faserfraktionen in der Maispflanze ab. Zwar werden im Vegetationsverlauf auch bei Mais verstärkt Gerüstsubstanzen gebildet und es kommt zu einer zunehmenden Lignifizierung selbiger, jedoch wird dies durch den ansteigenden Anteil des stärkereichen Maiskolbens überlagert (Jeroch et al. 2008).

Innerhalb der GS-Chargen zeigten GS01 und GS02 die größte potenzielle Gasbildung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei beiden Chargen die Gehalte an Faserfraktionen und ADL verglichen mit GS03 und GS05 niedriger waren. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von García-Rodriguez et al. (2005), die eine negative Korrelation zwischen dem Gehalt an ADF bzw. ADL und der Gasbildung aus der nicht-löslichen Fraktion für GS ermittelten. Obwohl GS04 noch niedrigere Gehalte an XF, NDF und ADF hatte als GS01 und GS02, wurde für diese die niedrigste potenzielle Gasbildung innerhalb der GS ermittelt. Jedoch zeigte diese gleichzeitig die größte Gasbildungsrate. Zwar hatte GS04 die höchsten XP-Gehalte und Getachew et al. (2004) beschrieben negative Korrelation zwischen der potenziellen Gasbildung und dem XP-Gehalt bei der in vitro-Inkubation unterschiedlicher Proben von zwölf verschiedenen Futtermitteln für Wiederkäuer, jedoch wurde in selbiger Untersuchung keine GS untersucht. Dagegen ermittelten García-Rodriguez et al. (2005) bei der in vitro-Inkubation von 72 GS-Proben keine signifikante Korrelation zwischen dem XP-Gehalt und der Gasbildung aus der sofort löslichen Fraktion und der Gasbildung aus der nicht-löslichen Fraktion. Dass GS04 die größte Gasbildungsrate aufwies könnte aber auf die im Vergleich zu den anderen GS-Chargen hohen XP-Gehalte zurückzuführen sein, denn García-Rodriguez et al. (2005) beschrieben eine signifikant positive Korrelation zwischen dem XP-Gehalt und der Gasbildungsrate. Zusätzlich fanden selbige Autoren signifikant negative Korrelationen zwischen der Gasbildungsrate und dem Gehalt an NDF, ADF, ADL und Cellulose. Da GS04 niedrigere Gehalte an NDF und ADF aufwies als die anderen GS-Chargen, könnte dies zusätzlich eine Erklärung für die größere Gasbildungsrate sein. GS03 fiel sowohl im Vergleich mit den anderen GS-Chargen als auch im Vergleich mit allen inkubierten Silagen durch ihre sehr niedrige Gasbildungsrate auf. Diese könnte mit den für GS03 bei der Trocknung festgestellten Erdbeimengungen zusammenhängen, die durch den hohen XA-Gehalt von GS03

bestätigt wurden. Zusätzlich fiel GS03 durch einen unangenehm sauren Geruch während des Trocknens auf, der auf eine Fehlgärung hinweisen könnte. Aufgrund des Schmutzeintrages in die Silage könnte die Pufferkapazität bei der Silagebereitung erhöht gewesen sein, so dass der pH-Wert im Silo nur langsam abgesenkt wurde und dadurch vermehrt Essigsäure durch Enterobakterien gebildet wurde, was zu Energieverlusten führt (Spiekers et al. 2009). Für die GS-Chargen ergab sich ein insgesamt nicht so eindeutiges Bild wie für die MS-Chargen, jedoch scheinen hohe Gehalte an Faserfraktionen das Gasbildungspotenzial und die Gasbildungsrate negativ zu beeinflussen, wohingegen sich ein höherer XP-Gehalt positiv auf die Gasbildungsrate auswirkt.

Innerhalb der LS wurde für LS01 die niedrigste potenzielle Gasbildung und Gasbildungsrate beobachtet, gefolgt von LS03. Gründe hierfür könnten möglicherweise die im Vergleich zu den beiden anderen LS-Chargen und zu den Angaben in der Literatur (Getachew et al. 2004) deutlich höheren Gehalte an XF und Detergenzien-Fasern sein, auch wenn Getachew et al. (2004) keine signifikant negative Korrelation zwischen der potenziellen Gasbildung und dem NDF-Gehalt ermittelten. Die Gasbildungsrate aller drei LS-Chargen war deutlich niedriger als die Gasbildungsrate von 13,4 %/h, die von Getachew et al. (2004) für LS beschrieben wurde. Zusätzlich hatten die drei LS-Chargen relativ niedrige XP-Gehalte, die für LS01 und LS02 sogar unter den in der Literatur beschriebenen Werten lagen (DLG 1997, Getachew et al. 2004).

Neben der Anpassung der Gasbildungsdaten der 13 Silagen an das exponentielle Modell wurde versucht die Daten an eine modifizierte Gompertzfunktion, wie von Beuvink und Kogut (1993) beschrieben, anzupassen. Der Vorteil der modifizierten Gompertzfunktion ist, dass mit diesem Modell Anteile an schnell und langsam fermentierbaren Substraten geschätzt werden können. Zusätzlich wird bei dem sigmoidalen Modell im Gegensatz zum exponentiellen Modell keine konstante Gasbildungsrate angenommen (Beuvink und Kogut 1993). Jedoch war für einen Großteil der Kolbenprober eine Anpassung der modifizierten Gompertzfunktion an die Daten zur kumulativen Gasbildung nicht möglich, weshalb das exponentielle Modell zur endgültigen Auswertung ausgewählt und für alle Proben angewendet wurde.

Die im Pansensaft-Puffer-Gemisch der Kolbenprober im Zeitverlauf über 48 Stunden analysierten NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen ergeben sich aus dem Abbau von Futterprotein und der Aufnahme und Freisetzung von NH<sub>3</sub>-N durch die Mikroorganismen im Pansensaft-Puffer-Gemisch. Für den Blindwert war ein kontinuierlicher Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration über 48 Stunden zu beobachten. Da den Mikroorganismen in den Blindwert-Kolbenprobern kein Substrat zum Abbau zur Verfügung stand, muss der Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration aus der Zelllyse der Mikroorganismen stammen. Zwischen unterschiedlichen Silagearten und zwischen Chargen innerhalb einer Silageart waren teilweise deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf zu erkennen. Dabei wurde für alle Silagen unabhängig von der Silageart bis 12 Stunden nach Start der Inkubation ein Abfall oder schwankende Werte in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch analysiert. Danach stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bei allen 13 Silagen bis zum Erreichen eines Maximalwertes nach 48 Stunden an. Lediglich bei GS04 und LS03 wurde vom ersten bis zum letzten Messzeitpunkt ein kontinuierlicher Anstieg in der NH3-N-Konzentration ermittelt. Ein Absinken bzw. eine Stagnation in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration könnte durch eine gesteigerte Aufnahme von NH<sub>3</sub>-N durch die Mikroorganismen im Pansensaft-Puffer-Gemisch zur Bildung von mikrobiellem Protein hervorgerufen worden sein. Sowohl GS04 als auch LS03 wiesen innerhalb ihrer Silageart den höchsten XP-Gehalt auf. Aufgrund dessen könnte es sein, dass sowohl bei GS04 als auch bei LS03 im Gegensatz zu den anderen Chargen ihrer Silageart mehr NH<sub>3</sub>-N durch den Abbau von Futterprotein freigesetzt wurde als zum Aufbau von mikrobiellem Protein durch die Mikroorganismen aufgenommen werden konnte und es deshalb bei diesen beiden Silagen nicht zu einem Abfall in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration kam. Der kontinuierliche Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration der 13 Silagen im weiteren Verlauf der Inkubation ab 12 Stunden stammt vermutlich zunehmend mehr aus der Zelllyse der Mikroorganismen als aus dem XP-Abbau des Substrates. Bei allen drei Silagearten stimmt die Rangierung der Chargen anhand der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch größtenteils mit der Rangierung überein, die anhand des XP-Gehaltes zu erwarten gewesen wäre. Die beim Vergleich der Gasbildungs-Kurven mit den Kurven zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration innerhalb einer Silageart beobachtete Rangierung der Chargen in umgekehrter Reihenfolge könnte darauf zurückzuführen sein, dass Silagen, die eine größere potenzielle Gasbildung und eine größere Gasbildungsrate zeigten, bei welchen also das Ausmaß der Fermentation größer war als bei anderen Chargen, eine niedrigere NH3-N-Konzentration im Zeitverlauf aufwiesen, weil mehr NH3-N zur Bildung von mikrobiellem Protein verwendet wurde. Dies war vor allem bei den MS-Chargen zu beobachten und ist in Übereinstimmung mit der negativen Korrelation zwischen der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Überstand der Inkubationslösung und der potenziellen Gasbildung, die von Getachew et al. (2004) bei der in vitro-Inkubation unterschiedlicher Futtermittel für Wiederkäuer beobachtet wurde. Jedoch fanden selbige Autoren eine positive Korrelation zwischen der Gasbildungsrate und der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Überstand der Inkubationslösung.

Für die *in vitro*-Untersuchungen zum Einfluss der Grobfutterquelle auf die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Zeitverlauf im Rusitec (Kapitel 4) wurden MS01 und GS01 ausgewählt. Die

Auswahl der Silagen erfolgte dabei anhand ihres Gehaltes an XP und XF und der Gasbildung. GS01 wurde ausgewählt, da diese bezüglich ihres Gehaltes an XP und XF im mittleren Bereich lag und gleichzeitig eine hohe potenzielle Gasbildung und Gasbildungsrate aufwies. MS04 zeigte für die MS die größte potenzielle Gasbildung und Gasbildungsrate. Jedoch waren die Stärke-Gehalte überdurchschnittlich hoch und die XP-Gehalte wie auch bei MS03 und MS05 niedrig. MS02 lag wie MS01 ungefähr im angestrebten Bereich des XP- und XF-Gehaltes, wies jedoch die geringste potenzielle Gasbildung innerhalb der MS auf. Deshalb wurde letztendlich MS01 ausgewählt. Da sich die Verfügbarkeit von LS im Großraum Stuttgart als schwierig erwies und die in dieser Arbeit untersuchten LS-Chargen deutlich unterhalb des angestrebten XP-Gehaltes lagen, wurde auf eine weitere Inkubation von LS verzichtet.

# 4. Effekte der Grobfutterquelle auf die Konzentration an Ammoniak-Stickstoff im Zeitverlauf im Rusitec

In dieser Untersuchung sollte der Einfluss der Grobfutterquelle ohne eine Konzentrat-Ergänzung sowohl auf die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf als auch auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden eine MS und eine GS in dem semikontinuierlichen Pansen-Simulationssystem Rusitec nach Czerkawski und Breckenridge (1977) inkubiert.

# 4.1 Material und Methoden

#### 4.1.1 Silagen

Bei den beiden in dieser Untersuchung verwendeten Silagen handelte es sich um MS01 und GS01 aus den zuvor beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen (Kapitel 3, Tabelle A1), die von der Versuchsstation Agrarwissenschaften, Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim der Universität Hohenheim in Stuttgart stammten. Die Nährstoffgehalte der beiden verwendeten Silagen wurden für diese Untersuchung erneut bestimmt und können Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 4:** Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern undStärke der verwendeten Silagen

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	93,7	90,4
Organische Masse	% TM	95,0	92,0
Rohprotein	% TM	8,1	17,1
aNDF <sub>om</sub>	% TM	39,8	41,3
ADF	% TM	25,1	26,4
ADL	% TM	2,0	1,5
Stärke	% TM	31,6	n. a.

<sup>1)</sup>Gehalt an Trockenmasse nach Trocknung bei 40 °C über mindestens 48 Stunden; TM = Trockenmasse; aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; n. a. = nicht analysiert

Die Trocknung und Vorbereitung der beiden Silagen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Kapitel 3.1.1).

#### 4.1.2 In vitro-Inkubationen im Pansen-Simulationssystem Rusitec

Die *in vitro*-Untersuchungen der MS und GS wurden unter Verwendung des semikontinuierlichen Pansen-Simulationssystems Rusitec (Czerkawski und Breckenridge 1977) durchgeführt. Die technischen Details und das allgemeine Vorgehen bei der Inkubation waren wie von Boguhn et al. (2006) beschrieben. In der Vorbereitung der Inkubationen wurden jeweils 15 g ( $\pm$  0,005 g) der getrockneten und auf 1 mm Siebdurchgang vermahlenen Silagen (Kapitel 3.1.1) in Nylonbeutel mit einer Porengröße von 100 µm (Nylonsiebgewebe der Fa. Linker Industrie-Technik GmbH, Kassel, Deutschland) eingewogen. Gleichzeitig mit dem Einwiegen der Futterbeutel wurden repräsentative Proben zur Bestimmung der Gehalte an Nährstoffen und <sup>15</sup>N in den Silagen gewonnen (Kapitel 4.1.4). Insgesamt wurden für alle Behandlungen fünf Durchgänge (n = 5) durchgeführt, die an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gestartet wurden, um die Variationen, die täglich natürlicherweise in der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens vorkommen, zu berücksichtigen. Für die Untersuchungen wurden zwei Rusitec-Systeme verwendet, die jeweils aus sechs Fermentern (Volumen 800 mL) bestanden, die sich in einem Wasserbad bei 39 °C befanden.

Das für die Inkubationen notwendige Inokulum wurde von drei Pansen-fistulierten Milchkühen der Rasse Jersey jeweils am Morgen vor der Bereitstellung von frischem Futter nach dem Melken gewonnen. Für diesen Zweck wurde sowohl die feste Phase (Schwimmschicht) als auch die flüssige Phase (Pansensaft) des Panseninhaltes der drei Spendertiere beprobt. Die Spendertiere erhielten *ad libitum* Heu und eine Total-Mischration für hochleistende Tiere, die aus MS, GS, Heu, Gerstenstroh, Kraftfutter, Rapsextraktionsschrot und zugesetzten Vitamine und Mineralstoffen bestand. Die Ration enthielt in der TM 15 % XP, 16 % XF und 6,8 MJ/kg NEL. Zur Gewinnung der festen Phase wurde zunächst ein Teil der Schwimmschicht mit der Hand aus dem Pansen entnommen, mit leichtem Druck über einem vorgewärmten Thermobehälter ausgedrückt, um den überschüssigen Pansensaft so zu entfernen und gleichzeitig für die Inkubationen aufzufangen, und anschließend randvoll in vorgewärmte Plastikbehälter gefüllt, welche bis zur weiteren Verwendung in einem Trockenschrank bei 39 °C gelagert wurden. Zum Schluss wurde der restliche Pansensaft mittels Saugrohr und Vakuumpumpe gewonnen und ebenfalls randvoll in die bereits erwähnten Thermobehälter gefüllt. Im Labor wurde aus dem Panseninhalt der drei Spendertiere eine Mischung hergestellt und der Pansensaft wurde durch ein Leinentuch gefiltert.

Zu Beginn jedes Durchganges wurden die verwendeten Fermenter mit jeweils 800 mL eines Pansensaft-Puffer-Gemisches befüllt, das ein Mischungsverhältnis von 1:1 hatte. Die Zusammensetzung der Pufferlösung war in Anlehnung an McDougall (1948). Zusätzlich enthielt der Puffer 0,0378 g/L Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl; entspricht 0,7 mmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L), welches mit dem natürlichen Isotop <sup>15</sup>N angereichert war (Campro Scientific GmbH Berlin, Deutschland; deklariert 10,39 % <sup>15</sup>N) und als externer Marker verwendet wurde. Für jede Silage wurde jeweils ein Fermenter gestartet, welcher mit zwei Nylonbeuteln bestückt wurde. Der eine Nylonbeutel enthielt die entsprechende Silage und der zweite Nylonbeutel 60 g ( $\pm$  5 g) der Mischung der festen Phase der drei Spendertiere. Nach 24 Stunden wurde der Nylonbeutel mit der festen Phase durch einen zweiten Futterbeutel ersetzt. Während jedes Durchganges diente ein zusätzlicher Fermenter als Blindwert, welcher lediglich über die ersten 48 Stunden betrieben wurde und nur zu Beginn während der ersten 24 Stunden mit einem Nylonbeutel mit fester Phase versehen war. Die Nylonbeutel befanden sich in den Fermentern in perforierten Innenbehältern, die über ein Gestänge mit einem Elektromotor verbunden waren und dadurch im Fermenter auf und ab bewegt wurden (10-12 Hübe pro Minute). Die vertikale Bewegung der Innenbehälter sollte die Pansenmotorik simulieren und dadurch für eine gleichmäßige Durchmischung des Substrates mit Pansensaft und den darin enthaltenen Mikroben sorgen. Die drei Fermenter jedes Durchganges wurden vor dem Start der Inkubationen auf die beiden Wasserbäder und die darin jeweils enthaltenen sechs Plätze randomisiert. Im weiteren Verlauf der Inkubation, die für jeden Durchgang insgesamt 13 Tage dauerte, wurde dieselbe Pufferlösung, die bereits zu Beginn der Inkubation in die Fermenter gefüllte wurde, kontinuierlich mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe (Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) und einer mittleren Flussrate von 586 mL/Tag (s = 46 mL) in die Fermenter infundiert. Die Pufferlösung diente hierbei als künstlicher Speichel. Außerdem wurde alle 24 Stunden aus jedem Fermenter jeweils der Futterbeutel entnommen und durch einen neuen Futterbeutel derselben Silage ersetzt, der bereits 48 h inkubiert war. Zur Unterscheidung der Futterbeutel wurden für jede Silage zwei verschiedenfarbige Nylonbeutel verwendet. Die Nylonbeutel wurden unmittelbar nach der Entnahme in 50 ml (Anpassungsphase, Tage 1–6) bzw. 100 ml (Versuchsphase, Tage 7-12) der auf 39 °C vortemperierten Pufferlösung gespült, dann mit mäßiger Kraft in das Spülgefäß ausgedrückt und die so gewonnene Suspension in den entsprechenden Fermenter gefüllt. Hintergrund ist, dass auf diese Weise der Flüssigkeitsverlust ausgeglichen wird, der durch die Entnahme der Futterbeutel und Proben aus der Fermenterflüssigkeit (Versuchsphase) entsteht. Zusätzlich wurden dem *in vitro*-System auf diese Weise ein Teil der Mikroben wieder zugeführt, die über die Nylonbeutel entnommen wurden. Während des täglichen Wechselns der Futterbeutel wurde der pH-Wert in den Fermentern gemessen. Der durch die kontinuierlich infundierte Pufferlösung erzeugte Überlauf an Fermenterflüssigkeit, im Folgenden Effluent genannt, wurde für jeden Fermenter einzeln in einer Glasflasche mit einem Volumen von 1 Liter gesammelt. Die Glasflaschen wurden währenddessen in einem Wasserbad bei 4 °C gelagert, um eine weitere mikrobielle Aktivität zu unterbinden. Das während der Inkubation gebildete Fermentationsgas wurde ab dem ersten Tag nach Start der Inkubation für jeden Fermenter in einem Gasbeutel mit einem Volumen von 10 L (Linde PLASTIGAS®-Beutel, Linde AG, Pullach, Deutschland) gesammelt. Der schematische Aufbau der Pansensimulation Rusitec ist in Abbildung 4 dargestellt.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Pansensimulation Rusitec (verändert nach Czerkawski und Breckenridge 1977)

#### 4.1.3 Probennahmen und Probenaufarbeitung

Die Probennahmen zur anschließenden Bestimmung des NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit erfolgten während jedes Durchganges innerhalb von zwei Perioden. In Periode 1 wurden 0, 2, 4, 12, 24 und 48 Stunden nach Start der Inkubation jeweils 40 ml Fermenterflüssigkeit gewonnen. Periode 2 begann an Tag 12 mit dem Wechsel der Futterbeutel am Morgen. Hier erfolgte die Probennahme der 40 ml Fermenterflüssigkeit 0, 2, 4, 12 und 24 Stunden (entspricht dem Ende der Inkubation an Tag 13) nach dem Wechsel des Futterbeutels an Tag 12. Die Fermenter mussten zur Probennahme jeweils vollständig geöffnet werden. Eine Teilprobe von 30 ml wurde zur späteren Bestimmung der Konzentration an NH<sub>3</sub>-N bei –20 °C eingefroren. Die übrigen 10 ml wurden zur Herstellung von 1 ml Aliquoten verwendet, die bei –80 °C bis zur späteren Extraktion der mikrobiellen DNA gelagert wurden (nicht Bestandteil dieser Arbeit, Lengowski et al. 2016). Der Flüssigkeitsverlust in den Fermentern durch die Probennahmen wurde jeweils durch Zugabe der entsprechenden Menge an Pufferlösung ausgeglichen.

Die Proben zur Bestimmung der Kenngrößen der Fermentation wurden nach einer 7-tägigen Anpassungsphase (Start der Inkubation bis Tag 6) gewonnen, da erst nach dieser Zeit das Plateau der Anreicherung der Mikroben mit <sup>15</sup>N erreicht ist (Boguhn et al. 2006). Die jeweiligen Probennahmen wurden täglich gleichzeitig mit dem Wechseln der Futterbeutel durchgeführt (Versuchsphase, Tag 7 bis Tag 13). Die vom 7. bis zum 12. Tag der Inkubation entnommenen Futterbeutel wurden nach dem Spülen in Pufferlösung über 24 Stunden bei 65 °C in einem Umlufttrockenschrank getrocknet und danach zum Abkühlen für weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert. Im Anschluss daran wurden die Futterreste ohne den Nylonbeutel zurückgewogen, für jeden Fermenter zu einer Poolprobe zusammengeführt und bis zu den weiteren Analysen bei Zimmertemperatur gelagert. Zur Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese wurden beim morgendlichen Öffnen der Fermenter jeweils 30 ml Fermenterflüssigkeit zur späteren Gewinnung der Flüssigkeit-assoziierten Mikroorganismen (liquid-associated microbes, LAM) entnommen und an den Tagen 7 bis 13 gepoolt. Die Partikel-assoziierten Mikroorganismen (solid-associated microbes, SAM) wurden jeweils an Tag 13 nach der Methode von Ranilla und Carro (2003) und wie von Boguhn et al. (2013) beschrieben von den Futterresten der beiden Futterbeutel jedes Fermenters abgetrennt. Die Gewinnung der Mikrobenpellets der LAM und SAM aus den Suspensionen erfolgte mittels Differenzialzentrifugation (Brandt und Rohr 1981) und wie bereits von Wischer et al. (2013a) beschrieben unter Verwendung einer Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (GMI, Ramsey, Minnesota, USA). Die Menge an Effluent wurde täglich beim Wechseln der Überlaufflaschen durch Wägung bestimmt. Im Anschluss daran wurde eine repräsentative Probe von 70 ml entnommen und zu einer Poolprobe zusammengeführt (Tag 7 bis Tag 13). Eine Teilprobe von 240 ml der gut durchmischten Probe an Effluent wurde bei 27 000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, GMI, Ramsey, Minnesota, USA), um Futterpartikel und Mikroben abzutrennen. Aus dem partikelfreie Überstand wurden unter Rühren die Proben zur Bestimmung des Gehaltes an NH<sub>3</sub>-N, SCFA und <sup>15</sup>N entnommen. Die Proben zur Bestimmung des Gehaltes an NH<sub>3</sub>-N und SCFA wurden bis zur Analyse bei –20°C gelagert. Die Proben zur Bestimmung des <sup>15</sup>N-Gehaltes im partikelfreien Effluenten und in den Mikrobenpellets der LAM und SAM wurden bei –20°C eingefroren, gefriergetrocknet und für die anschließende <sup>15</sup>N-Analyse fein gemörsert. Die Gasbeutel wurden täglich gegen neue Gasbeutel ausgetauscht, wodurch eine Bestimmung der Gasmenge und der Methankonzentration über 24 Stunden möglich war.

#### 4.1.4 Analysen

Die auf 0,5 mm vermahlenen Silagen und Futterreste wurden auf ihre Gehalte an TM, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern und Stärke analysiert. Die Analysen wurden wie unter Kapitel 3.1.3 bereits dargestellt durchgeführt. Sowohl die Proben des partikelfreien Überstandes als auch die Proben aus der Fermenterflüssigkeit wurden wie unter Kapitel 3.1.3 beschrieben auf ihre Gehalte an NH<sub>3</sub>-N analysiert. Die qualitative und quantitative Bestimmung der SCFA im partikelfreien Überstand erfolgte unter Verwendung eines Gaschromatographen (Hewlett-Packard 6890, Agilent, Waldbronn, Deutschland), der mit einer Kapillarsäure (HP-FFAP Kieselglas-Säule, 25 m × 0,32 mm, 0,5 µm Filmdicke, HP 7683, Agilent) und mit einem Flammen-Ionisations-Detektor ausgestattet war. Die Vorbereitung der Proben mittels Vakuumdestillation und unter Verwendung des internen Standards 2-Methyl-Valeriansäure erfolgte nach Zijlstra et al. (1977) und mit Änderungen wie von Wischer et al. (2013a) beschrieben. Die auf 0,12 mm Siebdurchgang vermahlenen bzw. gemörserten Proben der Silagen, Futterreste, der gefriergetrockneten Mikrobenpellets der LAM und SAM sowie des gefriergetrockneten partikelfreien Effluenten und das <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl wurden unter Verwendung eines Elementaranalysators (EA 1108; Carlo Erba Instruments, Biberach, Deutschland) kombiniert mit einem Isotopen-Massen-Spektrometer (MS Finnigan MAT; Thermoquest Italia S.p.A., Mailand, Italien) auf ihre Gehalte an <sup>15</sup>N und N (nur die Mikrobenpellets) analysiert. Die Methankonzentration im Fermentationsgas wurde in Anlehnung an die von Wischer et al. (2013b) beschriebene Methode täglich mit Hilfe eines Infrarot-Methan-Analysators (Pronova Analysentechnik GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) gemessen, welcher mit einem Referenzgas (13 Vol.-% Methan deklariert) kalibriert war. Die hierfür entnommene Gasmenge wurde anschließend auf die mit Hilfe eines Trommelgaszählers (Typ TG 3, Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Bochum, Deutschland) ermittelte Gasmenge addiert.

#### 4.1.5 Berechnungen und statistische Auswertung

Der Abbau der Weender Rohnährstoffe, Detergenzien-Fasern und der Stärke wurde kalkuliert aus der Differenz zwischen Input und Output des jeweiligen Nährstoffes im Verhältnis zu dessen Input (Boguhn et al. 2006). Die Gehalte an NH<sub>3</sub>-N im partikelfreien Effluenten und in der Fermenterflüssigkeit wurden nach Gleichung 3 berechnet. Das mikrobielle XP (mikrobieller Stickstoff  $\times$  6,25) der LAM wurde berechnet aus der Differenz zwischen <sup>15</sup>N-Input (über die Silage und die Pufferlösung) und dem <sup>15</sup>N-Output (über die Futterreste und den Effluenten) dividiert durch die <sup>15</sup>N-Konzentration der LAM. Das mikrobielle XP der SAM wurde wie von Hildebrand et al. (2011b) beschrieben kalkuliert. Die Summe des täglich gebildeten mikrobiellen XP der LAM und SAM wurde zur Kalkulation der EMPS (in g mikrobielles XP pro kg abgebaute OM) verwendet. Die Gehalte an OM und XP in den Futterresten wurden um den Beitrag der SAM korrigiert (Boguhn et al. 2006).

Die Daten zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf wurden unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter Berücksichtigung der beiden Behandlungseffekte Ration und Zeit und einschließlich der Blockeffekte entsprechend des verwendeten Designs im Rusitec, wie von Lengowski et al. (2016) beschrieben, analysiert. Zur Erfüllung der Modellvoraussetzungen für die statistische Auswertung, mussten die Daten zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration log-transformiert werden. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten sind die untransformierten Daten. Die Fermentationsdaten wurden mit einem gemischten Modell ausgewertet, welches die festen Effekte Silage, Durchgang und Wasserbad sowie den zufälligen Effekt Fermenter beinhaltete. Die Auswertung erfolge ebenfalls unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Innerhalb des dritten Durchganges war die erfasste Menge an Fermentationsgas für Grassilage deutlich niedriger im Vergleich zu den anderen Durchgängen, weshalb die Daten zur Gasmenge und Methankonzentration aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Das Signifikanzniveau wurde sowohl für die Auswertung der Daten zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration als auch für die Auswertung der Fermentationsdaten auf P < 0.05festgesetzt.

### 4.2 Ergebnisse

Die gebildete Gasmenge war nicht signifikant verschieden zwischen MS und GS, jedoch wurde bei Inkubation von GS mehr Methan gebildet (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** pH-Wert, Gas- und Methanproduktion, Nährstoffabbau über 48 h, kurzkettige Fettsäuren und Ammoniak-N im Effluenten sowie mikrobielle Proteinsynthese (Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 4$ )

	Maiss	silage	Grass	silage	P-Wert
рН	6,8	0,04	6,9	0,03	**
Gas (mL/d)	858	51	815	58	0,35
Methan (mL/d)	77	4	117	14	*
Abbau (%)					
Organische Masse <sup>1)</sup>	44,1	0,94	47,2	0,97	*
Rohprotein <sup>1)</sup>	67,4	1,85	66,5	1,27	0,54
aNDF <sub>om</sub>	7,9	1,83	17,7	3,71	**
ADF	6,5	2,17	22,6	1,10	**
Stärke	78,1	1,54			
SCFA (mmol/d)					
Acetat	13,6	0,87	12,6	1,03	0,29
Propionat	5,1	0,71	6,6	0,39	**
Isobutyrat	0,3	0,02	0,5	0,06	**
Butyrat	8,8	0,64	6,0	0,50	**
Isovalerat	3,1	0,32	2,5	0,55	0,23
Valerat	3,4	0,26	3,6	0,34	0,17
Summe	34,2	1,34	31,9	2,50	0,34
$C_2:C_3$	2,7	0,44	1,9	0,06	**
Ammoniak-N (mmol/d)	3,0	0,18	7,4	0,81	**
Mikrobielles XP (mg/d)	849	19	1379	43	***
EMPS	144	3	234	5	***
N-Effizienz (%)	72,4	1,54	58,6	1,81	***
SAM:LAM	0,19	0,01	0,19	0,02	0,68

<sup>1)</sup>korrigiert um den Rohproteinbeitrag der Partikel-assoziierten Mikroorganismen; aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; SCFA = kurzkettige Fettsäuren; C<sub>2</sub>:C<sub>3</sub> = Verhältnis von Acetat zu Propionat; Mikrobielles XP = Summe aus Partikel-assoziierten und Flüssigkeit-assoziierten Mikroorganismen; EMPS = Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (in g mikrobielles Rohprotein/kg abgebaute organische Masse); N-Effizienz = Anteil des aufgenommen N (über Futter und Puffer), der sich in mikrobiellem XP wiederfindet; SAM:LAM = Verhältnis von Partikel-assoziierten Mikroorganismen zu Flüssigkeit-assoziierten Mikroorganismen; \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01

Des Weiteren waren der Abbau der OM und der Detergenzien-Fasern sowie die gebildete Menge an Propionat und Isobutyrat bei GS signifikant höher als bei MS. Dagegen war die Menge an Butyrat und das Verhältnis von Acetat zu Propionat signifikant höher bei MS. Die gebildete Menge an Acetat, Isovalerat, Valerat und die Summe der SCFA war nicht signifikant beeinflusst durch die inkubierte Silageart. Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied im Abbau des XP zwischen der MS und der GS. Jedoch wurde bei Inkubation von GS signifikant mehr NH<sub>3</sub>-N pro Tag gebildet (7,4 mmol/d vs. 3,0 mmol/d) im Vergleich zur MS. Auch die gebildete Menge an mikrobiellem XP pro Tag und die EMPS waren signifikant höher bei GS. Die N-Effizienz, die den prozentualen Anteil des aufgenommenen N (über Futter und Pufferlösung) darstellt, der sich in mikrobiellem XP wiederfindet, war jedoch mit 72,4 % bei MS signifikant größer als bei GS mit 58,6 %. Allerdings war das Verhältnis der SAM zu den LAM ähnlich bei beiden Silagen.

Die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit stieg bei allen drei Behandlungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Start der Inkubation an und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Behandlungen (Abbildung 5). Bei Inkubation von GS stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration danach weiter an bis zu einem Maximalwert zum letzten Messzeitpunkt in Periode 1 bei 48 Stunden. Dadurch war die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration für GS nach 48 Stunden signifikant höher als bei der MS und dem Blindwert, die sich nach wie vor nicht signifikant in ihrer Konzentration an NH<sub>3</sub>-N unterschieden. Die zum Zeitpunkt 0 Stunden in Periode 2 für beide Silagen in der Fermenterflüssigkeit ermittelte NH<sub>3</sub>-N-Konzentration war signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 48 Stunden in Periode 1. Jedoch blieben die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit bei Inkubation von MS und GS in Periode 2 auf einem relativ gleichbleibenden Niveau. Außerdem unterschieden sich die beiden Silagen an allen fünf Messzeitpunkten signifikant hinsichtlich der Konzentration an NH<sub>3</sub>-N entsprach im Niveau der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration, die im Effluenten der beiden Silagen ermittelt wurde.



**Abbildung 5:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit für Maissilage, Grassilage und Blindwert (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L; Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 4$  pro Zeitpunkt; \**P* < 0,05; \*\*\**P* < 0,001)

# 4.3 Diskussion

Bei der *in vitro*-Inkubation der beiden Silagen im Rusitec war der Abbau der OM und der Detergenzien-Fasern signifikant höher bei Inkubation von GS als bei Inkubation von MS. Gleiches wurde bereits zuvor von Boguhn et al. (2013) und Hildebrand et al. (2011c) für MS und GS beschrieben. Auch Hildebrand et al. (2011a) ermittelten bei steigenden Anteilen von GS in einer Ration mit MS einen Anstieg im Abbau der OM und der Detergenzien-Fasern. Der in der eigenen Untersuchung beobachtete niedrigere Abbau der Detergenzien-Fasern für MS könnte mit dem höheren Lignifizierungsgrad der MS zusammenhängen. Zusätzlich könnte die Maisstärke einen negativen Einfluss auf die cellulolytische Aktivität der Mikroorganismen und damit auf den Abbau der Detergenzien-Fasern bei Inkubation von MS gehabt haben (Hildebrand et al. 2011a). Aufgrund des höheren Abbaus der Detergenzien-Fasern für GS in der eigenen Untersuchung wäre eine größere Menge an täglich gebildetem Acetat für GS zu erwarten gewesen. Jedoch unterschieden sich die beiden hier untersuchten Silagen nicht in der täglich gebildeten Menge an Acetat. Gleiches wurde bereits zuvor von Boguhn et al. (2013) und Hildebrand et al. (2011c) bei Inkubation von MS und GS und von Hildebrand et al. (2011a) bei Inkubation von Rationen mit unterschiedlichen Anteilen von MS und GS beschrieben. Die täglich gebildete Menge an Propionat war bei Inkubation von GS höher als bei Inkubation von MS, was zu einem höheren Verhältnis von Acetat zu Propionat für MS führte. Dagegen war bei Hildebrand et al. (2011a) und Hildebrand et al. (2011c) die täglich gebildete Menge an Propionat für Rationen mit höherem MS-Anteil bzw. für MS höher, was in diesen Untersuchungen zu einem höheren Verhältnis von Acetat zu Propionat für Rationen mit höherem GS-Anteil bzw. für GS führte. Ähnlich niedrige Verhältnisse von Acetat zu Propionat wurden jedoch bereits zuvor beschrieben (Boguhn et al. 2010, Boguhn et al. 2013) und scheinen charakteristisch für dieses in vitro-System zu sein. Da bei Inkubation von MS mehr Butyrat pro Tag gebildet wurde als bei Inkubation von GS, unterschieden sich die beiden Silagen vermutlich nicht signifikant in der Summe der täglich gebildeten SCFA. Dies stimmt zusätzlich mit den Ergebnissen von Lengowski et al. (2016) überein, die keinen Unterschied in der Zahl der Gesamtbakterien bei Inkubation der beiden hier untersuchten Silagen ermittelten. Des Weiteren wurde von Lengowski et al. (2016) kein Einfluss der Grobfutterquelle auf die Zahl an Methanogenen ermittelt. Dies könnte eine Begründung für die ähnlichen Gasmengen sein, die bei Inkubation der beiden Silagen pro Tag gebildet wurden. Jedoch war die täglich gebildete Methanmenge bei Inkubation der GS höher, was aufgrund des höheren Abbaus der Detergenzien-Fasern für GS zu erwarten war. Dass bei beiden Silagen ähnliche Mengen an Acetat gebildet wurden, sich die täglich gebildete Methanmenge jedoch unterschied, könnte darin begründet liegen, dass das Acetat bei Inkubation von GS möglicherweise verstärkt über den Pyruvat-Formiatlyase-Weg gebildet wurde, bei welchem Formiat zu Methan abgebaut wird. Wohingegen bei Inkubation von MS das Acetat möglicherweise vorwiegend über den Pyruvat-Ferridoxin-Oxireduktase-Weg gebildet wurde, bei welchem kein Methan entsteht. Auch Lengowski et al. (2016) vermuteten, dass die Unterschiede in der gebildeten Methanmenge mit tieferliegenden Änderungen in der Zusammensetzung der methanogenen Ordnung zu Gunsten von methanogenen Ordnungen mit einer höheren methanogenen Aktivität bei GS zusammenhängen könnten. Allerdings konnten die Autoren diese Hypothese nicht weiter prüfen, da der Nachweis der Methanogene bei dieser Untersuchung lediglich auf dem Niveau der Gruppe erfolgte.

Der Abbau des XP war für MS und GS ähnlich. Dies könnte möglicherweise mit einer ähnlichen Löslichkeit des N beider Silagen zusammenhängen (Givens and Rulquin 2004). Auch Hildebrand et al. (2011a) ermittelten keinen Unterschied im Abbau des XP bei steigenden Anteilen von GS in einer Ration mit MS. Dagegen war der XP-Abbau bei alleiniger Inkubation einer MS und einer GS bei Boguhn et al. (2013) für GS höher, wohingegen Hildebrand et al. (2011c) einen höheren XP-Abbau für MS beschrieben. Trotz ähnlichem XP-Abbau war die Menge an abgebautem XP bei Inkubation von GS höher als bei Inkubation von MS. Dies ist im höheren XP-Gehalt der hier untersuchten GS begründet und führte zu höheren NH<sub>3</sub>-N-Mengen im Effluenten für GS. Möglicherweise war der Abbau der Faserfraktionen bei Inkubation von MS zusätzlich geringer als bei Inkubation von GS, weil den Cellulolyten weniger NH<sub>3</sub>-N zur Verfügung stand. Denn laut Russell et al. (1992) verwenden Cellulolyten NH3 als N-Quelle zur MPS. Jedoch wiesen Bach et al. (2005) darauf hin, dass ein Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit in vitro mit einem Rückgang in der Effizienz der N-Nutzung verbunden ist. Weiterhin beschrieben Givens und Rulquin (2004) in ihrer Arbeit, dass bei Silage-basierten Rationen die Effizienz der N-Nutzung bei hohen N-Aufnahmen sehr niedrig sein kann. Auch in der eigenen Untersuchung wurde für GS eine niedrigere N-Effizienz (Anteil des aufgenommen N über Futter und Puffer, der sich in mikrobiellem XP wiederfindet) ermittelt als für MS. Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubation von GS eine höhere EMPS als bei Inkubation von MS ermittelt. Ähnliches bezüglich der EMPS wurde bereits in anderen in vitro-Untersuchungen (Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c) beschrieben. Dagegen geben Givens und Rulquin (2004) in ihrer Arbeit an, dass MS-basierte Rationen eine höhere EMPS fördern als GS und dies wahrscheinlich hauptsächlich auf die großen Mengen an schnell fermentierbaren Kohlenhydraten in Form von Stärke zurückzuführen ist. Die in dieser und anderen in vitro-Untersuchungen (Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c) ermittelte höhere EMPS für GS im Vergleich zur MS könnte auf das Fehlen des ruminohepatischen Kreislaufs in vitro zurückzuführen sein. Da dies in weiterer Folge bei Inkubation von MS zu einem N-Mangel führen könnte und dadurch die Fermentation der MS im Vergleich zur GS beeinträchtigen würde (Hildebrand et al. 2011c). Diese Hypothese wurde von Hildebrand et al. (2011c) durch Supplementierung einer MS mit HS bereits geprüft und im Ansatz bestätigt, jedoch scheinen auch andere Faktoren als der verfügbare N die mikrobielle Proteinsynthese im Rusitec zu beeinflussen. Zusätzlich zur EMPS war in der eigenen

Untersuchung die täglich gebildete Menge an mikrobiellem XP bei GS-Inkubation höher als bei MS-Inkubation, wobei das Verhältnis von SAM zu LAM unverändert war.

Die in Periode 1 in der Fermenterflüssigkeit ermittelte NH<sub>3</sub>-N-Konzentration stieg sowohl für die beiden Silagen als auch für den Blindwert während der ersten 24 Stunden deutlich an. Der Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration für alle drei Behandlungen könnte auf eine erhöhte Lyse der Gesamtbakterien und Methanogene in der Fermenterflüssigkeit sowie der Protozoen aus Fermenterflüssigkeit und Futterrest zurückzuführen sein, da sich deren Zahl zeitgleich erheblich reduzierte (Lengowski et al. 2016). Zusätzlich wurden für beide Silagen und den Blindwert in der Fermenterflüssigkeit während der ersten 24 Stunden nach Start der Inkubation ähnliche NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen ermittelt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lengowski et al. (2016), die keinen Unterschied in der Zahl der Gesamtbakterien, Methanogene und Protozoen in der Fermenterflüssigkeit oder dem Futterrest zwischen den Grobfutterquellen ermitteln konnten. Da die inkubierte GS deutlich höhere XP-Gehalte als die MS aufwies, könnte der weitere Anstieg in der NH3-N-Konzentration für GS bis 48 Stunden nach Start der Inkubation im Vergleich zu MS und dem Blindwert aus dem Abbau des XP der GS stammen. Die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit in Periode 2 war für beide Silagen deutlich niedriger als am Ende von Periode 1. Zusätzlich blieben die NH3-N-Konzentrationen bei beiden Silagen auf einem relativ gleichbleibenden Niveau, das sich im Mittel auch nicht von der im Effluenten ermittelten Konzentration unterschied. Dies stützt die Ergebnisse von Lengowski et al. (2016), die darauf hinweisen, dass auf Ebene der Domäne 48 Stunden nach Start der Inkubation eine stabile Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter den beschriebenen Bedingungen der Inkubation erreicht zu sein scheint. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit bei Inkubation von MS und GS nach einer Anpassungsphase, die länger als 48 Stunden andauern sollte, auf einem gleichbleibenden Niveau zu sein scheint, welches im Mittel der NH3-N-Konzentration im Effluenten entspricht.

# 5. Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Stickstoff-Ergänzungen auf die ruminale Fermentation und die mikrobielle Proteinsynthese bei der *in vitro*-Inkubation von Maissilage

In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher N-Ergänzungen zu MS im Vergleich zu GS auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* untersucht werden (Kapitel 5.1.5). Zusätzlich sollten die für diese Untersuchung verwendeten Silagen sowohl im Labor auf ihre Gehalte an Gärsäuren, Alkohole und Ammoniak (NH<sub>3</sub>) analysiert werden (Kapitel 5.1.1) als auch über Verdaulichkeitsbestimmungen (Kapitel 5.1.2), *in situ*-Inkubationen (Kapitel 5.1.3) sowie *in vitro*-Inkubationen im HFT (Kapitel 5.1.4) detailliert charakterisiert werden.

# 5.1 Material und Methoden

Für diesen Teil der Arbeit wurden eine MS und eine GS von der Versuchsstation Agrarwissenschaften, Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim der Universität Hohenheim in Stuttgart bezogen. Die frisch aus dem Fahrsilo (MS) bzw. Siloballen (GS) entnommenen Silagen wurden zunächst einzeln in einem Futtermischwagen durchmischt und im Falle der GS dabei gleichzeitig zerkleinert, um eine homogene Aufteilung der Silagen für die unterschiedlichen Analysen und Untersuchungen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die für die Verdaulichkeitsbestimmungen nötigen Einzelportionen (siehe Kapitel 5.1.2) in Plastikbeutel eingewogen. Gleichzeitig wurden repräsentative Proben der beiden Silagen für die Analysen auf Gärsäuren, Alkohole und NH<sub>3</sub> entnommen und sofort an das zuständige Labor weitergegeben. Ein Teil der Silagen wurde für die *in situ-* und *in vitro-*Inkubationen (HFT und Rusitec) wie bereits beschrieben (Kapitel 3.1.1) getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in dicht verschlossenen Tonnen gelagert.

#### 5.1.1 Analysen auf flüchtige Bestandteile

Die Analysen der Silagen auf flüchtige Bestandteile wie Gärsäuren, einwertige Alkohole und NH<sub>3</sub> erfolgte in der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie der Universität Hohenheim. Zusätzlich wurde deren TM-Gehalt und der pH-Wert bestimmt. Die Bestimmung des Wasser-

Gehaltes erfolgte nach Methode VO (EG) Nr. 152/2009 III A und die Bestimmung des Gehaltes an NH<sub>3</sub> nach der Methode VO (EG) Nr. 152/2009 III E I. Der Gehalt an D-/L-Milchsäure wurde unter Verwendung eines enzymatischen Bestimmungsverfahrens (Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Die Bestimmung der übrigen Gärsäuren und der einwertigen Alkohole erfolgte mittels Kapillar-Gaschromatographie in Anlehnung an von Lengerken und Zimmermann (1991). Hierfür wurden die Gärsäuren mit Wasser aus der jeweiligen Silage extrahiert und zum mit Ameisensäure angesäuerten Extrakt wurde 2-Methylvaleriansäure als interner Standard zugegeben. Der pH-Wert der beiden Silagen wurde im wässrigen Extrakt (30 g Silage auf 450 ml Wasser) mittels eines pH-Meters ermittelt. Die Ergebnisse können Tabelle 6 entnommen werden.

**Tabelle 6:** pH-Werte, Gehalte an Trockenmasse, Gärsäuren, Alkoholen und Ammoniak der verwendeten Maissilage und Grassilage

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	40,9	41,6
pH-Wert		3,92	4,07
Essigsäure	% TM	2,43	3,53
Propionsäure	% TM	0,03	0,03
iso-Buttersäure	% TM	n. n.	0,13
n-Buttersäure	% TM	n. n.	n. n.
iso-Valeriansäure	% TM	0,04	0,01
n-Valeriansäure	% TM	0,05	0,02
n-Capronsäure	% TM	0,07	0,06
D-/L-Milchsäure	% TM	3,42	6,41
Methanol	mg/kg FM	n. n.	0,51
Ethanol	mg/kg FM	1,53	1,82
1-Propanol	mg/kg FM	n. n.	n. n.
2-Propanol	mg/kg FM	n. n.	n. n.
1-Butanol	mg/kg FM	n. n.	n. n.
Ammoniak	% TM	0,11	0,26

<sup>1)</sup>korrigiert um flüchtige Bestandteile nach Weißbach und Kuhla (1995); TM = Trockenmasse; FM = Frischmasse; n. n. = nicht nachweisbar, < 0.01 % TM bzw. mg/kg FM

Der im Labor ermittelte TM-Gehalt der beiden frischen Silagen wurde anhand der Angaben von Weißbach und Kuhla (1995) um die analysierten Gehalte an flüchtigen Bestandteilen korrigiert. Die beiden Silagen hatten einen ähnlichen pH-Wert und ähnliche TM-Gehalte. Auch bezüglich ihrer Gehalte an den meisten Gärsäuren und Alkoholen unterschieden sich die beiden Silagen nur geringfügig. Der Gehalt an Essigsäure war bei GS um 1 % TM höher als bei MS. Bezüglich der D-/L-Milchsäure hatte die GS circa doppelt so hohe Gehalte wie die MS. Dies traf auch auf den Gehalt an NH<sub>3</sub> zu. In der GS wurden zusätzlich 0,51 mg/kg FM Methanol analysiert, welches bei MS nicht nachweisbar war.

#### 5.1.2 Verdaulichkeitsbestimmungen

Zur genaueren Charakterisierung der beiden Silagen wurde die Verdaulichkeit der Weender Rohnährstoffe, Detergenzien-Fasern und der Hemicellulose und Cellulose nach dem Standardverfahren des Ausschusses für Bedarfsnormen Gesellschaft für der Ernährungsphysiologie (AfBN 1991) mit fünf Hammeln pro Silage der Rasse Merinolandschaf (n = 5) bestimmt. Die Hammel wurden nahe ihres Erhaltungsbedarfes an Umsetzbarer Energie (ME) gefüttert, welcher Anhand der Angaben des Agricultural and Food Research Councils (AFRC 1993) für Rinder, Schafe und Ziegen ermittelt wurde. Das durchschnittliche Körpergewicht der Hammel betrug 93,1 kg (s = 2,3 kg) bei MS und 92,9 kg (SD = 2,3 kg) bei GS. Die Tiere wurden vor den Verdaulichkeitsbestimmungen geschoren, entwurmt und die Klauen geschnitten. Für jede Silage wurden in einem Arbeitsgang jeweils zwei Portionen pro Tier und Tag für die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen in Plastikbeutel eingewogen und bei -20 °C bis zur Verwendung im Versuch eingefroren. Gleichzeitig wurden beim Einwiegen der Portionen jeweils repräsentative Proben für die Analysen auf Weender Rohnährstoffe, Detergenzien-Fasern, Zucker und Stärke gewonnen und wie unter Kapitel 3.1.1 bereits beschrieben getrocknet. Während einer 14-tägigen Vorperiode wurden die fünf Hammel mit der jeweiligen Silage angefüttert. Innerhalb dieser Zeit wurden die Tiere als Gruppe in einem nicht eingestreuten Abteil gehalten. Die Fütterung der Hammel erfolgte jedoch in Einzelbuchten, um sicherzustellen, dass jedes Tier die ihm zugeteilte Futterportion vollständig fraß. Die Futtermenge betrug 1022 g TM pro Tag für MS und 1069 g TM pro Tag für GS und wurde jeweils auf zwei Mahlzeiten aufgeteilt, die am Morgen und am Nachmittag gefüttert wurden. Um den Bedarf der Hammel an Mengenelementen, Spurenelementen und Vitaminen zu decken, erhielten diese 15 g eines Mineralfutters (VitaMiral® Schaf Kristall Plus, Raiffeisen-Kraftfutterwerke Süd GmbH, Würzburg, Deutschland) pro Mahlzeit, die jeweils unmittelbar vor der Fütterung auf die Silagen gegeben wurden. Da der XP-Gehalt der MS mit 7.4 % TM (Tabelle 7) unter den Empfehlungen des AfBN (1991) von 12 % TM lag, erhielten die Hammel der MS-Behandlung zusätzlich mit dem Mineralfutter jeweils 7 g Futterharnstoff (SKW Stickstoffwerke Piesteritz GmbH, Lutherstadt Wittenberg, Deutschland) pro Mahlzeit. Alle Tiere hatten während der gesamten Dauer des Versuches kontinuierlich Zugang zu Wasser. Auf die Vorperiode folgte eine 7-tägige Sammelperiode, in welcher die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen untergebracht waren. Da nur eine begrenzte Anzahl an Stoffwechselkäfigen zur Verfügung stand, starteten die beiden Vorperioden versetzt um neun Tage. Die quantitative Sammlung des Kotes erfolgte während der Sammelperiode mit Kotbeuteln, die mit Hilfe eines Geschirrs an den Tieren befestigt waren und täglich zweimal während der Fütterung geleert wurden. Für jeden Hammel wurde der Frischkot während der Sammelperiode einzeln akkumuliert und in einem Kühlraum gelagert. Am Ende der Sammelperiode wurde der Frischkot jedes Tieres gewogen und homogenisiert, bevor repräsentative Teilproben zur Bestimmung der Weender Rohnährstoffe und Detergenzien-Fasern bzw. des XP-Gehaltes gezogen wurden. Die Kotproben zur Bestimmung der Gehalte an Weender Rohnährstoffen und Detergenzien-Fasern wurde bei 65 °C getrocknet. Die Bestimmung des XP-Gehaltes erfolgte im Frischkot, welcher hierfür mit einem Küchenmixer (Moulinette S, Krups GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) homogenisiert wurde und anschließend bis zur Analyse bei 4 °C gelagert wurde. Die Analyse der beiden Silagen auf ihren Zucker-Gehalt erfolgte nach der offiziellen Methode 7.1.1 (VDLUFA 1976). Die übrigen Nährstofffraktionen wurden wie unter Kapitel 3.1.3 bereits dargestellt analysiert.

Die beiden Silagen hatten ähnliche Gehalte an OM und XL. Bezüglich des XP-Gehaltes hatte die GS mit 13,7 % TM fast doppelt so hohe Werte wie die MS. Auch die Gehalte an XF, den Detergenzien-Fasern und der Cellulose waren in der GS höher. Lediglich bei der Hemicellulose war der Unterschied nur marginal. Die Gehalte an N-freien Extraktstoffen (NfE) waren hingegen bei der MS höher als bei der GS. Zucker war nur in der Grassilage bestimmbar und Stärke wurde nur in der MS analysiert.

Die Verdaulichkeit der Nährstoffe wurde auf Basis der quantitativen Daten der Futteraufnahme und der Kotausscheidung und den analysierten Nährstoffkonzentrationen wie von Boguhn et al. (2003) beschrieben berechnet. Der Gehalt an ME wurde anhand der verdaulichen Nährstoffe nach den Angaben der GfE (2001) berechnet und die NEL auf Basis der ME und der Umsetzbarkeit q nach den Angaben von van Es (1978).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter

Berücksichtigung des Behandlungseffektes Silage und des Blockeffektes Wiederholung als feste Effekte mit einem Signifikanzniveau von P < 0.05.

**Tabelle 7:** Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern, Hemicellulose, Cellulose, Zucker und Stärke der für die Verdaulichkeitsbestimmungen verwendeten Teilprobe der Maissilage und Grassilage

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	40,4	41,9
Organische Masse <sup>2)</sup>	% TM	95,9	93,0
Rohprotein <sup>2)</sup>	% TM	7,4	13,7
Rohfett <sup>2)</sup>	% TM	2,2	2,6
Rohfaser <sup>2)</sup>	% TM	19,9	25,3
N-freie Extraktstoffe <sup>2)</sup>	% TM	66,4	51,3
aNDF <sub>om</sub> <sup>2)</sup>	% TM	39,4	47,0
$ADF^{2)}$	% TM	23,8	30,0
$ADL^{2)}$	% TM	2,2	3,2
Hemicellulose <sup>2)</sup>	% TM	16,5	17,8
Cellulose <sup>2)</sup>	% TM	21,6	26,8
Zucker <sup>2)</sup>	% TM	n. n.	5,4
Stärke <sup>2)</sup>	% TM	35,0	n. a.

<sup>1)</sup>korrigiert um flüchtige Bestandteile nach Weißbach und Kuhla (1995); <sup>2)</sup>korrigiert auf Grundlage der Korrektur der Trockenmasse um flüchtige Bestandteile; TM = Trockenmasse aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; n. n. = nicht nachweisbar, < 1 %; n. a. = nicht analysiert; Hemicellulose = aNDF – ADF; Cellulose = ADF – ADL

#### 5.1.3 In situ-Inkubationen

Zur Bestimmung der Abbaucharakteristika und des Effektiven Abbaus der TM, des XP und der Kohlenhydrate der beiden getrockneten Silagen wurden diese *in situ* im Pansen von drei Pansen-fistulierten Milchkühen der Rasse Jersey inkubiert (n = 3). Die Tiere erhielten während der Inkubationen eine Total-Mischration für hochleistende Tiere zur *ad libitum*-Aufnahme, die aus MS, GS, Heu, Gerstenstroh, Kraftfutter, Rapsextraktionsschrot und zugesetzten Vitaminen und Mineralstoffen bestand. Die Ration enthielt in der TM 15 % XP, 20 % XF und 6,8 MJ/kg NEL. Zusätzlich hatten die Tiere kontinuierlich Zugang zu Wasser. Der *in situ*-Abbau wurde nach den Angaben von Madsen und Hvelplund (1994) bestimmt mit Änderungen wie von Seifried et al. (2016) beschrieben. Die Silagen wurden zur Inkubation wie zuvor

beschrieben (Kapitel 3.1.1) getrocknet und mit einer Schneidmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) auf einen Siebdurchgang von 4 mm vermahlenen. Jeweils 8 g (± 0,005 g) der Silagen wurden in Polyesterbeutel mit einer Porengröße von 50 µm (Ankom Technology, Macedon, New York, USA;  $10 \times 20$  cm Innenmaß) eingewogen. Danach wurden die Polyesterbeutel mit Kabelbindern verschlossen und für die Inkubation an einem Gewicht (900 g) befestigt. Vor der Inkubation wurden die Beutel für 1 Minute in 39 °C warmes Wasser gelegt und anschließend über die Pansenfistel in den ventralen Pansensack verbracht. Die Inkubationszeiten betrugen 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Nach der Entnahme der Beutel aus dem Pansen, wurden diese sofort in Eiswasser gelegt, um eine weitere mikrobielle Aktivität zu stoppen. Dann wurden die Beutel mit kaltem Leitungswasser ausgespült, um noch anhaftenden Panseninhalt zu entfernen, bis das ablaufende Wasser klar war. Im Anschluss wurden die Beutel in einer Waschmaschine (Typ WM14A160, Siemens GmbH, München, Deutschland) mit kaltem Wasser für 15 Minuten ohne Zentrifugation gewaschen. Zur Bestimmung eines Startwertes für alle Messungen zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden für jede Silage jeweils 8 Beutel wie für die Inkubationen im Pansen zunächst für 1 Minute in 39 °C warmes Wasser gelegt und unmittelbar danach in der Waschmaschine gewaschen, wie bereits für die anderen Zeitpunkte beschrieben. Bis einschließlich 4 Stunden wurden jeweils 8 Beutel pro Tier und Zeitpunkt inkubiert, ab 8 Stunden wurden jeweils 13 Beutel pro Tier und Zeitpunkt inkubiert, um ausreichend Probenmaterial für die anschließenden Analysen zu erhalten. Alle Beutel wurden nach dem Waschen in der Waschmaschine bei 60 °C über 24 Stunden in einem Umlufttrockenschrank getrocknet, zurückgewogen und die Beutelrückstände innerhalb eines Zeitpunktes für jedes Tier zu einer Poolprobe vereint.

Die Silagen und Beutelrückstände wurden zur Analyse des Gehaltes an TM und Detergenzien-Fasern auf 0,5 mm Siebdurchgang vermahlen und zur Analyse des Gehaltes an XP und Stärke auf 0,12 mm Siebdurchgang. Die Analysen der Proben auf ihren Stärke-Gehalt erfolgte enzymatisch und nach den Angaben von Seifried et al. (2015). Für diesen Zweck wurden circa 100 mg der vermahlenen MS und der Beutelrückstände in 100 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 5 mL Salzsäure (8 M) und 20 mL Dimethylsulfoxid gelöst. Dann wurden die Proben für 30 Minuten bei 60 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde bidestilliertes Wasser zu den Proben gegeben und unter kontinuierlichem Rühren wurde durch die Zugabe von Natronlauge der pH-Wert der Proben auf 4–5 eingestellt. Nach der Probenvorbereitung wurde die lösliche Stärke unter Verwendung eines enzymatischen D-Glukose UV-Tests (Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) zu Glukose hydrolysiert und mittels spektrophotometrischer Bestimmung (Typ Lambda 25, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) der NADPH-Bildung bei 340 nm quantifiziert. Die übrigen Analysen wurden unter Verwendung der in Kapitel 3.1.3 dargestellten Methoden durchgeführt. Die für die Untersuchung erneut analysierten Nährstoff-Gehalte der beiden Silagen können Tabelle 8 entnommen werden.

**Tabelle 8:** Gehalte an Trockenmasse, Rohprotein, Detergenzien-Fasern, Hemicellulose, Cellulose und Stärke der für die *in situ*-Inkubationen verwendeten Teilprobe der Maissilage und Grassilage

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	94,0	91,0
Rohprotein	% TM	7,1	13,4
aNDF	% TM	35,7	43,5
aNDF <sub>om</sub> <sup>2)</sup>	% TM	35,7	43,1
ADF	% TM	20,9	26,3
$ADF_{om}^{2)}$	% TM	19,9	26,2
ADL	% TM	1,6	2,6
Hemicellulose	% TM	14,8	17,2
Cellulose	% TM	19,3	23,7
Stärke	% TM	33,9	n. a.

<sup>1)</sup>Gehalt an Trockenmasse nach Trocknung bei 40 °C über mindestens 48 Stunden; TM = Trockenmasse; aNDF = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase; <sup>2)</sup>organischer Rest nach Veraschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; Hemicellulose = aNDF – ADF; Cellulose = ADF – ADL; n. a. = nicht analysiert

Der Abbau der einzelnen Nährstofffraktionen wurde anhand der Differenz zwischen dem Input und Output der jeweiligen Nährstofffraktion im Verhältnis zu deren Input berechnet. Anschließend wurden die *in situ*-Abbauparameter der Nährstoffe für jede Silage und jedes Tier durch Anpassung der Abbaudaten an die folgende exponentielle Funktion von Ørskov und McDonald (1979) und wie von Seifried et al. (2016) beschrieben kalkuliert:

Gleichung 4

$$Deg = a + b(1 - e^{-c \cdot t})$$

Deg = Abbau nach t Stunden (in %)
a = schnell abbaubare Fraktion, Auswaschverluste (in %)
b = potenziell abbaubare Fraktion (in %)
c = Abbaurate von b (in %/h)
t = Zeit (in h)

Die Modelparameter für die *in situ*-Abbaudaten wurden mit der Software GraphPad Prism (Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) geschätzt.

Der Effektive Abbau (ED) wurde für die angenommenen Passageraten (k) von 2 % (niedriges Futteraufnahmeniveau), 5 % (mittleres Futteraufnahmeniveau) und 8 % (hohes Futteraufnahmeniveau) kalkuliert (Ørskov und McDonald 1979, Seifried et al. 2016):

Gleichung 5

$$ED = a + \left[\frac{(b \cdot c)}{(c+k)}\right]$$

ED = Effektiver Abbau (in %)

- a = schnell abbaubare Fraktion, Auswaschverluste (in %)
- b = potenziell abbaubare Fraktion (in %)
- c = Abbaurate von b (in %/h)
- k = Passagerate (in %)

Für Wiederholung 3 bzw. Tier 3 wurden die Abbauwerte für 16 Stunden nicht für die Schätzung der *in situ*-Abbauparameter verwendet, da dieser Zeitpunkt als einziger Zeitpunkt deutlich von den beiden anderen Wiederholungen abwich und dies kein tierspezifischer Unterschied gewesen zu sein scheint.

Der Vergleich der *in situ*-Abbauparameter der MS und GS erfolgte unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Im statistischen Modell wurde der Behandlungseffekte Silage und der Blockeffekt Wiederholung, welcher dem Tier entsprach, als feste Effekte einbezogen. Das Signifikanzniveau lag bei P < 0.05

#### 5.1.4 In vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest

Zur Bestimmung der Gasbildungskinetik im Zeitverlauf und zur Bestimmung der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf wurden die beiden getrockneten Silagen im HFT inkubiert. Das allgemeine Vorgehen war wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.1.2) bis auf die folgenden Unterschiede. Insgesamt wurden 8 Wiederholungen durchgeführt, welche auf 4 Durchgänge aufgeteilt waren. In jeder Wiederholung wurden jeweils 11 Kolbenprober pro Silage und Blindwert, ebenso wie 4 Kolbenprober mit Heu-Standard und 4 Kolbenprober mit Kraftfutter-Standard in einem Brutschrank inkubiert. In jeder Wiederholung wurden 4 der insgesamt 11 Kolbenprober der Silagen und Blindwerte zur Bestimmung der Gasbildungskinetik verwendet (n = 32) und die restlichen 7 Kolbenprober zur Bestimmung der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch (n = 8 pro Zeitpunkt). Für jede der Wiederholungen wurde ein separates Pansensaft-Puffer-Gemisch zum Befüllen der Kolbenprober hergestellt (jeweils ausreichend für 57 Kolbenprober). Der Pansensaft stammte von zwei Pansen-fistulierten Milchkühen der Rasse Jersey, die sich in der Hochlaktation befanden. Die Total-Mischration der Spendertiere bestand aus MS, GS, Heu, Gerstenstroh, Kraftfutter, Rapsextraktionsschrot und zugesetzten Vitaminen und Mineralstoffen. Die Ration enthielt in der TM 15 % XP, 17 % XF und 6,9 MJ/kg NEL. Die Analysenergebnisse der für die in vitro-Inkubationen erneut analysierten Silagen sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Analysen wurden durchgeführt wie bereits in den Kapiteln 3.1.3 und 5.1.2 beschrieben.

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	94,6	91,4
Organische Masse	% TM	96,0	92,9
Rohprotein	% TM	7,2	13,6
Rohfett	% TM	2,3	2,3
Rohfaser	% TM	20,5	27,5
aNDF <sub>om</sub>	% TM	40,1	50,1
ADF	% TM	24,5	31,8
ADL	% TM	1,9	3,0
Zucker	% TM	n. n.	5,5
Stärke	% TM	38,8	n. a.

**Tabelle 9:** Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern, Zucker und Stärke der für die *in vitro*-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest verwendeten Teilprobe der Maissilage und Grassilage

<sup>1)</sup>Gehalt an Trockenmasse nach Trocknung bei 40 °C über mindestens 48 Stunden; TM = Trockenmasse; aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; n. n. = nicht nachweisbar, < 1 %; n. a. = nicht analysiert;

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) mit einem Signifikanzniveau von P < 0,05. Für die Gasbildungskinetik wurde der Behandlungseffekt Silage berücksichtigt und für die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch die beiden Behandlungseffekte Silage und Zeitpunkt und deren Wechselwirkung.

Die Daten von 13 (8 MS-Kolbenprober und 5 GS-Kolbenprober) der insgesamt 64 Kolbenprober für die Gasbildungskinetik und 22 (8 MS-Kolbenprober, 7 GS-Kolbenprober und 7 BW-Kolbenprober) der insgesamt 168 Kolbenprober für die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch mussten aufgrund technischer Ausfälle aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Hierbei wurden wie bereits in Kapitel 3.1.5 dargestellt diejenigen Kolbenprober als technische Ausfälle behandelt, die in Brutschränken inkubiert waren, in denen die Temperatur nicht den angestrebten 39 °C entsprach. Dies war während Wiederholung 4 der Fall als die Temperaturen im Brutschrank auf teilweise über 40 °C anstiegen. Ebenso wurden diejenigen Kolbenprober als technischer Ausfälle behandelt und aus der Auswertung zur Gasbildungskinetik und zum NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch ausgeschlossen, die erkennbar undicht waren. Für die Auswertung der Gasbildungskinetik verblieben pro Silage
mindestens 24 Wiederholungen der ursprünglichen 32 Wiederholungen, hinsichtlich des NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch verblieben pro Silage bzw. Blindwert mindestens 6 Wiederholungen pro Zeitpunkt der ursprünglich 8 Wiederholungen pro Zeitpunkt.

# 5.1.5 Effekte einer Ergänzung von Maissilage mit unterschiedlichen Stickstoff-Quellen auf die Pansenfermentation im Rusitec

Unter Verwendung der semi-kontinuierlichen Pansensimulation Rusitec wurden die bereits zuvor detailliert untersuchten Silagen im Rusitec inkubiert. Das allgemeine Vorgehen bei der Inkubation sowie bei den Probennahmen, den Probenaufarbeitungen, den Analysen und der Auswertung war wie in Kapitel 4.1 dargestellt mit den folgenden Änderungen. MS wurde entweder ohne eine N-Ergänzung inkubiert oder wurde mit HS (MS+HS; ≥ 99,5 % p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), einem Erbsenprotein (MS+Pro; > 87 % XP in der TM; Emvital®E7, Emsland Group, Emlichheim, Deutschland), einem Erbsenpepton (MS+Pep; >94 % XP in der TM; Pea Peptone A482 AI275, Organotechnie® S.A.S., La Courneuve, Frankreich) oder einer AS-Mischung (MS+AS; >85 % XP in der TM) ergänzt. Ziel war es hierbei die dem System zugeführte N-Menge an das Niveau der GS anzupassen. Das Erbsenprotein wurde aufgrund seiner hohen Abbaubarkeit im Pansen gewählt. Des Weiteren waren das Erbenprotein und das Erbsenpepton die reinsten Produkte, die verfügbar waren. Bei dem Erbsenprotein handelte es sich um ein Produkt für die Lebensmittelproduktion, das durch physikalische Verfahren aus geschälten Erbsen ohne Zusatz von Chemikalien hergestellt wurde (Emvital®E7, Emsland Group, Emlichheim, Deutschland). Das Erbsenpepton wurde durch enzymatische Hydrolyse von Erbsen hergestellt und enthält laut Hersteller eine Mischung aus Peptiden und freien Aminosäuren und wird als Quelle von organischem N und von Wachstumsfaktoren für Medien unter anderem für die industrielle Fermentation empfohlen (Pea Peptone A482 AI275, Organotechnie® S.A.S., La Courneuve, Frankreich). Die AS-Mischung wurde auf Grundlage des AS-Musters der beiden Erbsenprodukte hergestellt. Um die nötigen N-Ergänzung zu kalkulieren wurden die beiden Silagen und die N-Quellen zunächst auf ihren N-Gehalt analysiert. Anschließend wurden die nötigen Zulagen an den jeweiligen N-Quellen pro Beutel kalkuliert. Beim Einwiegen der Nylonbeutel mit N-Ergänzung wurden zunächst genau 7 g der MS mit einer Analysenwaage eingewogen, anschließend wurde die entsprechende Menge an der jeweiligen N-Quelle abgewogen und dem Beutel zugesetzt und zum Schluss wurden die übrigen 8 g ( $\pm 0,005$  g) der MS in den Beutel eingewogen. Pro Durchgang wurde für jede Behandlung 1 Fermenter gestartet. Die insgesamt 6 Fermenter pro

Durchgang wurden in einem Rusitec-System inkubiert. Insgesamt wurden 5 separate Durchgänge realisiert, die in den beiden zur Verfügung stehenden Rusitec-Systemen jeweils abwechselnd im Abstand von 8 Tagen gestartet wurden (n = 5). Das für die Inkubationen notwendige Inokulum stammte von zwei Pansen-fistulierten Milchkühen der Rasse Jersey, die Heu und eine Total-Mischration für hochleistende Tiere zur ad libitum-Aufnahme erhielten, die aus MS, GS, Heu, Gerstenstroh, Kraftfutter, Rapsextraktionsschrot und zugesetzten Vitaminen und Mineralstoffen bestand. Die Ration hatte einen XP-Gehalt von 15 % TM, einen XF-Gehalt von 17 % TM und einen Gehalt an NEL von 6,8 MJ/kg TM. Die mittlere Flussrate der Pufferlösung betrug 618 mL/Tag (s = 73 mL) und wurde mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe (Ole Dich Instrumentmarkers ApS, Hvidovre, Dänemark) kontinuierlich in die Fermenter infundiert. Die Probennahmen zur anschließenden Bestimmung des NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit erfolgten ab Tag 12 mit dem Wechsel der Futterbeutel am Morgen. Hier erfolgte die Probennahme der 40 ml Fermenterflüssigkeit 0, 2, 4, 12 und 24 Stunden (entspricht dem Ende der Inkubation an Tag 13) nach dem Wechseln des Futterbeutels an Tag 12. Die Fermenter wurden zur Probennahme lediglich zum Zeitpunkt 0 Stunden, beim Wechseln der Futterbeutel an Tag 12, und zum Zeitpunkt 24 Stunden, dem Ende der Inkubation, vollständig geöffnet. Zu den anderen Zeitpunkten erfolgte die Probennahme über eine kleine Probennahmeöffnung im Deckel der Fermenter (siehe Abbildung 4), um eine Exposition mit Sauerstoff zu minimieren. Wie in Kapitel 4.1.3 bereits beschrieben, wurde eine Teilprobe von 30 ml zur späteren Bestimmung der Konzentration an NH<sub>3</sub>-N bei -20 °C eingefroren. Die übrigen 10 ml wurden wieder zur Herstellung von 1 ml Aliquoten verwendet, die bei -80 °C bis zur späteren Extraktion der mikrobiellen DNA gelagert wurden (nicht Bestandteil dieser Arbeit, Witzig et al., eingereicht) Die Bestimmung der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration wurde durchgeführt wie in Kapitel 3.1.3 bereits beschrieben unter Verwendung eines Wasserdampfdestillationsgerätes Vapodest 50 (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland). Um zu untersuchen, ob die in der MS enthaltene Stärke während der Inkubation der Futterbeutel tatsächlich abgebaut wird oder nur aus den Nylonbeuteln verschwindet und sich im Pansensaft-Puffer-Gemisch befindet, wurden in der Versuchsphase (Tag 7 bis Tag 13) im Anschluss an das Wiegen der Effluentflaschen zusätzlich zu den 70 ml Effluent für die Bestimmung des NH<sub>3</sub>-N, der SCFA und des <sup>15</sup>N weitere 70 ml Effluent zur Bestimmung des Stärke-Gehaltes gewonnen und zu einer Poolprobe zusammengeführt (Tag 7 bis Tag 13). Die Poolproben wurden anschließend gefriergetrocknet. Das Vorgehen zur Bestimmung der Stärke-Gehalte in der MS, den Futterresten der MS-Behandlungen und den gefriergetrockneten Effluenten der MS-Behandlungen war wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 5.1.3). Lediglich bei der Analyse der Proben aus den gefriergetrockneten Effluenten musste die Mengen an Chemikalien und Reagenzien verdoppelt werden, um den vollständigen Verdau der Probe zu gewährleisten (Seifried et al 2015). Die Analysen der übrigen Nährstoffe erfolgten wie bereits zuvor beschrieben (Kapiteln 3.1.3 und 5.1.2). Zusätzlich wurden beide Silagen auf ihren Gehalt an Reineiweiß nach der Methode nach Barnstein (Methode 4.4.1–4.4.2, VDLUFA 1976) analysiert. Die analysierten Nährstoff-Gehalte der beiden Silagen können Tabelle 10 entnommen werden.

**Tabelle 10:** Gehalte an Trockenmasse, Weender Rohnährstoffen, Detergenzien-Fasern, Zucker, Stärke und Reineiweiß der für die *in vitro*-Inkubationen im Rusitec verwendeten Teilprobe der Maissilage und Grassilage

		Maissilage	Grassilage
Trockenmasse <sup>1)</sup>	%	94,1	91,3
Organische Masse	%TM	96,2	92,9
Rohprotein	%TM	6,9	13,6
Rohfett	%TM	2,1	2,5
Rohfaser	%TM	19,1	26,6
N-freie Extraktstoffe	%TM	68,1	50,2
aNDFom	%TM	38,7	47,7
ADF	%TM	22,4	30,7
ADF <sub>om</sub> <sup>2)</sup>	%TM	21,9	29,9
ADL	%TM	1,7	3,1
Zucker	% TM	n. n.	5,9
Stärke	% TM	34,2	n. a.
Reineiweiß	% TM	3,9	7,9

<sup>1)</sup>Gehalt an Trockenmasse nach Trocknung bei 40 °C über mindestens 48 Stunden; TM = Trockenmasse; aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; <sup>2)</sup>organischer Rest nach Veraschung; ADL = Säure-Detergenzien-Lignin; n. n. = nicht nachweisbar, < 1 %; n. a. = nicht analysiert

Zur späteren Quantifizierung des mikrobiellen XP wurden zusätzlich zu den inkubierten Silagen, den Futterresten, den gefriergetrockneten Mikrobenpellets der LAM und SAM sowie dem gefriergetrockneten partikelfreien Effluenten und dem <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl die verwendeten N-Quellen auf ihre Gehalte an <sup>15</sup>N analysiert.

Die Daten zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf wurden unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter Berücksichtigung der beiden Behandlungseffekte Behandlung und Zeitpunkt und deren Wechselwirkung analysiert. Um die Modellvoraussetzungen für die statistische Auswertung zu erfüllen, mussten die Daten zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration log-transformiert werden. Bei den im Ergebnisteil aufgeführten Daten handelt es sich um die untransformierten Daten. Die Auswertung der Fermentationsdaten erfolgte mit einem gemischten Modell, welches Behandlung und Wasserbad als feste Effekte enthielt sowie die zufälligen Effekte Durchgang und Fermenter beinhaltete. Die Auswertung erfolge ebenfalls unter Verwendung der Prozedur PROC MIXED des Softwarepakets SAS für Windows (Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Für beide Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau von P < 0.05 festgelegt.

## 5.2 Ergebnisse

## 5.2.1 Verdaulichkeitsbestimmungen

Die untersuchte MS und GS unterschieden sich in der Verdaulichkeit der bestimmten Nährstofffraktionen ebenso wie in ihrer Energiekonzentration signifikant voneinander (Tabelle 11). So war die Verdaulichkeit der XF, der Detergenzien-Fasern sowie der Hemicellulose und der Cellulose bei GS höher als bei MS. Dagegen war die Verdaulichkeit des XL und der NfE mit 81,4 % bzw. 83,4 % bei MS höher als bei GS mit 55,3 % bzw. 76,8 %. Dies führte zu einer höheren Verdaulichkeit der OM der MS mit 77,6 % im Vergleich zu 72,5 % für die GS und damit zu einer höheren Konzentration an ME und NEL.

	Maissilage	Grassilage	P-Wert
Verdaulichkeit (%)	*		
Organische Masse	77,6 1,40	72,5 1,14	***
Rohfett	81,4 2,42	55,3 4,40	***
Rohfaser	65,7 2,21	72,0 1,37	**
N-freie Extraktstoffe	83,4 1,15	76,8 0,69	***
aNDFom	63,4 2,54	69,2 1,19	**
ADF	59,1 2,58	63,7 3,02	*
Hemicellulose	66,8 3,00	74,9 2,24	**
Cellulose	64,1 2,39	75,3 2,38	***
Energiekonzentration (MJ/kg TM)			
Umsetzbare Energie	11,3 0,20	10,3 0,16	***
Nettoenergie-Laktation	6,9 0,15	6,1 0,12	***

**Tabelle 11:** Verdaulichkeit der Nährstofffraktionen sowie berechnete Energiekonzentrationender Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte, n = 5)

aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; Hemicellulose = aNDF – ADF; Cellulose = ADF – ADL; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001

## 5.2.2 In situ-Inkubationen

Die geschätzten *in situ*-Abbauparameter der TM und der verschiedenen Nährstofffraktionen sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellt.

Bei der *in situ*-Inkubation von MS war die schnell abbaubare Fraktion der TM und des XP signifikant höher als bei GS. Dagegen waren für das XP die potenziell abbaubare Fraktion und deren Abbaurate bei Inkubation von GS signifikant höher. Gleiches galt auch für die potenziell abbaubare Fraktion der TM. Bezüglich des Effektiven Abbaus der TM unterschieden sich die beiden Silagen lediglich bei einem niedrigen Futteraufnahmeniveau mit einer angenommenen Passagerate von 2 %/h. Der Effektive Abbau des XP war sowohl bei einer angenommenen Passagerate von 2 %/h als auch von 5 %/h (mittleres Futteraufnahmeniveau) signifikant höher bei Inkubation von GS als bei Inkubation von MS. Der Anteil der schnell abbaubaren Fraktion der Stärke der MS betrug 56,6 %. Die potenziell abbaubare Fraktion der Maisstärke wurde auf 42,8 % geschätzt und deren Abbaurate auf 22,9 %/h. Somit ergab sich bei einem angenommenen mittleren Futteraufnahmeniveau (Passagerate von 5 %/h) mit 91,7 % ein relativ hoher Effektiver Abbau der Maisstärke.

### Kapitel 5

		Maissilage	Grassilage	P-Wert
Trockenmasse	$a^{1}(\%)$	42,3 0,27	36,8 0,73	**
	$b^{(1)}(\%)$	42,5 1,11	51,7 0,48	**
	$c^{1}$ (%/h)	4,4 0,73	5,5 1,33	0,13
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	84,9 1,27	88,5 1,14	**
	$ED2^{2}(\%)$	71,4 1,06	74,3 1,98	*
	$ED5^{2}(\%)$	62,1 1,29	63,5 2,62	0,23
	$ED8^{2}(\%)$	57,3 1,18	57,6 2,47	0,81
Rohprotein	$a^{1)}$ (%)	66,3 0,59	57,9 0,43	**
•	$b^{(1)}(\%)$	17,2 1,99	33,1 0,71	**
	$c^{1}$ (%/h)	4,1 0,42	8,5 1,41	*
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	83,5 1,44	91,0 0,59	**
	$ED2^{2}(\%)$	77,8 0,46	84,6 0,87	**
	$ED5^{2}(\%)$	74,0 0,21	78,7 1,18	*
	$ED8^{(2)}$ (%)	72,1 0,32	74,9 1,20	0,08
Stärke	$a^{1}(\%)$	56,6 2,28		
	$b^{(1)}(\%)$	42,8 2,09		
	$c^{1}$ (%/h)	22,9 1,84		
	$Plateau^{1}(\%)$	99,4 0,20		
	$ED2^{2}(\%)$	96,0 0,19		
	$ED5^{2}(\%)$	91,7 0,26		
	ED8 <sup>2)</sup> (%)	88,3 0,31		

**Tabelle 12:** Geschätzte *in situ*-Abbauparameter der Trockenmasse, des Rohproteins und derStärke der Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte, n = 3)

a = schnell abbaubare Fraktion; b = potenziell abbaubare Fraktion; c = Abbaurate von b; Plateau = a+b; <sup>1</sup>)kalkuliert anhand Gleichung 4; <sup>2</sup>)Effektiver Abbau kalkuliert anhand Gleichung 5 für eine angenommene Passagerate von 2, 5 oder 8 %/h; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01

Bei den Detergenzien-Fasern unterschieden sich die beiden Silagen nicht in ihren geschätzten Anteilen an potenziell abbaubaren Fraktionen. Dies traf auch auf den Anteil an schnell abbaubarer Fraktion der ADF zu. Dagegen war der Anteil an schnell abbaubarer Fraktion der NDF bei Inkubation von MS höher. Die Abbauraten der potenziell abbaubaren Fraktionen der NDF und ADF ebenso wie der kalkulierte Effektive Abbau bei angenommenen Passageraten von 2 %/h, 5 %/h und 8 %/h (hohes Futteraufnahmeniveau) waren bei Inkubation von GS signifikant höher als bei Inkubation von MS. Gleiches zeigte sich auch für die Hemicellulose und Cellulose. Bezüglich des Anteils der schnell abbaubaren Fraktion unterschieden sich die beiden Silagen bei Cellulose und hinsichtlich der potenziell abbaubaren Fraktion bei Hemicellulose. Die Mittelwerte und Standardabweichungen des *in situ*-Abbaus der TM und der unterschiedlichen Nährstofffraktionen der MS und GS über 96 Stunden und die jeweils angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 4) sind in Abbildung 6 dargestellt.

**Tabelle 13:** Geschätzte *in situ*-Abbauparameter der aNDF, der ADF, der Hemicellulose und der Cellulose der Mais- und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte, n = 3)

		Mais	silage	Grass	silage	P-Wert
aNDF	$a^{1}(\%)$	3,1	0,75	0,0	0,00	*
	$b^{1)}(\%)$	86,4	6,78	83,1	4,00	0,17
	$c^{1)}$ (%/h)	1,6	0,30	4,2	1,14	*
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	89,5	6,54	83,1	4,00	0,05
	$ED2^{2}(\%)$	40,5	1,77	55,2	3,42	**
	$ED5^{2}(\%)$	23,3	1,62	37,0	4,62	*
	$ED8^{2}(\%)$	17,0	1,28	27,9	4,31	*
ADF	$a^{1)}(\%)$	3,7	1,81	0,0	0,00	0,07
	$b^{1)}(\%)$	85,5	7,77	83,8	4,28	0,50
	$c^{1)}$ (%/h)	1,4	0,27	3,7	0,98	*
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	89,2	7,16	83,8	4,28	0,09
	$ED2^{2}(\%)$	38,8	1,31	53,6	3,20	**
	$ED5^{2}(\%)$	22,4	1,55	35,1	4,23	*
	$ED8^{2}(\%)$	16,5	1,50	26,1	3,88	*
Hemicellulose	$a^{1)}(\%)$	2,1	0,78	6,5	2,16	0,08
	$b^{1)}(\%)$	89,0	5,50	78,3	5,94	***
	$c^{1)}$ (%/h)	1,7	0,32	4,0	1,01	*
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	91,1	5,90	84,8	4,32	*
	$ED2^{2}(\%)$	42,9	2,70	57,8	3,73	**
	$ED5^{2}(\%)$	24,7	2,42	40,6	5,13	*
	$ED8^{2}(\%)$	17,7	2,00	32,0	5,08	*
Cellulose	$a^{1)}(\%)$	6,0	1,20	0,0	0,00	*
	$b^{1)}(\%)$	86,7	6,84	88,1	4,18	0,46
	$c^{1)}$ (%/h)	1,5	0,29	3,8	0,97	*
	Plateau <sup>1)</sup> (%)	92,7	6,41	88,1	4,18	0,10
	$ED2^{2}(\%)$	43,1	1,49	57,1	3,20	**
	$ED5^{2}(\%)$	26,0	1,59	37,6	4,32	*
	$ED8^{2}(\%)$	19,7	1,39	28,1	3,99	*

aNDF = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Amylase; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; Hemicellulose = aNDF – ADF; Cellulose = ADF – ADL; a = schnell abbaubare Fraktion; b = potenziell abbaubare Fraktion; c = Abbaurate von b; Plateau = a+b; <sup>1</sup>kalkuliert anhand Gleichung 4; <sup>2</sup>Effektiver Abbau kalkuliert anhand Gleichung 5 für eine angenommene Passagerate von 2, 5 oder 8 %/h; \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001



**Abbildung 6:** *In situ*-Abbau der Trockenmasse und der Nährstofffraktionen der Maissilage (durchgezogene Linie) und Grassilage (gepunktete Linie) über 96 Stunden (in %) und angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 4) (Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 3, geschätzte Funktionsparameter, siehe Tabelle 12 und Tabelle 13)

## 5.2.3 In vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest

Die inkubierte MS und GS unterschieden sich sowohl in ihrer potenziellen Gasbildung als auch in der Gasbildungsrate signifikant. So hatte die MS mit 71,0 mL/200 mg OM die größere potenzielle Gasbildung im Vergleich zur GS mit 63,4 mL/200 mg OM (Tabelle 14). Die Gasbildungsrate war jedoch niedriger als bei der GS. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen Gasbildungen der beiden Silagen über 72 Stunden und die jeweils angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2) sind in Abbildung 7 dargestellt.

**Tabelle 14:** Geschätzte Funktionsparameter der Maissilage und Grassilage (Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 24$ )

	Maissilage	Grassilage	P-Wert
b <sub>Gas</sub> <sup>1)</sup> (mL/200 mg OM)	71,0 2,20	63,4 2,39	***
c <sub>Gas</sub> <sup>1)</sup> (%/h)	7,5 0,84	7,9 1,17	***

 $b_{Gas}$  = potenzielle Gasbildung;  $c_{Gas}$  = Gasbildungsrate; OM = organische Masse; <sup>1</sup>kalkuliert anhand Gleichung 2; \*\*\*P < 0,001



Abbildung 7: Kumulative Gasbildung der Maissilage und Grassilage über 72 Stunden (in mL/200 mg organische Masse) und angepasste exponentielle Funktion (Gleichung 2) (Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n \ge 24$ , geschätzte Funktionsparameter, siehe Tabelle 14)

Die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen im Pansensaft-Puffer-Gemisch des Blindwertes und der beiden Silagen über 48 Stunden können Abbildung 8 entnommen werden. Hier zeigte sich, dass die Behandlungseffekte Silage und Zeitpunkt und deren Wechselwirkung einen signifikanten Einfluss auf die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Zeitverlauf hatte (Tabelle 15). Um die Übersichtlichkeit zu bewahren, wird auf eine Darstellung der Vergleiche der Zeitpunkte innerhalb einer Behandlung und zwischen den drei Behandlungen verzichtet.

**Tabelle 15:** *P*-Werte der Behandlungseffekte und deren Wechselwirkung für die Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch ( $n \ge 6$  pro Zeitpunkt)

Effekt	P-Wert
Silage	***
Zeitpunkt	***
Silage × Zeitpunkt	***
wheth D 0 0 0 1	

\*\*\*P < 0,001



**Abbildung 8:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch der Maissilage, Grassilage und des Blindwertes über 48 Stunden (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L; Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 6$  pro Zeitpunkt; \**P* < 0,05; \*\*\**P* < 0,001)

Bei Inkubation des Blindwertes stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration vom ersten (1 Stunde) bis zum letzten Messzeitpunkt 48 Stunden nach Start der Inkubation unabhängig von Substratabbau kontinuierlich an. Die Kurvenverläufe der beiden Silagen waren ähnlich und zeigten von 1 Stunde bis 2 Stunden nach Start der Inkubation einen leichten Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration, bevor die Konzentrationen wieder sanken und ab 8 Stunden (GS) bzw. 12 Stunden (MS) erneut anstiegen bis zum Erreichen der maximalen Konzentration an NH<sub>3</sub>-N zum letzten Messzeitpunkt. Dabei lagen die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen der GS deutlich über denen der MS. Der Blindwert und die beiden Silagen unterschieden sich alle signifikant in ihrer NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch

# 5.2.4 Effekte einer Ergänzung von Maissilage mit unterschiedlichen Stickstoff-Quellen auf die Pansenfermentation im Rusitec

Die täglich gebildete Methanmenge war nicht signifikant verschieden zwischen den Behandlungen, dagegen unterschieden sich diese signifikant in der täglich gebildeten Gasmenge (Tabelle 16). So wurde für MS und die Behandlungen mit N-Ergänzung signifikant mehr Gas ermittelt im Vergleich zur GS, mit Ausnahme von MS+HS. Der Abbau der OM war für MS und MS+Pro am niedrigsten, gefolgt von GS. Mit den anderen N-Ergänzungen war der Abbau der OM am größten. Der XP-Abbau war ebenfalls am niedrigsten bei MS+Pro, gefolgt von GS. Die höchsten Werte wurden für die anderen Behandlungen mit N-Ergänzung festgestellt. Bezüglich des Abbaus der XF und der Detergenzien-Fasern wurden bei Inkubation von GS die höchsten Werte ermittelt. Dabei wurde der NDF-Abbau durch Zulage des Peptons signifikant verbessert, wohingegen der Abbau der ADF durch Zulage von HS, Protein und Pepton erhöht wurde. Der Abbau der NfE war für MS und MS+Pro am niedrigsten. Die anderen N-Ergänzungen führten zu einer Steigerung im NfE-Abbau auf das Niveau der GS. Außerdem zeigte sich durch die N-Supplementierungen ein tendenziell zunehmender Stärkeabbau (P = 0,06), welcher statistisch jedoch nicht signifikant war. Der Stärkegehalt im Effluenten war bei allen MS-Behandlungen unter der Nachweisgrenze (Daten nicht dargestellt). Die täglich gebildete Menge an Acetat wurde durch Ergänzung von Harnstoff (14,7 mmol/d) signifikant erhöht und war bei Inkubation von GS (11,7 mmol/d) am niedrigsten. Die täglich gebildete Menge an Propionat war unbeeinflusst durch die Behandlung. Jedoch war das Verhältnis von Acetat zu Propionat bei Inkubation von GS signifikant niedriger als bei Inkubation von MS ohne und mit N-Ergänzungen. Am meisten Valerat und iso-SCFA wurden bei MS+AS und MS+Pep gebildet.

Kapitel 5

	М	2	MS	uc	MS	Dno	MCI	Don	MS	15	C	1	D Wort
		•						rep		A5	GS	)	<u><i>r</i>-wert</u>
рн	6,8 °	0,04	6,9 ª	0,04	6,8 <sup>o</sup>	0,04	6,9 <sup>a</sup>	0,04	6,8 °	0,04	6,9 ª	0,04	***
Gas (mL/d)	819 <sup>ab</sup>	84	790 <sup>bc</sup>	83	843 <sup>ab</sup>	79	938 <sup>ab</sup>	80	957 <sup>a</sup>	86	640 <sup>c</sup>	80	**
Methan (mL/d)	95	13	106	13	100	13	122	13	105	13	108	13	0,34
Abbau (%)													
Organische Masse <sup>1)</sup>	40,3 °	0,53	44,5 <sup>a</sup>	0,53	39,6 °	0,53	44,3 <sup>a</sup>	0,53	44,7 <sup>a</sup>	0,53	41,9 <sup>b</sup>	0,53	***
Rohprotein <sup>1)</sup>	59,0 <sup>d</sup>	1,20	75,7 ª	1,19	38,3 <sup>f</sup>	1,14	68,7 <sup>b</sup>	1,15	66,0 °	1,21	55,1 <sup>e</sup>	1,14	***
Rohfaser	5,8 <sup>b</sup>	0,61	7,2 <sup>b</sup>	0,61	6,8 <sup>b</sup>	0,58	6,2 <sup>b</sup>	0,58	5,6 <sup>b</sup>	0,60	17,1 <sup>a</sup>	0,58	***
N-freie Extraktstoffe	48,6 <sup>c</sup>	0,62	52,6 <sup>a</sup>	0,62	49,6 °	0,62	51,0 <sup>b</sup>	0,62	51,0 <sup>b</sup>	0,62	51,9 <sup>ab</sup>	0,62	***
aNDF <sub>om</sub>	10,5 °	0,69	11,0 °	0,69	10,9 °	0,69	13,0 <sup>b</sup>	0,69	11,4 <sup>bc</sup>	0,69	18,9 ª	0,69	***
ADF	5,2 <sup>d</sup>	0,54	9,3 <sup>b</sup>	0,53	7,4 °	0,50	7,2 °	0,50	6,1 <sup>cd</sup>	0,55	18,9 <sup>a</sup>	0,50	***
Stärke	63,8	1,51	69,6	1,50	67,1	1,46	67,7	1,43	68,4	1,47			0,06
SCFA (mmol/d)													
Acetat	13,3 <sup>b</sup>	0,48	14,7 ª	0,48	14,2 <sup>ab</sup>	0,45	13,2 <sup>b</sup>	0,45	14,4 <sup>ab</sup>	0,48	11,7 °	0,45	**
Propionat	7,0	0,37	7,1	0,37	7,0	0,37	7,0	0,37	7,0	0,37	7,2	0,37	0,98
Isobutyrat	0,3 <sup>d</sup>	0,01	0,2 <sup>d</sup>	0,01	0,3 <sup>d</sup>	0,01	0,4 <sup>b</sup>	0,01	0,4 <sup>a</sup>	0,01	0,4 <sup>c</sup>	0,01	***
Butyrat	7,3 °	0,21	8,1 <sup>ab</sup>	0,21	7,7 <sup>bc</sup>	0,21	7,9 <sup>ab</sup>	0,21	8,2 ª	0,21	4,6 <sup>d</sup>	0,21	***
Isovalerat	1,5 <sup>bc</sup>	0,19	1,5 <sup>bc</sup>	0,19	1,4 °	0,19	1,7 <sup>ab</sup>	0,19	1,9 <sup>a</sup>	0,20	1,3 °	0,19	**
Valerat	2,7 <sup>b</sup>	0,16	2,8 <sup>b</sup>	0,16	3,0 <sup>ab</sup>	0,16	3,2 ª	0,16	3,2 ª	0,16	2,8 <sup>b</sup>	0,16	**
Summe	32,1 <sup>b</sup>	0,88	34,4 ª	0,88	33,5 <sup>ab</sup>	0,88	33,5 <sup>ab</sup>	0,88	35,2 ª	0,88	27,9 °	0,88	***
$C_2:C_3$	1,9 <sup>a</sup>	0,11	2,1 ª	0,11	2,1 <sup>a</sup>	0,11	1,9 <sup>a</sup>	0,11	2,1 <sup>a</sup>	0,11	1,6 <sup>b</sup>	0,11	**
Ammoniak-N (mmol/d)	2.1 <sup>d</sup>	0,17	8.2 ª	0,17	2,5 <sup>d</sup>	0,17	5,9 <sup>b</sup>	0,17	6.1 <sup>b</sup>	0,17	3.4 °	0,17	***
Mikrobielles XP (mg/d)	609 <sup>d</sup>	16	1077 <sup>a</sup>	16	708 °	16	1091 <sup>a</sup>	16	1010 <sup>b</sup>	16	1065 <sup>a</sup>	16	***
EMPS	111 <sup>e</sup>	2	174 <sup>b</sup>	2	123 <sup>d</sup>	2	171 <sup>b</sup>	2	155 °	2	200 <sup>a</sup>	2	***
N-Effizienz (%)	60,2 <sup>a</sup>	0,88	58,1 <sup>ab</sup>	0,88	38,3 <sup>d</sup>	0,88	59,0 ª	0,88	54,6 °	0,88	56,2 <sup>bc</sup>	0,88	***
SAM:LAM	0,23 <sup>a</sup>	0,01	0,15 <sup>b</sup>	0,01	0,26 <sup>a</sup>	0,01	0,17 <sup>b</sup>	0,01	0,16 <sup>b</sup>	0,01	0,24 <sup>a</sup>	0,01	***

**Tabelle 16:** pH-Wert, Gas- und Methanproduktion, Nährstoffabbau über 48 h, kurzkettige Fettsäuren und Ammoniak-N im Effluenten sowie mikrobielle Proteinsynthese (LS-Means, Standardfehler und *P*-Werte, n = 5)

MS = Maissilage; HS = Harnstoff; Pro = Erbsenprotein; Pep = Erbsenpepton; AS = Aminosäuren-Mischung; GS = Grassilage; <sup>1</sup>/<sub>k</sub>korrigiert um den Rohproteinbeitrag der Partikelassoziierten Mikroorganismen; aNDF<sub>om</sub> = Neutral-Detergenzien-Faser nach Vorbehandlung mit α-Amylase und Verarschung; ADF = Säure-Detergenzien-Faser; SCFA =kurzkettige Fettsäuren; C<sub>2</sub>:C<sub>3</sub> = Verhältnis von Acetat zu Propionat; Mikrobielles XP = Summe aus Partikel-assoziierten und Flüssigkeit-assoziierten Mikroorganismen; EMPS= Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (in g mikrobielles Rohprotein/kg abgebaute organische Masse); N-Effizienz = Anteil des aufgenommen N (über Futter und Puffer),der sich in mikrobiellem XP wiederfindet; SAM:LAM = Verhältnis von Partikel-assoziierten Mikroorganismen zu Flüssigkeit-assoziierten Mikroorganismen; <sup>a-f</sup> unterschiedlicheHochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (*P*< 0,05); \*\**P*< 0,01; \*\*\**P*< 0,001 Die täglich gebildete Menge an NH<sub>3</sub>-N war bei Supplementierung von HS am höchsten, gefolgt von MS+Pep und MS+AS. Die MS-Behandlung und die Behandlung mit Protein-Zulage lieferten am wenigsten NH<sub>3</sub>-N pro Tag. Die Menge an mikrobiellem XP war bei Inkubation von GS sowie bei Inkubation von MS+HS und MS+Pep signifikant höher als bei den anderen Behandlungen. Die EMPS wurde durch die Ergänzung aller N-Quellen signifikant verbessert, jedoch wurde durch keine N-Supplementierung das Niveau der GS erreicht. Bei der Betrachtung der N-Effizienz, die den prozentualen Anteil des aufgenommenen N (über Futter und Pufferlösung) darstellt, der sich in mikrobiellem XP wiederfindet, zeigten MS und MS+Pep mit 60,2 % bzw. 59,0 % die höchsten Werte. Am niedrigsten war die N-Effizienz für MS+Pro mit 38,3 %.

Die in der Fermenterflüssigkeit gemessene Konzentration an NH<sub>3</sub>-N ist in Abbildung 9 dargestellt, die zugehörigen Werte können Tabelle 17 entnommen werden. Für alle Behandlungen wurde ein Abfall der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit ermittelt. Für die Behandlungen MS+HS, MS+Pep und MS+AS wurden die höchsten NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen im Zeitverlauf ermittelt. Zusätzlich war der Verlauf der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bei diesen drei Behandlungen ähnlich. Lediglich zum Zeitpunkt 12 Stunden unterschieden sich die gemessenen Konzentrationen von MS+HS und MS+AS signifikant. Die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration der GS unterschied sich zu jedem Messzeitpunkt signifikant von den anderen Behandlungen und lag im mittleren Bereich.

**Tabelle 17:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit für die untersuchten Behandlungen (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L; Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n \ge 4$  pro Zeitpunkt, *P*-Werte siehe Abbildung 9)

Zeit	MS	MS+HS	MS+Pro	MS+Pep	MS+AS	GS
0 h	4,1 <sup>aC</sup> 0,92	14,4 <sup>aA</sup> 2,55	5,0 <sup>aC</sup> 1,29	11,7 <sup>aA</sup> 2,03	12,1 <sup>aA</sup> 2,46	8,9 <sup>aB</sup> 4,14
2 h	3,8 <sup>aC</sup> 0,75	12,2 <sup>bA</sup> 1,86	4,7 <sup>aC</sup> 1,12	10,9 <sup>bA</sup> 1,69	10,6 <sup>bA</sup> 1,78	8,2 <sup>abB</sup> 3,46
4 h	3,6 <sup>bD</sup> 0,80	11,7 <sup>bA</sup> 1,73	4,6 <sup>aC</sup> 0,97	10,4 <sup>bA</sup> 1,44	9,9 <sup>bA</sup> 1,62	7,9 <sup>bB</sup> 2,91
12 h	3,0 <sup>cD</sup> 0,43	12,1 <sup>bA</sup> 1,79	4,0 <sup>bD</sup> 0,85	9,2 <sup>cAB</sup> 1,03	9,0 <sup>cB</sup> 1,32	6,6 <sup>cC</sup> 2,64
24 h	3,4 <sup>bC</sup> 1,00	12,3 <sup>bA</sup> 1,60	3,8 <sup>bC</sup> 1,12	10,0 <sup>bA</sup> 1,41	10,2 <sup>bA</sup> 1,37	7,7 <sup>bB</sup> 3,31

MS = Maissilage; HS = Harnstoff; Pro = Erbsenprotein; Pep = Erbsenpepton; AS = Aminosäuren-Mischung; GS = Grassilage; <sup>a-c</sup> unterschiedliche Kleinbuchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer Behandlung (<math>P < 0.05); <sup>A-D</sup> unterschiedliche Großbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung ninnerhalb eines Zeitpunktes (P < 0.05)

Die niedrigsten NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit wurden für MS und MS+Pro ermittelt. Diese unterschieden sich lediglich zum Zeitpunkt 4 Stunden signifikant in ihrer Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit. Die Höhe der in der Fermenterflüssigkeit gemessenen mittleren NH<sub>3</sub>-N-Konzentration entsprach der Höhe der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration, die im Effluenten der sechs Behandlungen ermittelt wurde



**Abbildung 9:** Ammoniak-Stickstoff-Konzentration im Zeitverlauf in der Fermenterflüssigkeit für die untersuchten Behandlungen (in mmol NH<sub>3</sub>-N/L; Mittelwerte, Standardabweichungen und *P*-Werte,  $n \ge 4$  pro Zeitpunkt; \**P* < 0,05; \*\*\**P* < 0,001)

## 5.3 Diskussion

Die Unterschiede, die im Abbau der OM und der Detergenzien-Fasern sowie in der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP, der EMPS und in der N-Effizienz zwischen der MS ohne N-Ergänzung und der GS ermittelt wurden sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 4. Auch Hildebrand et al. (2011c) beobachteten bei alleiniger Inkubation einer MS und GS einen höheren Abbau der OM und der Faserfraktionen sowie eine größere Menge an täglich gebildetem mikrobiellem N und eine höhere EMPS für GS im Vergleich zu MS. Dennoch war in der eigenen Untersuchung die Menge an abgebauten Kohlenhydraten (Summe aus XF und NfE) für MS ohne N-Ergänzung größer als für GS (4,8 g/Tag für MS im Vergleich zu 4,2 g/Tag für GS), auch wenn dies statistisch nicht überprüft wurde. Dies wurde durch die gemessene Menge an SCFA bestätigt, die für MS höher war als für GS. Zusätzlich ist dies in Übereinstimmung mit den Daten zur quantitativen Gasbildung, die bei Inkubation derselben MS und GS im HFT ermittelt wurden (Tabelle 14). Hier wurde eine größere potenzielle Gasbildung für MS als für GS beobachtet. Dies könnte unter anderem auf die hohen Stärke-Gehalte der MS zurückzuführen sein, die auch über den in der Literatur beschriebenen Werten lagen (De Boever et al. 2005, DLG 1997, García-Rodriguez et al. 2005). Denn die in vitro-Gasbildung entsteht zu einem größeren Anteil aus der Fermentation von Nicht-Struktur-Kohlenhydraten als aus der Fermentation von XP (Menke und Steingass 1988). Des Weiteren könnten die im Vergleich zur GS deutlich niedrigeren Gehalte an XF, NDF, ADF und ADL zur beobachteten höheren potenziellen Gasbildung der MS beigetragen haben. Auch García-Rodriguez et al. (2005) ermittelten eine höhere kumulative Gasbildung bei Inkubation von MS-Proben als bei Inkubation von GS-Proben. Jedoch war in der Untersuchung von García-Rodriguez et al. (2005) zusätzlich die Gasbildungsrate bei Inkubation der MS-Proben größer als bei Inkubation der GS-Proben. Die hier untersuchte MS zeigte dagegen eine niedrigere Gasbildungsrate als die GS. Dennoch lagen die Gasbildungsraten beider Silagen über zuvor beschriebenen Werten (García-Rodriguez et al. 2005, Getachew et al. 2004). Außerdem ermittelten Hildebrand et al. (2011a) einen linearen Abfall in der Gasbildungskapazität mit steigenden Anteilen an GS in einer Ration mit MS. Dagegen wurde von Boguhn et al. (2013) kein Unterschied in der Gasbildung über 24 Stunden zwischen MS und GS ermittelt. Auch im Rusitec war die täglich gebildete Gasmenge bei MS-Inkubation höher als bei GS-Inkubation. Die täglich gebildete Methanmenge war jedoch ähnlich zwischen MS und GS. Dies stimmt nicht mit den Ergebnissen überein, die aus der vorhergehenden Inkubation einer anderen MSund GS-Charge im Rusitec stammen (Kapitel 4), bei welcher ähnliche Gasmengen für MS und GS beobachtet wurden, die täglich gebildete Methanmenge jedoch bei GS-Inkubation höher war als bei MS-Inkubation.

Der höhere Abbau der Faserfraktionen, der im Rusitec für GS im Vergleich zu MS ohne N-Ergänzung ermittelt wurde, ist in Übereinstimmung mit der höheren Verdaulichkeit der Faserfraktionen derselben GS im Vergleich zur selben MS, die in vivo mit Hammeln bestimmt wurde (Tabelle 11). Bereits in früheren Untersuchungen wurde ein linearer Anstieg in der Verdaulichkeit unterschiedlicher Faserfraktionen mit steigenden GS-Anteilen in Rationen mit MS beobachtet, welcher auf einen höheren Gehalt an fermentierbarer Faser der GS hinweist (Browne et al. 2005, Hildebrand et al. 2011a, Juniper et al. 2008). Ebenso wurde bereits zuvor eine höhere Verdaulichkeit der Faserfraktionen für GS bzw. GS-basierte Rationen im Vergleich zu MS bzw. MS-basierte Rationen ermittelt (Mulligan et al. 1999, Mulligan et al. 2002, O'Mara et al. 1998, Owens et al. 2009). Allerdings war das Niveau des Faserabbaus im Rusitec sehr niedrig und deutlich unter den *in vivo* ermittelten Verdaulichkeitswerten. Ähnlich niedrige Werte im Abbau der Faserfraktionen wurden jedoch bereits in anderen in vitro-Untersuchungen bei Inkubation von MS und GS bzw. bei Inkubation von MS- und GS-basierten Rationen beschrieben (Boguhn et al. 2013, Hildebrand et al. 2011a, Hildebrand et al. 2011c). Auch bei der vorhergehenden Inkubation einer anderen MS- und GS-Charge im Rusitec (Kapitel 4) war der Faserabbau auf einem vergleichbaren Niveau wie in der zweiten Rusitec-Untersuchung der vorliegenden Arbeit. Gegensätzlich zur ersten Rusitec-Untersuchung, war in der zweiten Untersuchung der Lignifizierungsgrad der GS jedoch höher als der der MS und stellt deshalb keine Erklärung für den niedrigeren Abbau der Faserfraktionen der MS ohne N-Ergänzung im Vergleich zur GS dar. Wie bereits zuvor diskutiert (Kapitel 4.3) könnte jedoch der hohe Stärkegehalt der MS einen negativen Einfluss auf den Faserabbau gehabt haben (Hildebrand et al. 2011a). Wallace et al. (2001) untersuchten den Einfluss einer Ergänzung von Faserabbauenden Enzymen zu MS und GS in vitro und schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die mikrobielle Enzymaktivität den Grad des Faserabbaus durch die Mikroorganismen des Pansens begrenzt und die Pflanzenfaser selbst die Fermentationsrate nicht beeinflusst.

Der im Rusitec ermittelte höhere OM-Abbau der GS im Vergleich zur unsupplementierten MS steht im Gegensatz zu der *in vivo* mit Hammeln ermittelten höheren OM-Verdaulichkeit für MS im Vergleich zu GS. Dies ist vermutlich auf die höhere NfE-Verdaulichkeit der MS verglichen mit der GS *in vivo* zurückzuführen, wohingegen im Rusitec der NfE-Abbau für GS höher war als für die unsupplementierte MS. Allerdings ist die *in vivo* ermittelte höhere OM-Verdaulichkeit der MS im Vergleich zu GS in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von

Browne et al. (2005) und Juniper et al. (2008), die einen Anstieg in der OM-Verdaulichkeit mit zunehmenden MS-Anteilen in einer Ration mit GS beschrieben. Dagegen war in den Untersuchungen von Mulligan et al. (1999), Mulligan et al. (2002) und O'Mara et al. (1998) die OM-Verdaulichkeit für GS bzw. GS-basierte Rationen höher als für MS bzw. MS-basierte Rationen. Ähnliches wurde auch von Hildebrand et al. (2011a) und O'Mara et al. (1998) ermittelt, die einen Anstieg in der OM-Verdaulichkeit *in vivo* mit zunehmenden Anteilen an GS in Rationen mit MS beschrieben. Andererseits ermittelten Owens et al. (2009) eine ähnliche OM-Verdaulichkeit einer MS-basierten Ration und einer GS-basierten Ration mit Rindern. Unterschiede zwischen Untersuchungen bezüglich der Rangierung von MS und GS anhand ihres Niveaus der Verdaulichkeit sind aufgrund der großen Variation von Silagen in ihrer Nährstoffzusammensetzung und der Verwendung unterschiedlicher Tierarten zur Bestimmung der Verdaulichkeit denkbar.

Vergleicht man die Rangierung der GS und der unsupplementierten MS anhand des Abbaus der OM und der Faserfraktionen im Rusitec mit der Rangierung anhand des Effektiven Abbaus der TM und der Faserfraktionen (Tabelle 12 und Tabelle 13), der für dieselben beiden Silagen in situ bestimmt wurde, so stimmt diese weitestgehend überein. Auch die potenziell abbaubare Fraktion der TM war für GS größer als für MS. Bereits zuvor wurde für GS eine tendenziell größere potenziell abbaubare Fraktion und ein größerer Effektiver Abbau der TM als für MS beschrieben (Deaville und Givens 1998). Bemerkenswert ist die für alle Faserfraktionen deutlich niedrigere Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion der MS im Vergleich zu GS. Dies resultierte trotz ähnlichem und teilweise sogar höherem Plateau des Abbaus der Faserfraktionen der MS verglichen mit GS in einem niedrigeren Effektiven Abbau der Faserfraktionen der MS gegenüber der GS für alle Passageraten. Dies bekräftigt die Hypothese, dass GS einen höheren Gehalt an fermentierbarer Faser aufweist als MS. Auch Mulligan et al. (2002) ermittelten bei der in situ-Inkubation von MS und GS über 72 Stunden in Rindern eine niedrigere Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion und einen niedrigeren Effektiven Abbau der NDF für MS als für GS. Dabei war das Niveau des Effektiven Abbaus der NDF bei selbigen Autoren ähnlich wie in der eigenen Untersuchung. Allerdings war in der Arbeit von Mulligan et al. (2002) zusätzlich die potenziell abbaubare Fraktion und das Plateau des Abbaus der NDF bei MS deutlich niedriger als bei GS, wohingegen in der eigenen Untersuchung zwischen den beiden Silagen kein Unterschied in den genannten Parametern bestand. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Plateau des Abbaus und damit die potenziell abbaubare Fraktion der NDF der MS der eigenen Untersuchung möglicherweise überschätzt wurden. Auch De Boever et al. (2002) ermittelten bei der in situ-Inkubation von 26 MS-Proben eine deutlich niedrigere potenziell abbaubare Fraktion der NDF als in dieser Arbeit, die im Mittel 67,9 % (55,3 % bis 76,6 %) betrug. Dennoch liegt die in dieser Arbeit ermittelte Abbaurate der potenziell Abbaubaren Fraktion der NDF in der Spanne, die von De Boever et al. (2002) angegeben wird. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs des in situ-Abbaus der Faserfraktionen der beiden Silagen (Abbildung 6) zeigt sich die niedrigere Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion der Faserfraktionen der MS in einem deutlich flacheren Anstieg des Kurvenverlaufs für MS verglichen mit GS, so dass zum Zeitpunkt 96 Stunden das Plateau des Abbaus vor allem für MS noch nicht erreicht zu sein scheint. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass bezüglich der Faserfraktionen eine längere Inkubationszeit als 96 Stunden zur genaueren Schätzung des Plateaus, vor allem für MS, sinnvoll gewesen wäre. Für GS stimmen die geschätzten in situ-Abbauparameter der NDF jedoch mit den von Ali et al. (2014) angegebenen mittleren Werten überein, die anhand der in situ-Inkubation von 69 GS-Proben ermittelt wurden, die sich deutlich in ihrem Gehalt an TM, XP und NDF unterschieden. Obwohl das Plateau des Abbaus und die potenziell abbaubare Fraktion der Faserfraktionen für MS vermutlich überschätzt wurden, stimmt der sichtbar niedrigere Effektive Abbau der Faserfraktionen der MS mit dem Bild überein, dass sich anhand der in vivo-Verdaulichkeit und dem Abbau im Rusitec ergibt. Die schnell abbaubare Fraktion und die potenziell abbaubare Fraktion der Stärke der MS, die in dieser Arbeit ermittelte wurden, liegen auf einem ähnlichen Niveau wie von De Boever et al. (2002) im Mittel für 26 MS-Proben beschrieben. Allerdings wurde in dieser Arbeit eine deutlich höhere Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion der Stärke anhand der in situ-Abbaudaten geschätzt, welche über dem Maximal-Wert von 16,5 %/h von De Boever et al. (2002) liegt. Dies deutet auf eine schnelle Fermentation der Stärke der hier verwendeten MS hin. Dies könnte zu einer asynchronen Bereitstellung von Energie und Protein bei der Inkubation dieser MS führen und damit einen Einfluss auf die MPS und EMPS haben.

Der in diesem Rusitec ermittelte XP-Abbau war nicht wie zuvor beschrieben (Kapitel 4, Hildebrand et al. 2011a) ähnlich zwischen MS und GS, sondern höher bei MS-Inkubation. Gleiches wurde von Hildebrand et al. (2011c) bei der alleinigen Inkubation von MS und GS im Rusitec beobachtet. Im Gegensatz dazu war bei der *in situ*-Inkubation der beiden Silagen die potenziell abbaubare Fraktion und die zugehörige Abbaurate, ebenso wie das Plateau des Abbaus und der Effektive Abbau bei den Passageraten 2 %/h und 5 %/h des XP für GS höher als für MS. Jedoch bestand bei einem angenommenen hohen Futteraufnahmeniveau mit einer Passagerate von 8 %/h kein Unterschied mehr zwischen MS und GS im Effektiven Abbau des XP. Dies könnte auf die hohe schnell abbaubare Fraktion des XP für MS *in situ* zurückzuführen

sein. Auch Mulligan et al. (2002) beobachteten für MS eine größere schnell abbaubare Fraktion und eine deutlich langsamere Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion des XP als für GS. Außerdem liegen die geschätzten Parameter der schnell abbaubaren Fraktion und der potenziell abbaubaren Fraktion des XP der MS in den Bereichen, die von De Boever et al. (2002) bei der *in situ*-Inkubation von 26 verschiedenen MS-Proben ermittelt wurden. Dagegen ist die Abbaurate der potenziell abbaubaren Fraktion des XP der MS aus der eigenen Untersuchung deutlich höher als der von De Boever et al. (2002) angegebene Maximalwert. Des Weiteren sind die für GS ermittelten *in situ*-Abbauparameter in Übereinstimmung mit den von Ali et al. (2014) angegebenen Spannen derselben Parameter, die anhand der *in situ*-Abbaudaten von 69 GS-Proben geschätzt wurden. Trotz niedrigerem XP-Abbau der GS im Rusitec war aufgrund des nahezu doppelt so hohen XP-Gehaltes der GS im Vergleich zur MS die Menge an abgebautem XP für GS dennoch größer und führte zu höheren NH<sub>3</sub>-N-Mengen pro Tag im Effluenten für GS.

Die HS-Supplementierung zu MS resultierte in einem deutlichen Anstieg in der täglich gebildeten NH<sub>3</sub>-N-Menge im Effluenten, so dass diese auch über dem Niveau der GS lag. Des Weiteren führte die HS-Ergänzung zu einem Anstieg im Abbau der OM, der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP und in der EMPS. Dies stützt Beobachtungen, die von Hildebrand et al. (2011c) bei der *in vitro*-Inkubation von MS mit und ohne HS-Ergänzung im Vergleich zu GS gemacht wurden. Jedoch hatte die HS-Ergänzung ebenfalls zur Folge, dass die N-Effizienz numerisch etwas niedriger war im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung und dadurch dem Niveau der GS entsprach. Dies war zu erwarten, da laut Bach et al. (2005) ein Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit in vitro mit einem Rückgang in der Effizienz der N-Nutzung verbunden ist. Der höhere OM-Abbau bei HS-Ergänzung in der eigenen Untersuchung ist hauptsächlich auf den Anstieg im Abbau des XP zurückzuführen, der vermutlich wiederum in der guten Löslichkeit des HS begründet liegt. Außerdem wurde der Abbau der ADF und der NfE durch HS-Ergänzung gesteigert und der Abbau der Stärke war tendenziell höher bei HS-Ergänzung (P = 0.06). Dies könnte darauf hinweisen, dass den amylolytischen und cellulolytischen Mikroorganismen bei alleiniger Inkubation von MS nicht ausreichend N zur Verfügung stand. Zusätzlich war aufgrund der deutlich größeren Menge an NH<sub>3</sub>-N im Effluenten bei HS-Supplementierung im Vergleich zur unsupplementierten MS ein Anstieg im Abbau der ADF zu erwarten, da laut Russell et al. (1992) Mikroorganismen, die Struktur-Kohlenhydrate fermentieren, NH3 als N-Quelle zur MPS verwenden. Bereits in früheren in vitro-Untersuchungen wurde eine positive Wirkung von HS-Ergänzungen auf den Abbau von Nicht-Struktur- und Struktur-Kohlenhydraten unterschiedlicher Rationen

beschrieben (Griswold et al. 2003, Windschitl und Stern 1988). Auch bei Inkubation von reiner MS mit und ohne HS-Ergänzung wurde ein höherer Abbau der Nicht-Struktur-Kohlenhydrate und der Stärke durch HS-Ergänzung beobachtet im Vergleich zu unsupplementierter MS (Hildebrand et al. 2011c). Allerdings war der Abbau der Faserfraktionen bei Hildebrand et al. (2011c) unbeeinflusst von der HS-Ergänzung. Dies könnte möglicherweise mit dem höheren Vermahlungsgrad der MS von 4 mm bei Hildebrand et al. (2011c) im Vergleich zu 1 mm in der eigenen Untersuchung zusammenhängen. Des Weiteren wurde bei Hildebrand et al. (2011c) im Gegensatz zur eigenen Untersuchung kein Unterschied im XP-Abbau zwischen MS und MS+HS ermittelt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass selbige Autoren annahmen, dass sich der zugesetzte HS vollständig auflöst und diesen deshalb nicht in den Berechnungen des Abbaus der OM und des XP berücksichtigten. Der höhere ADF-Abbau bei HS-Supplementierung in der eigenen Untersuchung resultierte in einer größeren Menge Acetat im Vergleich zu MS. Zusätzlich wurde bei Inkubation von MS+HS mehr Butyrat gebildet als bei MS. In der Summe führte dies zu größeren Mengen an SCFA pro Tag für MS+HS als für MS, was wiederum in Übereinstimmung mit dem höheren OM-Abbau für MS+HS im Vergleich zu MS ist. Auch bei Hildebrand et al. (2011c) war die Menge an täglich gebildetem Acetat und die Summe an SCFA bei MS+HS größer als bei MS. Gegensätzlich zu den Ergebnissen in der eigenen Untersuchung war bei Hildebrand et al. (2011c) die gebildete Menge an Propionat bei HS-Supplementierung jedoch höher als bei Inkubation der reinen MS wohingegen die gebildete Menge an Butyrat unbeeinflusst von der HS-Ergänzung war. Es ist denkbar, dass die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der gebildeten Mengen an SCFA zwischen Hildebrand et al. (2011c) und der eigenen Untersuchung unter anderem auf die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten Silagen zurückzuführen sind. Trotz höherem XP-Abbau und einer größeren Menge an NH<sub>3</sub>-N im Effluenten bei MS+HS im Vergleich zur MS, wurde bei der HS-Supplementierung kein Anstieg in der täglich gebildeten Menge an iso-SCFA und Valerat beobachtet. Dies bekräftigt die Vermutung, dass der Anstieg im XP-Abbau nicht aus einer gesteigerten AS-Fermentation der MS stammt, sondern aus dem Abbau des Harnstoffs.

Die Pep-Ergänzung zu MS führte zu einem ähnlichen Anstieg im OM-Abbau, der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP und in der EMPS wie die HS-Ergänzung. Auch Griswold et al (1996) ermittelten bei der *in vitro*-Inkubation einer Ration aus Haferstroh und Maiskörnern mit unterschiedlichen N-Quellen eine ähnliche Menge an täglich gebildetem mikrobiellem N und eine ähnliche EMPS zwischen einer Peptid- und einer HS-Ergänzung. Allerdings war der OM-Abbau bei Griswold et al (1996) bei der Peptid-Supplementierung höher als bei der HS-Supplementierung. Der Anstieg im OM-Abbau bei MS+Pep im Vergleich

zu MS, der in der eigenen Untersuchung beobachtet wurde, resultierte wie bei MS+HS aus einer Erhöhung des Abbaus des XP, der NfE und der ADF, wenn auch nicht auf das Niveau von MS+HS. Jedoch wurde bei MS+Pep im Gegensatz zu MS+HS zusätzlich der NDF-Abbau im Vergleich zu MS ohne N-Ergänzung erhöht. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Griswold et al (1996), die bei einer HS-Ergänzung einen niedrigeren ADF-Abbau als bei einer Peptid-Ergänzung beobachteten, wohingegen kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungen im Abbau der NDF und der Nicht-Struktur-Kohlenhydrate bestand. Der höhere XP-Abbau von MS+Pep im Vergleich zu MS zeigte sich in einer größeren Menge an Isobutyrat und Valerat, einer tendenziell größeren Menge an Isovalerat sowie einer größeren Menge an täglich gebildetem NH<sub>3</sub>-N im Effluenten für MS+Pep im Vergleich zu MS. Dies deutet auf eine gesteigerte AS-Fermentation hin und stützt Ergebnisse früherer Untersuchungen (Carro und Miller 1999, Griswold et al. 1996). Obwohl die täglich gebildete NH<sub>3</sub>-N-Menge im Effluenten bei MS+Pep niedriger war als bei MS+HS, war die N-Effizienz für MS+Pep dennoch lediglich numerisch höher als bei MS+HS. Zusätzlich spiegelte sich der höhere Abbau der Detergenzien-Fasern für MS+Pep im Vergleich zu MS nicht in einer größeren Menge an Acetat wieder. Ebenso war die Summe an SCFA trotz höherem OM-Abbau bei Pep-Supplementierung nur tendenziell höher im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung.

Auch MS+AS resultierte in einer Steigerung des OM-Abbaus im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung, dabei war das Niveau ähnlich wie für MS+HS und MS+Pep beobachtet. Der Anstieg im OM-Abbau kann dabei hauptsächlich auf einen höheren Abbau des XP und der NfE zurückgeführt werden. Bezüglich der Faserfraktionen wurde für MS+AS lediglich bei den Detergenzien-Fasern ein numerischer Anstieg im Abbau beobachtet verglichen mit MS. Trotz niedrigerem XP-Abbau bei MS+AS als bei MS+Pep, war die täglich gebildete Menge an Isobutyrat für MS+AS höher bzw. für Isovalerat, Valerat und NH<sub>3</sub>-N ähnlich wie bei MS+Pep. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer umfangreichen Fermentation der AS kam und diese möglicherweise nicht direkt in mikrobielles Protein eingebaut wurden, wie es zuvor vermutet worden war. Weitere Hinweise dafür sind, dass weniger mikrobielles XP gebildet wurde und die EMPS ebenso wie die N-Effizienz bei MS+AS niedriger war als bei MS+HS und MS+Pep. Bereits Carro und Miller (1999) beobachteten, dass freie AS weniger effizient zur Bildung von mikrobiellem XP verwendet wurden als Peptide. Im Gegensatz dazu beschrieben Griswold et al. (1996) keine Unterschiede in der täglich gebildeten Menge an bakteriellem N und in der EMPS zwischen einer Peptid- und einer AS-Supplementierung zu einer Ration aus Haferstroh und Maiskörnern, obwohl diese eine höhere Konzentration an NH<sub>3</sub>-N und eine größere Menge an Valerat bei der AS-Ergänzung ermittelten als bei der Peptid-Ergänzung. Dennoch führte die AS-Supplementierung zu MS in der eigenen Untersuchung dazu, dass mehr mikrobielles XP gebildet wurde und die EMPS höher war als bei der unsupplementierten MS, wenngleich die N-Effizienz niedriger war als bei MS, MS+HS und MS+Pep.

Die Pro-Ergänzung zu MS resultierte im Gegensatz zu den anderen N-Quellen nicht in einem Anstieg des OM-Abbaus. Dies ist hauptsächlich auf eine Verschlechterung im XP-Abbau zurückzuführen und resultierte vermutlich darin, dass MS+Pro den niedrigsten Anstieg in der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP und in der EMPS innerhalb der N-Quellen zeigte. Der niedrigere XP-Abbau von MS+Pro im Vergleich zu MS ist wahrscheinlich auf eine sehr niedrige Abbaubarkeit des Proteinisolats zurückzuführen. Da Erbsenprotein normalerweise eine hohe Abbaubarkeit im Pansen aufweist (Andrade-Montemayor et al. 2009, Goelema et al. 1998), ist die niedrige Abbaubarkeit im Rusitec möglicherweise auf strukturelle Veränderungen des Erbsenproteins zurückzuführen, zu denen es während der Isolierung des Erbsenproteins kam und die den XP-Abbau negativ beeinflussen. Allerdings muss angemerkt werden, dass bezüglich des Prozesses der Proteinisolierung des in der eigenen Untersuchung verwendeten Erbsenproteins keine genaueren Informationen vorliegen. Auch Griswold et al. (1996) ermittelten in vitro einen deutlich niedrigeren XP-Abbau eines Sojaprotein-Isolats, das zu einer Ration aus Haferstroh und Maiskörnern supplementiert wurde, verglichen mit einer HS-, ASbzw. Peptid-Ergänzung. Selbige Autoren kamen zu dem Schluss, dass unter den gegebenen Bedingungen der Untersuchung der Grad der Protein-Hydrolyse das Wachstum stärker begrenzt hat als der Grad der Peptid-Aufnahme. Dennoch war in der eigenen Untersuchung die abgebaute Menge an XP pro Tag bei MS+Pro höher als bei MS. Dies scheint wie bei den anderen N-Quellen zu einem verbesserten Faserabbau beigetragen zu haben, der sich bei der Pro-Ergänzung in einem höheren ADF-Abbau im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung bemerkbar machte. In weiterer Folge führte dies zu einem Anstieg in der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP und in der EMPS für MS+Pro im Vergleich zu MS. Außer für MS+Pro wurde für alle N-Ergänzungen ein niedrigeres Verhältnis von SAM zu LAM ermittelt im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung. Dies deutet auf eine Veränderung in der Zusammensetzung der mikrobiellen Masse hin.

Zusätzlich zur täglich gebildeten NH<sub>3</sub>-N-Menge im Effluenten wurde die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf gemessen, um mögliche zeitabhängige Unterschiede in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration zwischen den Behandlungen ermitteln zu können. Dabei entsprach, wie bereits zuvor festgestellt (Kapitel 4), die mittlere NH<sub>3</sub>-N-Konzentration, die in der Fermenterflüssigkeit gemessen wurde, der Höhe der NH<sub>3</sub>-N- Konzentration, die im Effluenten für alle Behandlungen ermittelt wurde. Bezüglich des Verlaufes in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration wiesen alle Behandlungen unmittelbar vor dem Wechsel des Futterbeutels die höchste Konzentration auf und zeigten danach einen Abfall, dem bei einigen Behandlungen wieder ein leichter Anstieg in der Konzentration folgte, jedoch nicht auf das Niveau zum Zeitpunkt 0 Stunden (Tabelle 17). Da im Rusitec bei jedem Fermenter nach 24 Stunden jeweils einer der beiden Futterbeutel gegen einen neuen Futterbeutel ausgetauscht wird, ist es fraglich warum sich die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit zum Zeitpunkt 24 Stunden von der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration zum Zeitpunkt 0 Stunden unterschied. Aufgrund der Ergebnisse der ersten Rusitec-Untersuchung zur NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit bei Inkubation einer MS und GS (Kapitel 4) kann ausgeschlossen werden, dass eine Anpassung an das System zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Auch Carro und Miller (1999) beschrieben ein ähnliches Muster in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration bei der Supplementierung von Protein, Peptiden, AS bzw. NH4Cl zu einer Faser-Ration. Dabei ermittelten Carro und Miller (1999) für die NH<sub>4</sub>Cl-Ergänzung zu allen Messzeitpunkten eine höhere NH<sub>3</sub>-N-Konzentration verglichen mit den gepoolten Amino-N-Quellen. Die AS-Ergänzung in der in vitro-Untersuchung von Carro und Miller (1999) unterschied sich wiederum zu allen Messzeitpunkten von der Peptid- und Protein-Supplementierung, die nicht voneinander verschieden waren. In der eigenen Untersuchung war dagegen das Niveau und der Verlauf der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit weitestgehend ähnlich zwischen MS+HS, MS+Pep und MS+AS. Außerdem war die NH3-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit für MS und MS+Pro in der Regel ähnlich. Die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration der GS-Behandlung lag über alle Messzeitpunkte verglichen mit den anderen Behandlungen in einem mittleren Bereich. Beim Vergleich der NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen im Zeitverlauf aus dem Rusitec mit denen, die im HFT bei Inkubation derselben MS und GS ermittelt wurden, zeigte sich eine ähnliche Rangierung wie im Rusitec. Allerdings unterscheiden sich die Kurvenverläufe deutlich voneinander. Dies ist zu erwarten gewesen, da der HFT ein geschlossenes System darstellt und sich die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration deshalb lediglich aus dem Abbau von Futterprotein und der Aufnahme und Freisetzung von NH<sub>3</sub>-N durch die Mikroorganismen im Pansensaft-Puffer-Gemisch ergibt. Genauer wurde dies bereits zuvor diskutiert (Kapitel 3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle N-Quellen zu einem Anstieg in der täglich gebildeten Menge an mikrobiellem XP und zu einer höheren EMPS verglichen mit MS ohne N-Ergänzung geführt haben. Dies ist unter anderem vermutlich auf eine größere Menge an abgebautem XP pro Tag bei allen MS-Behandlungen mit N-Supplementierung zurückzuführen

und bestätigt die Annahme einer unzureichenden N-Versorgung der Pansenmikroben durch MS in vitro. Außerdem wurde für die MS-Behandlungen mit N-Ergänzungen größtenteils ein Anstieg im Abbau der OM, der NfE und der Faserfraktionen ermittelt. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis dafür sein, dass den amylolytischen und cellulolytischen Mikroorganismen bei alleiniger Inkubation von MS nicht ausreichend N zur Verfügung stand. Allerdings resultierte die Ergänzung der MS mit Amino-N aus Pro, Pep oder AS nicht wie vermutet in einer höheren EMPS als für die HS-Ergänzung beobachtet. Außerdem konnte durch keine der N-Ergänzungen das Niveau der GS in der EMPS erreicht werden. Das hohe Niveau der GS in der EMPS scheint mit dem höheren Abbau der NfE und der Faserfraktionen zusammenzuhängen im Vergleich zu MS ohne N-Supplementierung. Zusätzlich könnte eine bessere Synchronisation des Kohlenhydrat- und XP-Abbaus bei GS im Vergleich zu MS für die höhere EMPS verantwortlich sein. Zumindest in situ scheint dies für den Abbau des XP und der Faserfraktionen der verwendeten MS und GS zuzutreffen (Abbildung 6). Zusätzlich wurde lediglich mit der HS- bzw. Pep-Supplementierung eine ähnliche N-Effizienz wie mit MS ohne N-Ergänzung erreicht. Aufgrund eines weitestgehend ähnlichen Verlaufs in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit kann ausgeschlossen werden, dass dies zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen hat.

Allgemein lässt sich sagen, dass differierende Ergebnisse verschiedener Untersuchungen unter anderem auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der inkubierten Rationen und damit auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Mikrobenpopulation zurückzuführen sein könnten. Bezüglich der N-Quellen könnten außerdem die Menge und die Zusammensetzung des Amino-N in den Rationen weitere Gründe für Unstimmigkeiten bezüglich des Einflusses von Amino-N darstellen (Kajikawa et al. 2007). Da die AS-Zusammensetzung des Pro, des Pep und der AS-Mischung in der eigenen Untersuchung jedoch ähnlich war (siehe Tabelle A2) und zusätzlich die zugesetzte N-Menge für alle N-Quellen identisch war, kann ausgeschlossen werden, dass dies einen Einfluss auf die eigenen Ergebnisse hatte.

## 6. Übergreifende Diskussion, Schlussfolgerungen und Ausblick

## 6.1 Fehlerdiskussion

In der folgenden Fehlerdiskussion sollen mögliche Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der in dieser Arbeit anhand der unterschiedlichen Methoden erfassten Daten diskutiert werden.

Zuerst ist zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Silagen für die *in situ-* und *in vitro-*Untersuchungen getrocknet werden mussten. Dies war erforderlich, um die Silagen anschließend für die Untersuchungen vermahlen zu können. Zur Trocknung der Silagen wurde eine relativ niedrige Temperatur von 40 °C gewählt, um eine Hitzeschädigung der Proben zu vermeiden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wärmeeinwirkung unterschiedliche Prozesse verursachte und dadurch zu einer negativen Veränderung des ursprünglichen Pflanzenmaterials geführt hat (Weißbach und Kuhla 1995). Dies könnte in weiterer Folge die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Abbaucharakteristika beeinflusst haben.

## Verdaulichkeitsbestimmungen

Die Bestimmung der Verdaulichkeit erfolgte in dieser Arbeit quantitativ. Hierbei ist das verlustfreie Sammeln des Kotes von essentieller Bedeutung, da Kot-Verluste zu einer Überschätzung der Verdaulichkeit führen würden. Zusätzlich muss eine Aufnahme des Kotes durch die Tiere verhindert werden. Des Weiteren ist es wichtig auch die Futteraufnahme der Tiere genau zu quantifizieren. In der eigenen Untersuchung waren die Hammel während der 7-tägigen Sammelperiode in Stoffwechselkäfigen aufgestallt, die mit einem Gitterrostboden ausgestattet waren. Die quantitative Sammlung des Kotes erfolgte mit Kotbeuteln, die mit Hilfe eines Geschirrs an den Tieren befestigt waren und täglich zweimal während der Fütterung geleert wurden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es in der eigenen Untersuchung zu Kot-Verlusten kam oder die Tiere ihren Kot aufnehmen konnten. Außerdem wurden während der gesamten Versuchsphase des Verdaulichkeitsversuches von allen Hammeln die vorgelegten Futterportionen restlos aufgefressen.

#### In situ-Inkubationen

Zur genaueren Charakterisierung der MS und GS, die in der zweiten Rusitec-Untersuchung verwendet wurden, wurde der ruminale Abbau der Nährstofffraktionen mit Hilfe der in situ-Methode bestimmt. Bekanntermaßen bestehen die Verluste zu Inkubationsbeginn, die ohne vorherige Inkubation der Beutel im Pansen durch Waschen ermittelt werden, aus wasserlöslichen Bestandteilen und wasserunlöslichen kleinen Partikeln (Südekum 2005). Dabei verlassen die wasserunlöslichen kleinen Partikel die Beutel ohne einen vorherigen mikrobiellen Abbau (Südekum 2005) und können dadurch zu einer Überschätzung des ruminalen Abbaus führen, wenn sie als löslich und sofort abgebaut angesehen werden (Hvelplund und Weisbjerg 2000). Die von Hvelplund und Weisbjerg (2000) beschriebene Methode zur Korrektur der individuellen Abbaudaten bzw. zur Korrektur der Abbaucharakteristika und des Effektiven Abbaus beruht auf der Annahme, dass die wasserunlöslichen kleinen Partikel ähnlich abgebaut werden wie die Partikel, die im Beutel verbleiben. Da diese Annahme und die daraus resultierende Korrektur vermutlich ebenfalls nicht der Realität entsprechen, wurde in dieser Arbeit auf eine Korrektur verzichtet und die Abbaudaten wurden wie gemessen verwendet. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass es zu einer Überschätzung des ruminalen Abbaus der Nährstofffraktionen kam. Außerdem gibt es laut Südekum (2005) neuere Ergebnisse, die die Hypothese in Frage stellen, dass wasserlösliche Bestandteile generell vollständig im Pansen abgebaut werden. Dies würde zusätzlich zu einer Überschätzung des ruminalen Abbaus beitragen. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass es vermutlich zu einer mikrobiellen Kontamination der Beutelrückstände kam. Zwar wurden die Beutel und die enthaltenen Beutelrückstände nach der Inkubation gewaschen, um Panseninhalt und anhaftende Mikroben zu entfernen, jedoch ist anzunehmen, dass nicht alle Mikroorganismen durch den Waschvorgang von den Beutelrückständen abgetrennt wurden (Hvelplund und Weisbjerg 2000, Südekum 2005). Da die Mikroorganismen einen hohen XP-Gehalt aufweisen, kann es dadurch vor allem zu einer Unterschätzung des XP-Abbaus kommen. Dies trifft besonders auf faserreiche Futtermittel mit niedrigem XP-Gehalt zu (Krawielitzki et al. 2006, Südekum 2005), wie auf die in der eigenen Untersuchung verwendete MS. Laut Krawielitzki et al. (2006) findet die bakterielle Kontamination schnell statt und beträgt bis zu 20 %/Stunde des Gesamt-N in den Beutelrückständen. Selbige Autoren ermittelten für Proben aus Maisganzpflanzen, dass das Verhältnis des bakteriellen N am Gesamt-N innerhalb von 24 bis 48 Stunden circa 100 % erreichte und dadurch nach länger andauernden Inkubationszeiten der gesamte N der Beutelrückstände bakteriellen Ursprung hatte. Die Mikroorganismen im Beutel hafteten in dieser Untersuchung an unabgebauten N-freien Rückständen, die hauptsächlich aus

Zellwandsubstanzen bestanden (Krawielitzki et al. 2006). Aus diesen Gründen könnte vor allem für MS der ruminale XP-Abbau bei der *in situ*-Inkubation der eigenen Untersuchung unterschätzt worden sein. Dies könnte eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Rusitec darstellen, die mit derselben MS und GS ermittelt wurden. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass es bezüglich des ruminalen Abbaus der Faserfraktionen der MS, wie es bereits in Kapitel 5.3 diskutiert wurde, vermutlich zu einer Überschätzung kam, da zum Zeitpunkt der maximalen Inkubationszeit von 96 Stunden für MS das Plateau des Abbaus noch nicht erreicht zu sein scheint.

#### In vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest

Beim HFT, der zur Ermittlung der Gasbildungskinetik verwendete wurde, stellen die Brutschränke einen möglichen Einflussfaktor auf die ermittelten Ergebnisse dar. So wurden während beider Inkubationen im HFT teilweise niedrigere oder höhere Temperaturen (30 °C bis 44 °C) als die angestrebten 39 °C in den verwendeten Brutschränken gemessen. Hierbei haben besonders zu hohe Temperaturen einen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse, da diese zu einer irreversiblen Denaturierung der Mikroorganismenproteine im Pansensaft-Puffer-Gemisch führen. Deshalb wurden alle Kolbenprober aus der Auswertung ausgeschlossen, die in Brutschränken inkubiert wurden, deren Temperatur nicht 39 °C entsprach. Zusätzlich wurden diejenigen Kolbenprober nicht in die Auswertung zur Gasbildungskinetik einbezogen, die erkennbar undicht waren.

### **Rusitec**

Die Pansensimulation Rusitec weist im Gegensatz zu reinen Batch-Kulturen, wie zum Beispiel dem HFT, einen wesentlich komplexeren Aufbau auf, der es ermöglicht, dass Inkubationen über einen deutlich längeren Zeitraum durchgeführt werden können und unterschiedliche Kenngrößen der Fermentation bestimmt werden können. Allerdings bringt der komplexere Aufbau auch eine größere Störanfälligkeit mit sich, welche sich in beiden Rusitec-Untersuchungen zeigte. So war die Förderung der Pufferlösung teilweise kurzzeitig gestört aufgrund von Problemen mit der Peristaltik-Pumpe oder aufgrund von Undichtigkeiten im Zufluss der Pufferlösung. Außerdem traten teilweise auch Undichtigkeiten zwischen den Fermentern und den Glasflaschen zum Auffangen der Effluenten und den Gasbeuteln auf.

#### Kapitel 6

Aufgrund der engmaschigen Betreuung des Pansen-Simulationssystems konnten solche Störungen jedoch in der Regel rasch behoben werden. Außerdem ereigneten sich diese häufig zu Beginn der Inkubation und hatten somit wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Ergebnisse, die in der Versuchsphase von Tage 7–12 ermittelt wurden. Kam es innerhalb der Versuchsphase zu Problemen, so gingen die an dem entsprechenden Tag gewonnenen Proben nicht in die Poolproben des jeweiligen Fermenters ein, ebenso wie die an diesem Tag gewonnenen Daten nicht in die Berechnungen einflossen. Trotzdem kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Störungen des Pansen-Simulationssystems unentdeckt blieben. Zusätzlich wurden alle Behandlungen auf die beiden Wasserbäder und die insgesamt 12 Plätze innerhalb der beiden Wasserbäder randomisiert, um einen Einfluss des Fermenters oder des Wasserbades ausschließen zu können.

Zur Bestimmung der EMPS und der N-Effizienz wurde die Menge an mikrobiellem N herangezogen. Jedoch kann laut Bach et al. (2005) die Bestimmung der Menge an mikrobiellem N anstelle der Menge an AS-N in den bakteriellen Zellen möglicherweise die Ergebnisse bezüglich der EMPS und der N-Effizienz beeinflussen. Denn wie von Bach et al. (2005) zusammengefasst wurde, wird davon ausgegangen, dass 80 % des mikrobiellen N in Form von AS vorliegt. Dagegen verändert sich die relative Zusammensetzung der Mikroorganismen abhängig von der Wachstumsrate und der Verfügbarkeit von Energie und N (Bach et al. 2005). So wurden in früheren Untersuchungen niedrigere N-Konzentrationen in Bakterien ermittelt, die aus dem Pansen von Kühen stammten, die eine schnell fermentierbare Ration erhielten, im Vergleich zu Bakterien aus dem Pansen von Kühen, die eine langsam fermentierbare Ration erhielten (Bach et al. 2005). Dies könnte bedeuten, dass aufgrund der hohen Gehalte an schnell fermentierbarer Stärke der verwendeten MS für die MS-Behandlungen möglicherweise niedrigere N-Konzentrationen in den Mikrobenfraktionen analysiert wurden als in den Mikrobenfraktionen der GS-Behandlungen. Dies würde wiederum bedeuten, dass die MPS und die EMPS für die MS-Behandlungen aus der eigenen Untersuchung und aus früheren Untersuchungen (Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c) möglicherweise unterschätzt wurden.

## 6.2 Mikrobielle Proteinsynthese

In beiden in dieser Arbeit durchgeführten Rusitec-Untersuchungen wurde eine größere Menge an mikrobiellem XP und eine höhere EMPS bei Inkubation von GS als bei Inkubation von MS ermittelt. Wie bereits zuvor diskutiert (Kapitel 4.3 und Kapitel 5.3) stützt dies die Ergebnisse früherer in vitro-Untersuchungen und könnte auf das Fehlen des ruminohepatischen Kreislaufs in vitro zurückzuführen sein (Hildebrand et al. 2011b, Hildebrand et al. 2011c). Da dies bei der alleinigen Inkubation von MS zu einem N-Mangel führen könnte und dadurch die Fermentation der MS und damit einhergehend die Menge an mikrobiellem XP und die EMPS im Vergleich zu GS beeinträchtigen könnte (Hildebrand et al. 2011c). Diese Hypothese wurde von Hildebrand et al. (2011c) bereits untersucht, indem MS mit Harnstoff supplementiert wurde, um die gleiche N-Zufuhr wie über GS zu gewährleisten. Dabei ermittelten selbige Autoren, dass obwohl die zur Verfügung stehende N-Menge bei Harnstoff-Supplementierung am höchsten war, diese lediglich zu einer Verbesserung der gebildeten Menge an mikrobiellem XP und der EMPS führte, jedoch nicht zu einer Angleichung an das Niveau der GS. Wie bereits zuvor diskutiert (Kapitel 5.3) konnte auch in der eigenen Untersuchung (Kapitel 5) die Annahme einer unzureichenden N-Versorgung der Pansenmikroben bei der alleinigen Inkubation von MS in vitro bestätigt werden, da alle N-Supplementierungen zu einem Anstieg in der gebildeten Menge an mikrobiellem XP und der EMPS verglichen mit der unsupplementierten MS führten. Allerdings konnte durch keine der N-Ergänzungen das Niveau der GS in der EMPS erreicht werden. Außerdem führte die Supplementierung der MS mit Amino-N aus Pro, Pep oder AS nicht wie zuvor vermutet zu einer höheren EMPS als für die HS-Ergänzung ermittelt. Im Folgenden sollen weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Menge an mikrobiellem XP und die EMPS diskutiert werden, da die N-Supplementierung zu MS nicht die alleinige Lösung zur Angleichung der EMPS an das Niveau der GS zu sein scheint.

In den beiden eigenen Rusitec-Untersuchungen war der Abbau der OM, der NfE und der Faserfraktionen bei der alleinigen Inkubation von MS teilweise deutlich niedriger als bei Inkubation von GS. Außerdem wurden in der zweiten Rusitec-Untersuchung für die MS-Behandlungen mit N-Ergänzung teilweise Anstiege im Abbau der OM, der NfE und der Detergenzien-Fasern beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass den amylolytischen und cellulolytischen Mikroorganismen bei der alleinigen Inkubation von MS nicht ausreichend N zur Verfügung stand. Somit scheint die deutlich höhere EMPS bei Inkubation von GS im Vergleich zur unsupplementierten MS nicht nur mit einer besseren N-Versorgung der Mikroorganismen zusammenzuhängen, sondern zusätzlich mit einem höheren Abbau der NfE und der Faserfraktionen. Denn wie Bach et al. (2005) zusammenfassten gibt es Hinweise dafür, dass der XP-Abbau nicht nur von der Wirkung proteolytischer Enzyme abhängt, sondern auch von der Wirkung anderer Enzyme. So kann Stärke den XP-Abbau beeinträchtigen und es gibt Untersuchungen, die eine positive Wirkung von Amylasen auf den XP-Abbau zeigten (Bach et al. 2005). Außerdem sind viele Pflanzenproteine in einer Fasermatrix eingeschlossen, die zunächst abgebaut werden muss, bevor die Proteine für Proteasen zugänglich sind (Bach et al. 2005). Dies könnte bedeuten, dass bei Inkubation von MS aufgrund der hohen Stärkegehalte der MS und des deutlich niedrigeren Abbaus der Faserfraktionen der XP-Abbau möglicherweise beeinträchtigt wurde. In den eigenen Rusitec-Untersuchungen wurde sowohl ein ähnlicher XP-Abbau zwischen MS und GS (Kapitel 4.2) beobachtet als auch ein höherer XP-Abbau für MS im Vergleich zu GS (Kapitel 5.2.4). Dennoch könnte der XP-Abbau der verwendeten MS beeinträchtigt gewesen sein und könnte sich aufgrund der niedrigen XP-Gehalte der beiden MS drastisch auf die Menge an mikrobiellem XP und die EMPS ausgewirkt haben. Jedoch war bei MS+HS, MS+Pep und MS+AS mit 1,4 g/Tag, 1,2 g/Tag und 1,2 g/Tag die abgebaute XP-Menge größer als bei GS mit 1,0 g/Tag (nicht statistisch abgesichert) und resultierte dennoch nicht in einer ähnlichen oder höheren EMPS. Der Grund hierfür könnte sein, dass bei Inkubation von GS die Freisetzung von Faser-gebundenem XP während des Abbaus der Faserfraktionen zu einer synchroneren Versorgung der Mikroorganismen mit Energie und N beigetragen hat als bei der Supplementierung externer N-Quellen zu MS. Allerdings muss erwähnt werden, dass der Verlauf der NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit weitestgehend ähnlich war zwischen den Behandlungen. Eine bessere Synchronisation des Kohlenhydrat- und XP-Abbaus der GS im Vergleich zur unsupplementierten MS wurde bereits zuvor (Kapitel 5.3) als mögliche Begründung für die höhere EMPS bei Inkubation von GS im Vergleich zur unsupplementierten MS aufgrund des für beide Silagen ermittelten in situ-Abbaus diskutiert.

Des Weiteren ist bekannt, dass Protozoen als wichtigste Proteinquelle Bakterien aufnehmen (Jouany 1996, Newbold et al. 2015). Deshalb könnten auch Protozoen die Menge an mikrobiellem XP beeinflussen und dadurch zu einer Abnahme der scheinbaren EMPS führen (Dewhurst et al. 2000). Der Zusammenhang ist darin zu sehen, dass durch eine Defaunierung, also eine Eliminierung der Protozoen im Pansen, der ruminale N-Stoffwechsel verbessert wird, indem die bakterielle Biomasse im Pansen und der Fluss an bakteriellem N aus dem Pansen gesteigert werden (Koenig et al. 2000). Dies trägt wiederum zu einer besseren EMPS bei. Zusätzlich kann sich eine Defaunierung durch einen niedrigeren Abbau der OM im Pansen positiv auf die EMPS auswirken (Jouany 1996, Newbold et al. 2015). Dabei geht der niedrigere OM-Abbau im Zusammenhang mit einer Defaunierung mit einem niedrigeren Faserabbau einher, der vermutlich aus dem Verlust der Faser-abbauenden Aktivität der Protozoen resultiert (Newbold et al. 2015). Außerdem sind laut Hackmann und Firkins (2015) Protozoen die vorherrschende Mikroorganismengruppe, die Reservekohlenhydrate ansammeln, wobei die Akkumulierung und Mobilisierung von Reservekohlenhydraten ATP verbrauchen und so die EMPS verringern kann. In der ersten Rusitec-Untersuchung dieser Arbeit wurde von Lengowski et al. (2016) bei Inkubation von MS und GS innerhalb der ersten 48 Stunden nach Start der Inkubation ein deutlicher Rückgang in der Zahl der Protozoen sowohl in der Fermenterflüssigkeit als auch in den Futterresten ermittelt. Allerdings war die Zahl der Protozoen in der Fermenterflüssigkeit und den Futterresten nicht verschieden zwischen MS und GS (Lengowski et al. 2016). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die in der ersten Rusitec-Untersuchung dieser Arbeit ermittelten Unterschiede im Abbau der OM und der Faserfraktionen sowie in der Menge an mikrobiellem XP und damit der EMPS zwischen MS und GS durch die Zahl der Protozoen beeinflusst wurden. Jedoch war in der zweiten Rusitec-Untersuchung dieser Arbeit die Zahl der Protozoen bei Inkubation der unsupplementierten MS signifikant höher als bei Inkubation von GS (Witzig et al., eingereicht). Zusätzlich führte die Supplementierung aller N-Quellen zu MS zu einem Rückgang in der Zahl der Protozoen verglichen mit der unsupplementierten MS (Witzig et al., eingereicht). Da GS und die MS-Behandlungen mit N-Ergänzung gleichzeitig eine größere EMPS zeigten als die unsupplementierte MS, ermittelten Witzig et al. (eingereicht) eine negative Korrelation zwischen der Zahl der Protozoen und der EMPS. Dabei kann in der zweiten Rusitec-Untersuchung die höhere EMPS im Zusammenhang mit einer niedrigeren Protozoen-Zahl in den Fermentern lediglich auf die größere Menge an mikrobiellem XP zurückgeführt werden und nicht wie zuvor beschrieben auf einen niedrigeren Abbau der OM und der Faserfraktionen. Zusätzlich haben Protozoen laut Newbold et al. (2015) einen negativen Einfluss auf die Energie-Effizienz des ruminalen Ökosystems, da deren Generationszeit deutlich länger ist als die von Bakterien und dadurch der Erhaltungsbedarf höher ist. Außerdem besteht bei der alleinigen Inkubation von MS in vitro auf Grund des N-Mangels ein Überschuss an Kohlenhydraten, der nicht nur dazu führen könnte, dass die Mikroorganismen das überschüssige ATP aus den katabolen Prozessen verschwenden (Russell 1998, Russell 2007), sondern auch, dass vor allem Protozoen Reservekohlenhydrate akkumulieren (Hackmann und Firkins 2015). Da beide Vorgänge ATP aufbrauchen, resultieren sie in einer Verringerung der EMPS (Hackmann und Firkins 2015).

Iso-SCFA ist der Überbegriff für die SCFA Isobutyrat, 2-Methylbutyrat, Isovalerat und Valerat, die im Pansen hauptsächlich aus dem Abbau bestimmter AS stammen (Andries et al. 1987). Im

Pansen spielen sie ihrerseits eine wichtige Rolle, da sie vorwiegend von cellulolytischen, aber auch von nicht-cellulolytischen Bakterien, als Kohlenstoffgerüste unter anderem für die Biosynthese von AS verwendet werden (Andries et al. 1987). Aufgrund dessen könnten iso-SCFA die MPS im Pansen beeinträchtigen, wenn Futtermittel verwendet werden, die einen niedrigen XP-Gehalt aufweisen oder die reich an Nicht-Protein-N sind (Andries et al. 1987, Felix et al. 1980). Die deutlich niedrigeren XP-Gehalte der MS im Vergleich zu den GS, die in den beiden Rusitec-Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurden, könnten somit zu einem Mangel an iso-SCFA geführt haben und in weiterer Folge die MPS und die EMPS beeinträchtigt haben. So führte der niedrigere XP-Gehalt der MS in beiden Rusitec-Untersuchungen nicht nur zu einer niedrigeren Menge an NH<sub>3</sub>-N, sondern zusätzlich zu einer niedrigeren Menge an Isobutyrat. Die Menge an Isovalerat und Valerat war jedoch nicht verschieden zwischen MS und GS in den beiden Rusitec-Untersuchungen dieser Arbeit. Da HS als Nicht-Protein-N-Quelle keine verzweigtkettigen AS liefert, kann eine HS-Ergänzung einen Mangel an iso-SCFA nicht ausgleichen. Dies bestätigte sich in der zweiten Rusitec-Untersuchung dieser Arbeit in der unveränderten Menge an Isobutyrat, Isovalerat und Valerat im Vergleich zur unsupplementierten MS. Dagegen führten die Ergänzungen von Pep und AS zu MS zu einem Anstieg in der Menge an iso-SCFA. Dies könnte unter anderem zu der größeren Menge an mikrobiellem XP und der höheren EMPS beigetragen haben, die für MS+Pep und MS+AS im Vergleich zu MS beobachtet wurde. Außerdem ist bekannt, dass sich iso-SCFA in vitro positiv auf den Abbau von Cellulose und Hemicellulose auswirken (Andries et al. 1987, Gorosito et al. 1985). Somit könnte der für MS+Pep und MS+AS beobachtete Anstieg im Abbau der Detergenzien-Fasern im Vergleich zur unsupplementierten MS nicht nur auf eine bessere Versorgung der cellulolytischen Mikroorganismen mit N, sondern auch mit iso-SCFA zurückzuführen sein. Allerdings ist zu erwähnen, dass der Anstieg im Abbau der Detergenzien-Fasern für MS+AS im Vergleich zu MS ohne N-Ergänzung nur numerisch war. Folglich könnte neben anderen Aspekten ein Mangel an iso-SCFA bei Inkubation von MS zu einer suboptimalen Fermentation beigetragen haben. HS führte als Nicht-Protein-N-Quelle zu keiner Steigerung in der Menge an iso-SCFA im Vergleich zur unsupplementierten MS. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die alleinige HS-Supplementierung zu MS zu keiner Angleichung der EMPS an das Niveau der GS führte. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass iso-SCFA die N-Nutzung aus HS verbessern, besonders wenn der XP-Gehalt in der Ration niedrig ist (Felix et al. 1980).

## 6.3 Mögliche Einschränkungen im Vergleich zwischen *in vivo*-Untersuchungen und dem Rusitec

Bei der Verwendung von in vitro-Verfahren wie dem Rusitec zur Bestimmung der Kenngrößen der Fermentation und der MPS sollen die Bedingungen, die im Pansen herrschen, und die Fermentationsvorgänge möglichst genau nachgestellt werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das verwendete in vitro-System Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse nimmt. Routinemäßig müssen bei einer Inkubation im Rusitec alle Fermenter einmal am Tag geöffnet werden, um jeweils einen der beiden Futterbeutel zu wechseln. Dabei kommt es zu einem Sauerstoffeintrag in das System. Da die Bedingungen im Pansen normalerweise vollständig anaerob sind, ist davon auszugehen, dass die Mikroorganismen in den Fermentern dadurch einem "Sauerstoffstress" ausgesetzt werden (Gizzi et al. 1998). Dies könnte zu einer selektiven Eliminierung einzelner Mikrobenspezies oder –gruppen führen, welche strikt anaerob sind, und hätte zur Folge, dass sich die Zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft verändert und nicht mehr der ursprünglichen Zusammensetzung entspricht. Dies könnte in weiterer Folge die Fermentation und die MPS beeinflussen. Während der ersten Rusitec-Untersuchung wurden alle Fermenter zusätzlich zum Wechseln der Futterbeutel innerhalb von zwei Perioden mehrfach zur Entnahme von Fermenterflüssigkeit vollständig geöffnet (Kapitel 4.1.3). Dabei wurde innerhalb von Periode 1 für alle Behandlungen ein Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit ermittelt, der auf eine erhöhte Lyse der Gesamtbakterien und Methanogene in der Fermenterflüssigkeit, sowie der Protozoen aus Fermenterflüssigkeit und Futterrest zurückzuführen sein könnte. Denn Lengowski et al. (2016) beobachteten zeitgleich eine erhebliche Reduktion ihrer Anzahl. Jedoch blieben innerhalb von Periode 2 die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit bei beiden Silagen auf einem relativ gleichbleibenden Niveau und auch Lengowski et al. (2016) schlossen anhand ihrer Ergebnisse, dass auf Ebene der Domäne 48 Stunden nach Start der Inkubation eine stabile Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter den beschriebenen Bedingungen der Inkubation erreicht zu sein scheint. Dies könnte darauf hinweisen, dass der beobachtete Anstieg in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration und die zeitgleich stattfindende Reduktion in der Zahl der oben genannten Mikroorganismen in Periode 1 vermutlich weniger mit der Sauerstoffexposition zusammenhängt und einen anderen Hintergrund hat. Im Gegensatz zur ersten Rusitec-Untersuchung wurden in der zweiten Rusitec-Untersuchung die Fermenter lediglich innerhalb einer Periode beprobt, die ab Tag 12 mit dem Wechsel der Futterbeutel begann. Da hierbei alle Probennahmen aus der Fermenterflüssigkeit, die nicht gleichzeitig mit dem Wechsel der Futterbeutel stattfanden, über eine kleine Probennahmeöffnung im Deckel der Fermenter erfolgten, kann davon ausgegangen werden, dass die Sauerstoffexposition für die Mikroorganismen deutlich reduziert war. Außerdem ist zu erwähnen, dass beim Rusitec das Befüllen der Fermenter mit dem Pansensaft-Puffer-Gemisch nicht unter CO<sub>2</sub>-Begasung stattfindet wie es während des Befüllens der Kolbenprober beim HFT üblich ist (Methode 25.1, VDLUFA 1976). Auch dies könnte gleich zu Beginn der Inkubation einen "Sauerstoffstress" für die Mikroorganismen darstellen.

Zusätzlich zur Sauerstoffexposition könnte auch die Verweildauer der flüssigen und festen Phase in den Fermentern einen Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft gehabt haben. Zwar wird im Rusitec eine unterschiedliche Verweildauer der flüssigen und festen Phase durch die Inkubation des Substrates in Futterbeuteln verwirklicht, jedoch entspricht dies vermutlich dennoch nicht den natürlichen Gegebenheiten im Pansen. So ist beim Rusitec für die feste Phase die Verweildauer auf 48 Stunden festgesetzt, unabhängig vom Abbauverhalten unterschiedlicher Futtermittel. Dies könnte die Ergebnisse des Abbaus der Nährstofffraktionen im Rusitec beeinflussen.

Außerdem deuten die Ergebnisse von Carro et al. (1995) darauf hin, dass die Porengröße der im Rusitec verwendeten Nylonbeutel neben dem Verschwinden des Substrates aus den Nylonbeuteln auch die mikrobielle Population und damit die Fermentation im Rusitec beeinflussen könnte. Allerdings wurde in selbiger Untersuchung die *in vivo*-Fermentation von Raufutter-reichen Rationen relativ genau simuliert, wenn Nylonbeuteln mit einer Porengröße von 100 µm verwendet wurden.

Da im Rusitec die Absorption von Stoffwechselendprodukten nicht simuliert werden kann, muss durch eine ausreichend hohe Flussrate der Pufferlösung gewährleistet werden, dass sich diese nicht akkumulieren. Jedoch kann eine hohe Flussrate der Pufferlösung dazu beitragen, dass langsam wachsende Mikroorganismen, wie zum Beispiel Protozoen und cellulolytische Mikroorganismen, aus den Fermentern ausgewaschen werden (Mansfield et al. 1995, Muetzel et al. 2009, NRC 2001). Der Grund hierfür ist, dass bei einer hohen Flussrate der Pufferlösung die Verweildauer der Mikroorganismen in den Fermentern kürzer ist als deren Generationszeit (Hoover et al. 1976). Dies könnte eine Erklärung für den deutlichen Abfall in der Zahl der Protozoen darstellen, der von Lengowski et al. (2016) für die erste Rusitec-Untersuchung zu Beginn der Inkubation ermittelt wurde.

Des Weiteren könnte die fehlende Simulation der Nährstoffrezyklierung im Rusitec (ruminohepatischer Stickstoffkreislauf, endogener Phosphatkreislauf) eine Begründung für

Unterschiede in der Fermentation im Vergleich zu *in vivo*-Untersuchungen darstellen. Die fehlende N-Rezyklierung kann sich dabei besonders bei der Inkubation von Futtermitteln mit einem niedrigen XP-Gehalt, wie MS, negativ auf die Fermentation auswirken, da es ohne N-Ergänzung zu einem N-Mangel kommt.

Außerdem werden bei Silagen die Kohlenhydrate während der Silierung bereits teilweise durch Bakterien zu Fermentationsprodukten wie Milchsäure und Ethanol abgebaut (Tamminga et al. 2007). Es wird davon ausgegangen, dass diese Fermentationsprodukte noch 50 % der Energie enthalten, die im Pansen aus den ursprünglichen Kohlenhydraten gewonnen werden könnte (Tamminga et al. 2007). Da diese organischen Verbindungen in den Silagen allerdings flüchtig sind, verdampft beim Trocknen nicht nur das Wasser, sondern auch diese organischen Verbindungen (Weißbach und Kuhla 1995). Außerdem kann die Wärmeeinwirkung während des Trocknens, wie bereits zuvor erwähnt, unterschiedliche Prozesse verursachen und dadurch zu einer negativen Veränderung des ursprünglichen Pflanzenmaterials führen (Weißbach und Kuhla 1995). Für die eigene Untersuchung ist eine negative Veränderung des ursprünglichen Pflanzenmaterials durch die Trocknung allerdings spekulativ und eher unwahrscheinlich auf Grund der Temperaturverhältnisse während der Trocknung der verwendeten Silagen. Grundsätzlich kann dies in der Summe jedoch dazu führen, dass sich getrocknete Silagen in ihrer Nährstoffzusammensetzung, dem Abbauverhalten der Nährstofffraktionen und der zur Verfügung stehenden Energie deutlich von frischen Silagen unterscheiden können. Deshalb könnte auch die Verwendung von frischen Silagen in vivo im Vergleich zu getrockneten Silagen in vitro einen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse haben.

## 6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Inkubation unterschiedlicher Chargen von MS, GS und LS im HFT zeigte, dass sich die Variation in der Nährstoffzusammensetzung der verwendeten Chargen in einer deutlichen Variation der im HFT ermittelten Gasbildungskinetik und der Kurvenverläufe der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch sowohl zwischen Chargen innerhalb einer Silageart als auch zwischen unterschiedlichen Silagearten widerspiegelt. Aus diesen Gründen ist die Übertragbarkeit der eigenen Ergebnisse auf andere Silagechargen begrenzt.

Die Rangierung der Chargen innerhalb einer Silageart anhand ihres Niveaus in der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch im HFT stimmt überwiegend mit der Rangierung überein, die anhand des XP-Gehaltes zu erwarten gewesen wäre. Allerdings lassen sich anhand der im HFT im Pansensaft-Puffer-Gemisch ermittelten Kurvenverläufe der NH<sub>3</sub>-N- Konzentration keine Rückschlüsse auf die Kurvenverläufe der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Rusitec derselben Silagechargen ziehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass bei der alleinigen Inkubation von MS und GS im Rusitec die durch die Inkubation von GS zur Verfügung stehenden Nährstoffe die MPS und die EMPS stärker fördern als die durch die Inkubation von MS zur Verfügung stehenden Nährstoffe.

Im Rusitec scheint die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit bei der alleinigen Inkubation von MS und GS nach einer Anpassungsphase, die länger als 48 Stunden andauern sollte, auf einem gleichbleibenden Niveau zu sein, welches im Mittel der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Effluenten entspricht.

Der für die MS-Behandlungen mit N-Ergänzung teilweise beobachtete Anstieg im Abbau der OM, der NfE und der Faserfraktionen deutet darauf hin, dass den amylolytischen und cellulolytischen Mikroorganismen bei der alleinigen Inkubation von MS nicht ausreichend N zur Verfügung stand.

Die Supplementierung von MS mit unterschiedlichen N-Quellen resultierte in einem Anstieg in der Menge an mikrobiellem XP und in der EMPS verglichen mit MS ohne N-Ergänzung. Dies bestätigt die Annahme einer unzureichenden N-Versorgung der Pansenmikroben bei der alleinigen Inkubation von MS *in vitro*. Allerdings konnte durch keine der N-Ergänzungen das Niveau der GS in der EMPS erreicht werden.

Zukünftige Untersuchungen sollten den Einfluss einer Synchronisation des Kohlenhydrat- und XP-Angebots, die Kombination unterschiedlicher N-Quellen sowie die Ergänzung von iso-SCFA auf die MPS im Rusitec untersuchen. Zusätzlich könnte die Bestimmung des AS-N anstelle des gesamten N in den bakteriellen Zellen zur Ermittlung der MPS aufgrund einer größeren Genauigkeit von Vorteil sein.
#### 7. Zusammenfassung

Für Wiederkäuer stellt das mikrobielle Rohprotein eine wichtige Proteinquelle dar, weil ein großer Teil des am Darm anflutenden Rohproteins mikrobiellen Ursprung hat und im Pansen synthetisiert wurde. Aufgrund dessen ist die mikrobielle Proteinsynthese (MPS) und deren Effizienz (EMPS) von zentraler Bedeutung in der Ernährung von Wiederkäuern. Silagen, vor allem Maissilage und Grassilage, werden häufig als Grobfuttermittel in Rationen für Wiederkäuer eingesetzt. Allerdings unterscheiden sich verschiedene Silagearten in ihrer Nährstoffzusammensetzung und im Abbauverhalte ihrer Nährstofffraktionen im Pansen. Auch innerhalb einer Silageart können beträchtliche Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen bestehen. Dies beeinflusst das Angebot und die Verfügbarkeit an Energie und Rohprotein (XP) für die mikrobielle Gemeinschaft des Pansens und dadurch deren Fermentations- und Syntheseleistung.

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurden fünf Chargen Maissilage, fünf Chargen Grassilage und drei Chargen Luzernesilage im Hohenheimer Futterwerttest inkubiert, um die Variation der Silagen anhand ihrer *in vitro*-Gasbildungkinetik sowie ihrer Ammoniak-Stickstoff-Konzentration (NH<sub>3</sub>-N-Konzentration) im Pansensaft-Puffer-Gemisch im Zeitverlauf zu bestimmen. Hierfür wurden pro Durchgang 10 Kolbenprober pro Silagecharge eingesetzt. Für jeweils 3 der insgesamt 10 Kolbenprober wurde das Gasvolumen über 72 Stunden ermittelt (n = 24). Die übrigen 7 Kolbenprober wurden nacheinander zu 7 Zeitpunkten aus dem Brutschrank entnommen und es wurde die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N im Pansensaft-Puffer-Gemisch bestimmt (n = 8 pro Zeitpunkt).

Bei der Inkubation der 13 Silagen hatte sowohl die Silageart als auch die Charge einen Einfluss auf die potenzielle Gasbildung und auf die Gasbildungsrate. Die ermittelte potenzielle Gasbildung lag zwischen 62,5–74,2, 56,0–64,9 und 39,9–59,6 mL/200 mg organische Masse (OM) für die Mais-, Gras- und Luzernesilagen. Die Gasbildungsrate betrug 5,5–7,3, 3,8–7,1 und 5,0–7,7 %/h für die Mais-, Gras- und Luzernesilagen. Auf die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch hatte sowohl die Silageart als auch die Charge und der Zeitpunkt sowie deren Wechselwirkungen einen Einfluss.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Maissilage und eine Grassilage in dem semikontinuierlichen Pansen-Simulationssystem Rusitec inkubiert, um den Einfluss der Grobfutterquelle ohne eine Konzentrat-Ergänzung sowohl auf die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf als auch auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* zu untersuchen. Hierfür wurden 5 Inkubationsdurchgänge durchgeführt, die jeweils 13 Tage dauerten. Einmal täglich wurde dem System ein Nylonbeutel mit 15 g der entsprechenden Silage zugeführt und jeweils 48 Stunden inkubiert. Die kontinuierlich infundierte Pufferlösung enthielt <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. Es wurden der Abbau der Nährstoffe, die Gas- und Methanproduktion, die Menge an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und an NH<sub>3</sub>-N im Effluenten und die MPS ermittelt. Die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf wurde innerhalb von zwei Perioden (Periode 1: 0, 2, 4, 12, 24 und 48 Stunden nach Start der Inkubation; Periode 2: 0, 2, 4, 12 und 24 Stunden nach dem Wechsel des Futterbeutels an Tag 12) bestimmt. Während Periode 1 wurde zusätzlich die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit im Zeitverlauf für einen Blindwert ermittelt.

Bei Inkubation von Grassilage war der Abbau der OM und der Faserfraktionen, die Menge an NH<sub>3</sub>-N im Effluenten, sowie die MPS und die EMPS höher als bei Inkubation von Maissilage. Der XP-Abbau und die Gesamtmenge an SCFA waren durch die Silage nicht beeinflusst. Die N-Effizienz war bei Inkubation von Maissilage höher als bei Inkubation von Grassilage. Während Periode 1 stieg die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der Fermenterflüssigkeit bei allen drei Behandlungen innerhalb der ersten 24 Stunden an und unterschied sich nicht zwischen den Behandlungen. Für Grassilage stieg die NH<sub>3</sub>-N-Konzentration danach bis zu einem Maximalwert zum letzten Messzeitpunkt in Periode 1 weiter an. In Periode 2 blieben die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen in der Fermenterflüssigkeit für Mais- und Grassilage auf einem relativ gleichbleibenden Niveau, die sich an allen fünf Messzeitpunkten zwischen beiden Silagen unterschieden. Die in Periode 2 in der Fermenterflüssigkeit gemessene mittlere Konzentration an NH<sub>3</sub>-N entsprach im Niveau der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration, die im Effluenten der beiden Silagen ermittelt wurde.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher N-Ergänzungen zu Maissilage im Vergleich zu Grassilage auf die Fermentations- und Syntheseleistung der mikrobiellen Gemeinschaft des Pansens *in vitro* untersucht. Hierfür wurden Gras- und Maissilage im Rusitec inkubiert, letztere entweder unsupplementiert oder supplementiert mit Harnstoff, Erbsenprotein, Erbsenpepton oder einer Aminosäuren-Mischung, um den N-Gehalt an den der Grassilage anzupassen. Insgesamt wurden 5 Inkubationsdurchgänge durchgeführt, dabei war das wesentliche Vorgehen wie für die erste Rusitec-Untersuchung beschrieben. Die N-Quellen wurden über die Nylonbeutel appliziert. Die Konzentration an NH<sub>3</sub>-N in der

Fermenterflüssigkeit wurde 0, 2, 4, 12 und 24 Stunden nach dem Wechsel des Futterbeutels an Tag 12 bestimmt.

Die Ergebnisse bezüglich des Abbaus der OM, des XP und der N-freien Extraktstoffe zeigten einen positiven Einfluss der N-Ergänzungen mit Ausnahme für Maissilage+Erbsenprotein. Zusätzlich wurde der Abbau der Detergenzien-Fasern durch die N-Ergänzungen teilweise verbessert. Die MPS und die EMPS wurden durch alle N-Ergänzungen verbessert. Dabei resultierten die Harnstoff- und Erbsenpepton-Supplementierungen zu Maissilage in der größten Steigerung der EMPS. Jedoch konnte durch keine N-Ergänzung das Niveau der Grassilage in der EMPS erreicht werden. Der ermittelte Verlauf der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration in der Fermenterflüssigkeit war weitestgehend ähnlich zwischen den Behandlungen.

Die in der zweiten Rusitec-Untersuchung verwendeten Silagen wurden zusätzlich sowohl auf ihre Gehalte an Gärsäuren, Alkohole und NH<sub>3</sub> analysiert als auch über Verdaulichkeitsbestimmungen, *in situ*-Inkubationen sowie in vitro-Inkubationen im Hohenheimer Futterwerttest detailliert charakterisiert.

Die Variation in der Nährstoffzusammensetzung von Mais-, Gras- und Luzernesilagen spiegelte sich in einer großen Variation sowohl in der Gasbildungskinetik als auch im Kurvenverlauf der NH<sub>3</sub>-N-Konzentration im Pansensaft-Puffer-Gemisch wider. Bei der alleinigen Inkubation von Mais- und Grassilage im Rusitec wurde durch Grassilage die MPS und EMPS stärker gefördert als durch Maissilage. Die Supplementierung von Maissilage mit unterschiedlichen N-Quellen resultierte in einem Anstieg der MPS und der EMPS verglichen mit Maissilage ohne N-Ergänzung und bestätigt damit die Annahme einer unzureichenden N-Versorgung der Pansenmikroben bei der alleinigen Inkubation von Maissilage *in vitro*. Allerdings konnte durch keine der N-Ergänzungen das Niveau der Grassilage in der EMPS erreicht werden.

#### 8. Summary

Microbial crude protein represents an important protein source for ruminants, because a large part of crude protein entering the small intestine is of microbial origin synthesised in the rumen. Hence, microbial protein synthesis (MPS) and its efficiency (EMPS) are crucial to ruminant nutrition. Silages, especially maize silage and grass silage, are often used as forages in diets for ruminants. However, various silage species differ in their nutrient composition and in degradation characteristics of nutrient fractions in the rumen. Even within one silage species considerable differences between different batches can exist. This influences the supply and availability of energy and crude protein (CP) to the ruminal microbial community and thus their fermentation and synthesis.

In the first part of this doctoral thesis five batches of maize silage, five batches of grass silage and three batches of alfalfa silage were incubated in the Hohenheim gas test. The variation of silages based on *in vitro* gas production kinetics and ammonia-nitrogen-concentration (NH<sub>3</sub>-Nconcentration) in the mixture of rumen liquid and buffer solution over time was determined. For this purpose, 10 glass syringes per silage batch were used per experimental run. In each case 3 of 10 glass syringes were used to determine the gas volume over 72 hours (n = 24). The remaining 7 glass syringes were removed from the incubator at 7 time points and the NH<sub>3</sub>-Nconcentration in the mixture of rumen liquid and buffer solution was determined (n = 8 per time point).

Upon the incubation of the 13 silages both silage species and batch had an influence on the potential gas production and on the rate constant of gas production. The determined potential gas production was between 62.5-74.2, 56.0-64.9 and 39.9-59.6 mL/200 mg organic matter (OM) for maize silages, grass silages and alfalfa silages. The rate constant of gas production amounted to 5.5-7.3, 3.8-7.1 and 5.0-7.7 %/h for maize silages, grass silages and alfalfa silages. Both silage species and batch as well as the time point and their interactions had an influence on the NH<sub>3</sub>-N-concentration in the mixture of rumen liquid and buffer solution.

In the second part of this work one maize silage and one grass silage were incubated in the semi-continuous rumen simulation Rusitec. The influence of the forage source without supplementation of concentrates on the NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids over time and the fermentation and synthesis characteristics of the ruminal microbial community were investigated *in vitro*. Five incubation runs were conducted, each lasting 13 days. Once daily one nylon bag with 15 g of the respective silage was supplied to the system and incubated for

48 hours. The continuously infused buffer solution contained <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. Degradation of nutrients, gas, methane and short chain fatty acid (SCFA) production as well as NH<sub>3</sub>-N in effluent and MPS were measured. The NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids was determined within two periods (period 1: 0, 2, 4, 12, 24 and 48 hours after starting the incubation; period 2: 0, 2, 4, 12 and 24 hours after changing the feed bag on day 12). Additionally, the NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids over time was detected for a blank control during period 1.

Upon the incubation of grass silage, degradation of OM and fibre fractions, amount of NH<sub>3</sub>-N in the effluent as well as MPS and EMPS was higher than with incubation of maize silage. Degradation of CP and total amount of SCFA were unaffected by silage. N-efficiency was higher with incubation of maize silage than with incubation of grass silage. During period 1, NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids increased for all three treatments within the first 24 hours and was not different between the treatments. For grass silage, NH<sub>3</sub>-N-concentration subsequently continued to rise up to a maximum value at the last time point of measurement in period 1. NH<sub>3</sub>-N-concentrations in fermenter liquids in period 2 remained on a relatively constant level for maize silage and grass silage, differing between the two silages at all five time points of measurement. Mean NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids measured in period 2 corresponded in level with NH<sub>3</sub>-N-concentration determined in the effluent of both silages.

In the third part of this work, the influence of different N-supplements to maize silage compared to grass silage on fermentation and synthesis characteristics of the ruminal microbial community *in vitro* was investigated. Grass silage and maize silage were incubated in a Rusitec, the latter being either unsupplemented or supplemented with urea, pea protein, pea peptone or a mixture of amino acids to adjust N-content of maize silage to that of grass silage. A total of 5 incubation runs were conducted, thereby the essential procedure was as described for the first Rusitec study. N-sources were added to the materials placed in the nylon bags. The NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids was determined 0, 2, 4, 12 and 24 hours after changing the feed bag on day 12.

Results concerning degradation of OM, CP and N-free extracts showed a positive influence of N-supplementations except for maize silage+pea protein. Furthermore, degradation of detergent fibres were partially improved through N-supplementations. The values of MPS and EMPS were enhanced through all N-supplementations. Thereby supplementation of urea and pea peptone to maize silage resulted in the largest increase in EMPS. However, through none

of the N-supplements the level of grass silage in EMPS could be achieved. The determined course of NH<sub>3</sub>-N-concentration in fermenter liquids was largely similar between the treatments.

Silages used in the second Rusitec study were additionally analysed for their contents of fermentation acids, alcohols and NH<sub>3</sub> and characterized in detail via determination of total tract digestibility, *in situ*-incubations as well as *in vitro*-incubations using the Hohenheim gas test.

Variation in nutrient composition of maize silages, grass silages and alfalfa silages were reflected in a large variation both in gas production kinetics and curve shape of NH<sub>3</sub>-N-concentration in the mixture of rumen liquid and buffer solution. Upon the sole incubation of maize silage and grass silage in the Rusitec, grass silage promoted MPS and EMPS stronger than maize silage. Supplementation of maize silage with different N-sources resulted in an increase in MPS and EMPS compared to maize silage without N-supplementation. Thus the assumption of an insufficient N-supply of ruminal microbes during the sole incubation of maize silage *in vitro* was confirmed. However, through none of the N-supplementations level of grass silage in EMPS could be achieved.

### Quellenverzeichnis

- Agricultural and Food Research Council (AFRC) (1993): Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. CAB International, Wallingford, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland.
- Ali, M., Cone, J. W., van Duinkerken, G., Klop, A., Kruisdijk, J., Blok, M. C., Bruinenberg, M. und Hendriks, W. H. (2014): Relationship between chemical composition and *in situ* rumen degradation characteristics of grass silages in dairy cows. Wageningen Journal of Life Sciences **70–71**, 9–15.
- Andrade-Montemayor, H., García Gasca, T. und Kawas, J. (2009): Ruminal fermentation modification of protein and carbohydrate by means of roasted and estimation of microbial protein synthesis. Revista Brasileira de Zootecnia 38, 277–291.
- Andries, J. I., Buysse, F. X., De Brabander, D. L. und Cottyn, B. G. (1987): Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances – a review. Animal Feed Science and Technology 18, 169–180.
- Argyle, J. L. und Baldwin, R. L. (1989): Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. Journal of Dairy Science **72**, 2017–2027.
- Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (AfBN) (1991): Leitlinien für die Bestimmung der Verdaulichkeit von Rohnährstoffen an Wiederkäuern. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **65**, 229–234.
- Bach, A., Calsamiglia, S. und Stern, M. D. (2005): Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science **88**, E9–E21.
- Bach, A., Yoon, I. K., Stern, M. D., Jung, H. G. und Chester-Jones, H. (1999): Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. Journal of Dairy Science 82, 153–160.
- Beever, D. E. (1993): Ruminant animal production from forages: present position and future opportunities. In: Baker. M. J. (Hrsg.) Grasslands for our world. SIR Publishing, Wellington, Neuseeland, 158–164.
- Beuvink, J. M. und Kogut, J. (1993): Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. Journal of Animal Science **71**, 1041–1046.
- Boguhn, J., Kluth, H., Bulang, M., Engelhard, T. und Rodehutscord, M. (2010): Effects of pressed beet pulp silage inclusion in maize-based rations on performance of highyielding dairy cows and parameters of rumen fermentation. Animal 4, 30–39.

- Boguhn, J., Kluth, H. und Rodehutscord, M. (2006): Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis in vitro. Journal of Dairy Science 89, 1580–1591.
- Boguhn, J., Kluth, H., Steinhöfel, O., Peterhänsel, M. und Rodehutscord, M. (2003): Nutrient digestibility and prediction of metabolizable energy in total mixed rations for ruminants. Archives of Animal Nutrition 57, 253–266.
- Boguhn, J., Zuber, T. und Rodehutscord, M. (2013): Effect of donor animals and their diet on *in vitro* nutrient degradation and microbial protein synthesis using grass and corn silages. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **97**, 547–557.
- Brandt, M. und Rohr, K. (1981): Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen. 1. Mitteilung: Bestimmung des Mikrobenstickstoffs im Duodenalchymus mit Hilfe von <sup>15</sup>N. Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 46, 39–48.
- Broderick, G. A., Koegel, R. G., Walgenbach, R. P. und Kraus, T. J. (2002): Ryegrass or alfalfa silage as the dietary forage for lactating dairy cows. Journal of Dairy Science **85**, 1894–1901.
- Browne, E. M., Juniper, D. T., Bryant, M. J. und Beever, D. E. (2005): Apparent digestibility and nitrogen utilisation of diets based on maize and grass silage fed to beef steers. Animal Feed Science and Technology **119**, 55–68.
- Bulang, M., Kluth, H., Engelhard, T., Spilke, J. und Rodehutscord, M. (2006): Zum Einsatz von Luzernesilage bei K

  ühen mit hoher Milchleistung. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 90, 89–102.
- Carro, M. D., Lebzien, P. und Rohr, K. (1995): Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. Small Ruminant Research 15, 113–119.
- Carro, M. D. und Miller, E. L. (1999): Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture system (RUSITEC). British Journal of Nutrition 82, 149–157.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H. und Cameron, M. R. (1992): Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. Journal of Dairy Science 75, 2304–2323.
- Czerkawski, J. W. und Breckenridge, G. (1977): Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition **38**, 371–384.

- Deaville, E. R. und Givens, D. I. (1998): Regions of normalised near infrared reflectance difference spectra related to the rumen degradation of fresh grass, grass silage and maize silage. Animal Feed Science and Technology **72**, 41–51.
- De Boever, J. L., Aerts, J. M., Vanacker, J. M. und De Brabander, D. L. (2005): Evaluation of the nutritive value of maize silages using a gas production technique. Animal Feed Science and Technology 123–124, 255–265.
- De Boever, J. L., Vanacker, J. M. und De Brabander, D. L. (2002): Rumen degradation characteristics of nutrients in maize silages and evaluation of laboratory measurements and NIRS as predictors. Animal Feed Science and Technology **101**, 73–86.
- Demeyer, D. und Fievez, V. (2004): Is the synthesis of rumen bacterial protein limited by the availability of pre-formed amino acids and/or peptides? British Journal of Nutrition **91**, 175–176.
- Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) (1997): DLG-Futterwerttabellen Wiederkäuer. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland.
- Dewhurst, R. J., Davies, D. R. und Merry, R. J. (2000): Microbial protein supply from the rumen. Animal Feed Science and Technology **85**, 1–21.
- Dewhurst, R. J., Fisher, W. J., Tweed, J. K. S. und Wilkins, R. J. (2003): Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. Journal of Dairy Science 86, 2598–2611.
- Felix, A., Cook, R. M. und Huber, J. T. (1980): Isoacids and urea as a protein supplement for lactating cows fed corn silage. Journal of Dairy Science 63, 1098–1103.
- Firkins, J. L., Allen, M. S., Oldick, B. S. und St-Pierre, N. R. (1998): Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. Journal of Dairy science 81, 3350–3369.
- García-Rodriguez, A., Mandaluniz, N., Flores, G. und Oregui, L. M. (2005): A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. Animal Feed Science and Technology 123–124, 267–276.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) (2001): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J. und Taylor, S. J. (2004): Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology **111**, 57–71.

- Givens, D. I. und Rulquin, H. (2004): Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silagebased diets. Animal Feed Science and Technology **114**, 1–18.
- Gizzi, G., Zanchi, R. und Sciaraffia, F. (1998): Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen in vitro technique with those obtained in vivo. Animal Feed Science and Technology **73**, 291–305.
- Goelema, J. O., Spreeuwenberg, M. A. M., Hof, G., van der Poel, A. F. B. und Tamminga, S. (1998): Effect of pressure toasting on the rumen degradability and intestinal digestibility of whole and broken peas, lupins and faba beans and a mixture of these feedstuffs. Animal Feed Science and Technology 76, 35–50.
- Gorosito, A. R., Russell, J. B. und Van Soest, P. J. (1985): Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant cell wall in vitro. Journal of Dairy Science **68**, 840–847.
- Grings, E. E., Blümmel, M. und Südekum, K.-H. (2005): Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silagebased diets. Animal Feed Science and Technology 123–124, 527–545.
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Bouton, J. und Firkins. J. L. (2003): Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. Journal of Animal Science **81**, 329–336.
- Griswold, K. E., Hoover, W. H., Miller, T. K. und Thayne, W. V. (1996): Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. Journal of Animal Science 74, 483–491.
- Hackmann, T. J. und Firkins, J. L. (2015): Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. Frontiers in Microbiology **6**, Artikel 465, doi: 10.3389/fmicb.2015.00465.
- Hersom, M. J. (2008): Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in forage-fed ruminants. Journal of Animal Science **86**, E306–E317.
- Hildebrand, B., Boguhn, J. und Rodehutscord, M. (2011a): Effect of maize silage to grass silage ratio and feed particle size on ruminal fermentation *in vitro*. Animal **5**, 528–536.
- Hildebrand, B., Boguhn, J. und Rodehutscord, M. (2011b): Effect of maize silage to grass silage ratio and feed particle size on protein synthesis and amino acid profile in different microbial fractions in a semi-continuous rumen simulation. Animal **5**, 537–546.
- Hildebrand, B., Boguhn, J. und Rodehutscord, M. (2011c): Investigations on the effect of forage source, grinding, and urea supplementation on ruminal fermentation and microbial protein flow in a semi-continuous rumen simulation system. Archives of Animal Nutrition 65, 402–414.

- Hoover, W. H., Crooker, B. A. und Sniffen, C. J. (1976): Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. Journal of Animal Science **43**, 528–534.
- Hoover, W. H. und Stokes, S. R. (1991): Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. Journal of Dairy Science **74**, 3630–3644.
- Hvelplund, T. und Weisbjerg, M. R. (2000): *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In: Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E. und Omed, H. M. (Hrsg.) Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland, 233–258.
- Jeroch, H., Drochner, W. und Simon, O. (2008): Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Deutschland.
- Jouany, J.-P. (1996): Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. The Journal of Nutrition **126**, 1335S–1346S.
- Juniper, D. T., Browne, E. M., Bryant, M. J. und Beever, D. E. (2008): Digestion, rumen fermentation and circulating concentrations of insulin, growth hormone and IGF-1 in steers fed diets based on different proportions of maize silage and grass silage. Animal 2, 849–858.
- Kajikawa, H., Tajima, K., Mitsumori, M. und Takenaka, A. (2007): Effects of amino nitrogen on fermentation parameters by mixed ruminal microbes when energy or nitrogen is limited. Animal Science Journal 78, 121–128.
- Kaswari, T., Lebzien, P., Flachowsky, G. und ter Meulen, U. (2007): Studies on the relationship between the synchronization index and the microbial protein synthesis in the rumen of dairy cows. Animal Feed Science and Technology 139, 1–22.
- Keady, T. W. J., Hanrahan, J. P., Marley, C. L. und Scollan, N. D. (2013): Production and utilization of ensiled forages by beef cattle, dairy cows, pregnant ewes and finishing lambs – A review. Agricultural and Food Science 22, 70–92.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M. und Rode, L. M. (2000): Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. Journal of Animal Science **78**, 2431–2445.
- Krawielitzki, K., Schmidt, Th., Voigt, J., Kowalczyk, J. und Gabel, M. (2006): Dynamics of microbial contamination of protein during ruminal *in situ* incubation of feedstuffs. Journal of Animal and Feed Sciences 15, 313–328.
- Lapierre, H. und Lobley, G. E. (2001): Nitrogen recycling in the ruminant: A review. Journal of Dairy Science **84**, E223–E236.

- Lengowski, M. B., Zuber, K. H. R., Witzig, M., Möhring, J., Boguhn, J. und Rodehutscord, M. (2016): Changes in rumen microbial community composition during adaption to an *in vitro* system and the impact of different forages. PLOS ONE, doi: 10.1371/journal.pone.0150115.
- Madsen, J. und Hvelplund, T. (1994): Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. Livestock Production Science **39**, 201–212.
- Mansfield, H. R., Endres, M. I. und Stern, M. D. (1995): Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. Animal Feed Science and Technology **55**, 47–66.
- McDougall E. I. (1948): Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochemical Journal **43**, 99–109.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. und Schneider, W. (1979): The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science **93**, 217–222.
- Menke, K. H. und Steingass, H. (1988): Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28, 7–55.
- Muetzel, S., Lawrence, P., Hoffmann, E. M. und Becker, K. (2009): Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. Animal Feed Science and Technology 151, 32 – 43.
- Mulligan, F. J., O'Mara, F. P., Rath, M., Caffrey, P. J., Callan, J. und Flynn, B. (1999): Factors effecting the feeding value of maize and grass silage in late lactation dairy cows. Proceedings of the British Society of Animal Science and the Agricultural Research Forum 1999, 79.
- Mulligan, F. J., Quirke, J., Rath, M., Caffrey, P. J. und O'Mara, F. P. (2002): Intake, digestibility, milk production and kinetics of digestion and passage for diets based on maize or grass silage fed to late lactation dairy cows. Livestock Production Science **74**, 113–124.
- National Research Council (NRC) (2001): Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy Press, Washington, D. C., USA.
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E. und McEwan, N. R. (2015): The role of ciliate protozoa in the rumen. Frontiers in Microbiology 6, Artikel 1313, doi: 10.3389/fmicb.2015.01313.

- O'Mara, F. P., Fitzgerald, J. J., Murphy, J. J und Rath, M. (1998): The effect on milk production of replacing grass silage with maize silage in the diet of dairy cows. Livestock Production Science **55**, 79–87.
- Orozco-Hernández, J. R., Brisson, G. J. und Girard, V. (1997): Timothy grass or alfalfa silage for cows in midlactation: Effect of supplementary barley. Journal of Dairy Science **80**, 2876–2884.
- Ørskov, E. R. und McDonald, I. (1979): The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agricultural Science **92**, 499–503.
- Owens, D., McGee, M., Boland, T. und O'Kiely, P. (2009): Rumen fermentation, microbial protein synthesis, and nutrient flow to the omasum in cattle offered corn silage, grass silage, or whole-crop wheat. Journal of Animal Science **87**, 658–668.
- Ranilla, M. J. und Carro, M. D. (2003): Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. Journal of Animal Science 81, 537–544.
- Reynolds, C. K. und Kristensen, N. B. (2008): Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. Journal of Animal Science 86, E293–E305.
- Russell, J. B. (1998): Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. Journal of Animal Science **76**, 1955–1963.
- Russell, J. B. (2007): The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **13**, 1–11.
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest. P. J. und Sniffen, C. J. (1992): A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. Journal of Animal Science 70, 3551–3561.
- Seifried, N., Steingass, H., Hoffmann, N. und Rodehutscord, M. (2016): *In situ* starch and crude protein degradation in the rumen and *in vitro* gas production kinetics of wheat genotypes. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, doi: 10.1111/jpn.12529.
- Seifried, N., Steingaß, H. und Rodehutscord, M. (2015): *In vitro* and *in situ* evaluation of secondary starch particle losses from nylon bags during the incubation of different cereal grains. Animal Feed Science and Technology 210, 26–36.

- Siddons, R. C., Nolan, J. V., Beever, D. E. und Macrae, J. C. (1985): Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. British Journal of Nutrition 54, 175–187.
- Spiekers H., Nußbaum, H. und Potthast V. (2009): Erfolgreiche Milchviehfütterung. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland.
- Stern, M. D., Varga, G. A., Clark, J. H., Firkins, J. L., Huber, J. T. und Palmquist, D. L. (1994): Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science 77, 2762–2786.
- Südekum, K.-H. (2005): Möglichkeiten und Grenzen einer Standardisierung der *in situ*-Methodik zur Schätzung des ruminalen Nährstoffabbaus. Übersichten Tierernährung 33, 71–86.
- Tamminga, S., Brandsma, G. G., Dijkstra, J., van Duinkerken, G., van Vuuren, A. M. und Blok,
   M. C. (2007): Protein evaluation for ruminants: The DVE/OEB 2007 system. CVBdocumentation report nr. 53. CVB, Lelystad, Niederlande.
- Van Es, A. J. H. (1978): Feed evaluation for ruminants. I. The systems in use from May 1977 onwards in the Netherlands. Livestock Production Science **5**, 331–345.
- Van Kessel, J. S. und Russell, J. B. (1996): The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. Journal of Dairy Science 79, 1237– 1243.
- Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) (Herausgeber) (1976): Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln mit 1.–8. Ergänzungslieferung (1983–2012), 3. Auflage. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Deutschland.
- Von Lengerken, J. und Zimmermann, K. (1991): Handbuch Futtermittelprüfung, Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH, Berlin, Deutschland, 407–414.
- Wallace, R. J., Wallace, S. J., McKain, N., Nsereko, V. L. und Hartnell, G. F. (2001): Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. Journal of Animal Science **79**, 1905–1916.
- Weißbach, F. und Kuhla, S. (1995): Stoffverluste bei der Bestimmung des Trockenmassegehaltes von Silagen und Grünfutter: Entstehende Fehler und Möglichkeiten der Korrektur. Übersichten Tierernährung 23, 189–214.

- Windschitl, P. M. und Stern, M. D. (1988): Effects of urea supplementation of diets containing lignosulfonate-treated soybean meal on bacterial fermentation in continuous culture of ruminal contents. Journal of Animal Science 66, 2948–2958.
- Wischer, G., Boguhn, J., Steinga
  ß, H., Schollenberger, M., Hartung, K. und Rodehutscord, M. (2013a): Effect of monensin on in vitro fermentation of silages and microbial protein synthesis. Archives of Animal Nutrition 67, 219–234.
- Wischer, G., Boguhn, J., Steinga
  ß, H., Schollenberger, M. und Rodehutscord, M. (2013b): Effects of different tannin-rich extracts and rapeseed tannin monomers on methane formation and microbial protein synthesis *in vitro*. Animal 7, 1796–1805.
- Witzig, M., Lengowski, M. B., Zuber, K. H. R., Möhring, J. und Rodehutscord, M.: Effects of supplementing maize silage with different nitrogen sources on ruminal fermentation and microbial populations *in vitro*. Eingereicht bei PLOS ONE am 07.09.2016.
- Yang, J. Y., Seo, J., Kim, H. J., Seo, S. und Ha, J. K. (2010): Nutrient synchrony: Is it a suitable strategy to improve nitrogen utilization and animal performance? Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 23, 972–979.
- Zijlstra, J. B., Beukema, J., Wolthers, B. G., Byrne, B. M., Groen, A. und Dankert, J. (1977): Pretreatment methods prior to gaschromatographic analysis of volatile fatty acids from faecal samples. Clinica Chimica Acta 78, 243–250.

# Anhang

**Tabelle A1:** Informationen zu den im Hohenheimer Futterwerttest inkubierten Silagechargen

Charge	Ursprungspflanze	Erntezeitpunkt	Silierzusätze	Lagerung	Herkunft
MS01		2011	Bonsilage Mais, Fa.Schaumann	Fahrsilo	Universität Hohenheim, Versuchsstation Agrarwissenschaften, Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim, Stuttgart
<b>MS02</b>	Amaretto, 260er Silomais aus der weißen Gruppe	2011	keine	Fahrsilo	Echterdingen
<b>MS03</b>		2011	nicht bekannt	Fahrsilo	Filderstadt-Sielmingen
<b>MS04</b>		2011	nicht bekannt	Fahrsilo	Leonberg-Gebersheim
<b>MS05</b>	Schumi (Caussade Saaten)	2011	keine	Fahrsilo	Neubulach
GS01		2011, 1. Schnitt	Bonsilage Plus, Fa.Schaumann	Siloballen	Universität Hohenheim, Versuchsstation Agrarwissenschaften, Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim, Stuttgart
GS02	Grasreiche Bestände, wenig Klee, wenig Kräuter	2011, 1. Schnitt	keine	Fahrsilo	Echterdingen
GS03	hauptsächlich grasreicher Grünlandbestand, kleine Mengen (ca. 15-20%) neu ausgesätes Weidelgras (Aubade) 1. Schröpfschnitt	2011, 4. Schnitt	keine	Fahrsilo	Filderstadt-Sielmingen
<b>GS04</b>	Dauerwiese + Nachsaat (dt. Weidelgras)	2011, 1. Schnitt	keine	Fahrsilo	Leonberg-Gebersheim
GS05	Dauerwiese + Nachsaat (dt. Weidelgras)	2011, 2. Schnitt	keine	Fahrsilo	Leonberg-Gebersheim

MS = Maissilage (Chargen 1 bis 5); GS = Grassilage (Chargen 1 bis 5)

Fortsetzung Tabelle A1

Charge	Ursprungspflanze	Erntezeitpunkt	Silierzusätze	Lagerung	Herkunft
LS01	Franken-Neu	2010, 2. oder 3.	Kofasil Liquid	Siloballen	Hofgut Neumühle, Münchweiler/Alsenz
		Schnitt, Ende			
		Knospe – Anfang			
		Blüte			
LS02	Franken-Neu	2011, 1. Schnitt,	Bonsilage Forte	Fahrsilo	Hofgut Neumühle, Münchweiler/Alsenz
		kurz vor der			
		Knospe			
LS03	Franken-Neu	2011, 2. Schnitt,	Bonsilage Forte	Fahrsilo	Hofgut Neumühle, Münchweiler/Alsenz
		kurz vor der			
		Knospe			

LS = Luzernesilage (Chargen 1 bis 3)

Tabelle A2:         Aminosäuren-Zusammense	tzung der in der zweiten Rusite	c-Untersuchung verwendeten	Maissilage, O	Grassilage und An	mino-N-
Quellen (in g/kg Trockenmasse)					

	Maissilage	Grassilage	Erbsenprotein	Erbsenpepton	Aminosäuren-
					Mischung
Cystein	1,0	0,8	9,1	10,9	11,3
Asparagin	4,6	10,6	106,4	110,3	114,8
Methionin	1,1	2,1	9,6	7,6	9,2
Threonin	2,5	5,2	32,7	32,8	33,1
Serin	3,1	5,3	48,7	49,5	52,2
Glutamat	9,6	11,0	152,6	173,4	170,7
Prolin	5,3	6,5	39,0	38,5	44,7
Glycin	2,7	5,7	35,9	37,5	38,9
Alanin	5,2	8,2	39,3	39,3	40,5
Valin	3,2	6,8	41,9	39,9	44,4
Isoleucin	2,3	5,2	38,7	36,6	40,2
Leucin	6,9	9,6	75,4	66,2	76,9
Tyrosin	2,2	3,2	31,0	27,0	31,1
Phenylalanin	2,9	5,7	48,7	45,0	49,3
Histidin	1,7	2,6	25,0	25,9	27,2
Tryptophan	0,4	1,3	7,6	6,2	7,1
Lysin	1,8	5,8	64,3	65,3	68,5
Arginin	1,2	3,3	75,7	82,3	83,9

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion auf verschiedene Art und Weise unterstützt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Rodehutscord für die Überlassung des Themas bedanken, ebenso wie für seine fachliche Unterstützung und die ausgezeichnete wissenschaftliche Ausbildung. Darüber hinaus danke ich ihm für sein stetiges Verständnis und das Engagement meiner Familie und mir gegenüber.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Jeannette Boguhn für ihre intensive Betreuung zu Beginn meiner Promotion bedanken. Hierbei war sie sowohl in fachlichen als auch in praktischen Belangen stets eine Hilfe.

Des Weiteren gilt mein spezieller Danke Dr. Maren Witzig und Dr. Herbert Steingaß für die ausführlichen Gespräche und die stets hilfreichen Anregungen während der Planung, Durchführung und Auswertung der verschiedenen Untersuchungen.

Dr. Jens Möhring danke ich für seine unermüdliche Hilfe und die Beantwortung meiner Fragen während der statistischen Auswertung der Versuche dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Fachgebiets Tierernährung für die Hilfe und Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Hierbei gilt mein spezieller Dank Dr. Margit Schollenberger und allen Mitarbeitern des Labors für die hervorragende Hilfe bei allen analytischen Aufgaben. Außerdem möchte ich mich bei allen Tierpflegern für die praktische Unterstützung bedanken ebenso wie bei Birgit Sprott und Ingrid Neff aus dem Sekretariat.

Darüber hinaus danke ich meinen Freunden Gero, Philipp, Christoph, Melanie und Wolfgang für die schöne gemeinsame Zeit sowohl am Institut als auch außerhalb der Arbeit.

Bei meiner Familie möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen für die Unterstützung, das aufgebrachte Verständnis und die vielen aufmunternden Worte bedanken.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinem Mann Tobias, der mir mit seiner positiven Einstellung immer wieder über Durststrecken hinweggeholfen und mich aufs Neue motiviert hat, sowie meinem Sohn Philipp, der meinen Blick auf das Wesentliche gelenkt hat.

# Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Karin Helga Renate Zuber (geborene Müller)
Geburtsdatum	19.03.1986
Geburtsort	Stuttgart-Bad Cannstatt, Deutschland

## Ausbildung

09/1992 - 07/1996	Grundschule Hohewartschule, Stuttgart-Feuerbach, Deutschland
09/1996 - 06/2005	Leibniz-Gymnasium, Stuttgart-Feuerbach, Deutschland Abschluss: allgemeine Hochschulreife
10/2005 - 09/2006	Studium für das Lehramt an Grund- und Hauptschulen mit Schwerpunkt Grundschule an der Pädagogischen Hochschule Ludwigsburg, Deutschland
10/2006 - 10/2011	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland Abschluss: Diplom
Seit 10/2011	Promotion am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim, Fachgebiet Tierernährung, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland

# Praktische Erfahrungen

08/2008 - 09/2008	Praktikum auf der Versuchsstation Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim, Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland
05/2010 - 12/2010	Studentische Hilfskraft am Institut für Nutztierwissenschaften der Universität Hohenheim, Fachgebiet Tierernährung, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland
04/2011 - 06/2011	Praktikum auf der Versuchsstation des Skretting ARC (Aquaculture Research Centre), Forsand, Norwegen
08/2011 - 09/2011	Praktikum auf der Versuchsstation Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim, Standort Lindenhöfe, Eningen, Deutschland