



# Toepassing van Effectieve Micro-organismen (EM) als kuilverbeteraar

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

Rapport ID-Lelystad no. 2165



## SAMENVATTING

Deze studie bestond uit twee delen.

Deel 1: Het bepalen van de minimaal benodigde incubatietijd en incubatietemperatuur van EM-A als inoculant voor grassilage. Hierbij werden de aantallen melkzuurbacteriën in EM-A gevolgd gedurende 10 dagen incubatie bij drie temperaturen (15, 20, en 25 °C).

Deel 2: Het bepalen van het positieve effect van EM-A en EM-Silage op het inkuilproces bij het maken en bewaren van Nederlandse grassilage. Hierbij werden laboratoriumsilages gemaakt en werd gekeken naar het effect van EM-A en EM-silage op de initiële fermentatie (pH-daling na 6 dagen incubatie) en het eindproduct (microflorasamenstelling, fermentatieprofiel en aërobe stabiliteit van de silage na twee maanden incubatie).

ad 1:

De gebruikelijke dosering voor melkzuurbacteriën als silage inoculant is minimaal  $1 \cdot 10^5$  kve (kolonie vormende eenheden) melkzuurbacteriën per gram silage. Bij de aanbevolen dosering voor EM-A komt dit neer op een minimaal benodigd aantal melkzuurbacteriën van  $1 \cdot 10^8$  kve  $g^{-1}$  inoculant. De door Agriton voorgeschreven incubatieduur van 7 dagen bleek voor alle geteste incubatietemperaturen ruim voldoende om het minimaal benodigde aantal melkzuurbacteriën op te kweken. Na 7 dagen bevatten alle EM-A inoculanten namelijk ruim  $5 \cdot 10^8$  kve melkzuurbacteriën  $g^{-1}$ . Bij de hogere incubatietemperaturen van 20 en 25 °C was een incubatietijd van 2 à 3 dagen voldoende om ca.  $1 \cdot 10^8$  kve melkzuurbacteriën per gram inoculant op te kweken. Een incubatietijd van meer dan 10 dagen was niet zinvol, omdat het aantal melkzuurbacteriën in de EM-A dan al weer afnam (afstervingsfase).

ad 2:

Zowel EM-A als EM-Silage hadden een positief effect op de fermentatie en de aërobe stabiliteit van de grassilages. Na twee maanden was de pH in de behandelde silages ten opzichte van de controle silages  $\pm 0.7$  eenheden lager (pH 4.4 t.o.v. pH 5.1). Alleen EM-A had ook een positief effect op de initiële verzuring. Na 6 dagen was de pH van de met EM-A behandelde silages ten opzichte van de EM-Silage behandelde silages en de controle silages al  $\pm 1$  pH-eenheid lager (pH 5.5 t.o.v. pH 6.5/6.6). Dat het effect van de beide toevoegmiddelen op de snelheid van verzuring voor EM-A groter was dan voor EM-Silage, is mogelijk te verklaren door het grotere aantal melkzuurbacteriën dat via de EM-A behandeling aan de silages werd toegevoegd ten opzichte van de EM-Silage behandeling. Door EM-A werden  $2 \cdot 10^5$  kve melkzuurbacteriën  $g^{-1}$  gras toegevoegd en door EM-Silage  $3 \cdot 10^4$  kve melkzuurbacteriën  $g^{-1}$  gras.

Melkzuur, azijnzuur en ethanol waren in alle silages de dominante fermentatieproducten na 2 maand en incubatie. Het gehalte aan conserverend melkzuur en azijnzuur was in de met EM-A en EM-silage behandelde silages veel hoger dan in de controle silage. Daarnaast werden zowel in de met EM-A als in de met EM-silage behandelde silages hoge gehalten 1,2-propaandiol en 1-propanol gemeten, wat zou kunnen duiden op activiteit van *Lactobacillus buchneri* en/of aanverwante melkzuurbacteriën. Deze bacteriën kunnen een belangrijke rol spelen bij het verbeteren van de aërobe stabiliteit van silage.

EM-A en EM-Silage verhoogden beide de aërobe stabiliteit van de grassilages na 2 maanden incubatie. De controle silages broeiden al na 60 uur, terwijl de behandelde silages ruim 3 weken stabiel bleven.

Geconcludeerd kan worden dat in deze studie zowel EM-A als EM-Silage de fermentatiekwaliteit van de grassilages bevorderden en de aërobe stabiliteit sterk verbeterden.

## INTRODUCTIE

Onderstaande studie werd uitgevoerd in samenwerking met Agriton. Agriton is een bedrijf dat zich richt op het creëren van een duurzame landbouw. Effectieve Micro-organismen (EM) spelen daarbij een belangrijke rol. Effectieve Micro-organismen is een product ontwikkeld door Prof. Dr. T. Higa werkzaam aan de Ryukyus Universiteit in Japan. EM bevat een cocktail van micro-organismen bestaande uit vijf groepen: melkzuurbacteriën, fotosynthetiserende bacteriën, gisten, actinomyceten en schimmels.

Voor de verzuring van grassilage spelen melkzuurbacteriën een hoofdrol. De aantallen hiervan in EM-I zijn ongeveer  $1.10^6$  kve (kolonie vormende eenheden/ ml). EM-I is de benaming van het uitgangspunt Effectieve Micro-organismen, dat Agriton levert in plastic flessen van 1 liter en jerrycans van 10 liter. Om deze Effectieve Micro-organismen als kuilverbeteraar toe te passen moet men EM-I activeren. Het activeren van EM-I gebeurt door en melasse (of suiker) toe te voegen aan EM-1 en deze oplossing vervolgens te incuberen in een afgesloten container gedurende 7 dagen bij 20-35 °C. Deze geactiveerde EM wordt EM-Actief (EM-A) genoemd en is 14 dagen houdbaar.

Naast EM-I heeft Agriton nog een kant en klaar product (geen activatie nodig) namelijk EM-Silage. EM-Silage is een middel ter bevordering van het inkuilproces bij maïs- en graskuilen. EM-Silage bestaat uit een mengsel van micro-organismen van o.a. bacteriën en gisten, welke tijdens het inkuilproces niet alleen zorgt voor een versnelling van de pH daling (melkzuurbacteriën), maar tevens een aantal bio-actieve stoffen produceert. Deze bio-actieve stoffen hebben volgens Agriton o.a. een smaakbevorderend en broeieremmend effect.

In het eerste deel van de studie werd de optimale incubatietijd en incubatietemperatuur van EM-A als inoculant voor grassilage onderzocht. Hierbij werd ervan uitgegaan dat melkzuurbacteriën in EM-A de belangrijkste rol spelen bij het silageproces.

In het tweede deel werd het positieve effect van EM-A en EM-Silage op het inkuilproces bij het maken en bewaren van Nederlandse grassilage getest.

## MATERIAAL EN METHODEN

### 3.1 Deel 1, Optimalisatie voorkeek

EM-I werd geactiveerd door 0.6 l EM-I (zoals geleverd door Agriton) samen te voegen met 0.6 l rietsuikermelasse (ook geleverd door Agriton) en 18.8 l water. Het geheel werd vervolgens verdeeld in 6 gelijke delen. De delen werden bij drie temperaturen in duplo geïncubeerd (15, 20 en 25 °C) in glazen 5 l flessen. Op tijdstip t=0 en na 1, 2, 3, 5, 7 en 10 dagen incuberen werd van elke fles een monster genomen voor de bepaling van de hoeveelheid melkzuurbacteriën.

### 3.2 Deel 2, Effect EM-A en EM-Silage op grassilage

#### 3.2.1 Inkuilen

Het inkuilexperiment werd uitgevoerd met gras, hoofdzakelijk bestaande uit Engels raigras, van een permanente weide op de proefboerderij van het ID-Lelystad (perceel 122). Het gras werd gemaaid met een cyclo-maaier op 7 Mei 2001 en voorgedroogd gedurende ± 40 uur tot een drogestof gehalte van ± 50 %. Het voorgedroogde gras werd gehakseld met een hakselaar en opgedeeld in drie gedeelten van ±15 kg. Elk gedeelte kreeg een andere behandeling. De inoculant werd goed gemengd met het gras. De behandelingen waren als volgt:

Controle (25 ml water per kg gras)

Aanbevolen dosering EM-A (0.80 ml EM-A aangevuld tot 25 ml met water per kg gras) <sup>(a)</sup>

Aanbevolen dosering EM-Silage (0.08 ml EM-Silage aangevuld met water tot 25 ml per kg gras) <sup>(b)</sup>

<sup>(a)</sup> EM-I werd geactiveerd door 0.6 l EM-I (zoals geleverd door Agriton) samen te voegen met 0.6 l rietsuikermelasse en 18.8 l water en gedurende 15 dagen in een afgesloten vat te incuberen bij 20 °C (Volgens de gebruiksaanwijzing is 7 dagen incuberen voldoende voor een sterke vermeerdering van micro-organismen. De aldus ontstane EM-A is dan nog 14 dagen houdbaar).

EM-A werd direct in de kuil gebracht volgens de aanbevolen dosering. Deze is voor EM-A in kuil 33.3 l per 100 m<sup>3</sup>. 1 m<sup>3</sup> kuil komt overeen met ± 200 kg droge stof (IKC, 1993). Het voorgedroogde gras had een drogestofgehalte van 50%. Er was dus 33.3 l EM-A per 40 ton kuilvoer nodig (= 0.8 l EM-A per ton kuilvoer).

<sup>(b)</sup> EM-Silage werd direct in de kuil gebracht volgens de aanbevolen dosering (= 0.08 l E.M.Silage per ton kuilvoer).

Van elke behandeling werd in viervoud een 1-l Weckfles gevuld en een 2 kg plastic zak (2 lagen plastic). De silo's werden opgeslagen bij 20 ± 1 °C in het donker.

Na 1 week incubatie werden 2 weckflessen per behandeling leeggehaald voor de bepaling van de pH.

Na 2 maanden incubatie werden 2 weckflessen per behandeling leeggehaald voor de bepaling van de pH, drogestof gehalte, gehalten aan vluchtige vetzuren, melkzuur en ammoniak, en het aantal in de silage aanwezige gisten en schimmels. Tevens werden 2 zakken per behandeling leeggehaald voor de bepaling van de aërobe stabiliteit.

## 3.2.2 Analyses

### 3.2.2.1 Chemische analyses

Drogestof werd bepaald volgens procedure NEN 3332 van het Nederlands Normalisatie Instituut. Melkzuur, vluchtige vetzuren en alcoholen werden bepaald met HPLC (Oude Elferink et al., 2001). Ammoniak werd bepaald via de gemodificeerde methode van Berthelot (Robinson et al., 1986). De pH werd gemeten in een waterig extract dat ook werd gebruikt voor de microbiologische analyses.

### 3.2.2.2 Microbiologische analyses

Microbiologische analyses werden uitgevoerd met een waterig extract van 30 g silage en 270 g gedemineraliseerd water dat 5 minuten behandeld werd in een stomacher (Seward, Londen). Decimale verdunningsreeksen werden gemaakt in PFZ (pepton 1.0 g l<sup>-1</sup>, NaCl 8.5 g l<sup>-1</sup>). Melkzuurbacteriën werden geteld op dubbel gegoten platen met MRS agar (Oxoid). Gisten en schimmels werden geteld op dubbel gegoten platen met Malt Extract Agar, aangezuurd met melkzuur tot een pH 3.5. De platen werden gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 30 °C.

### 3.2.3 Aërobe stabiliteit

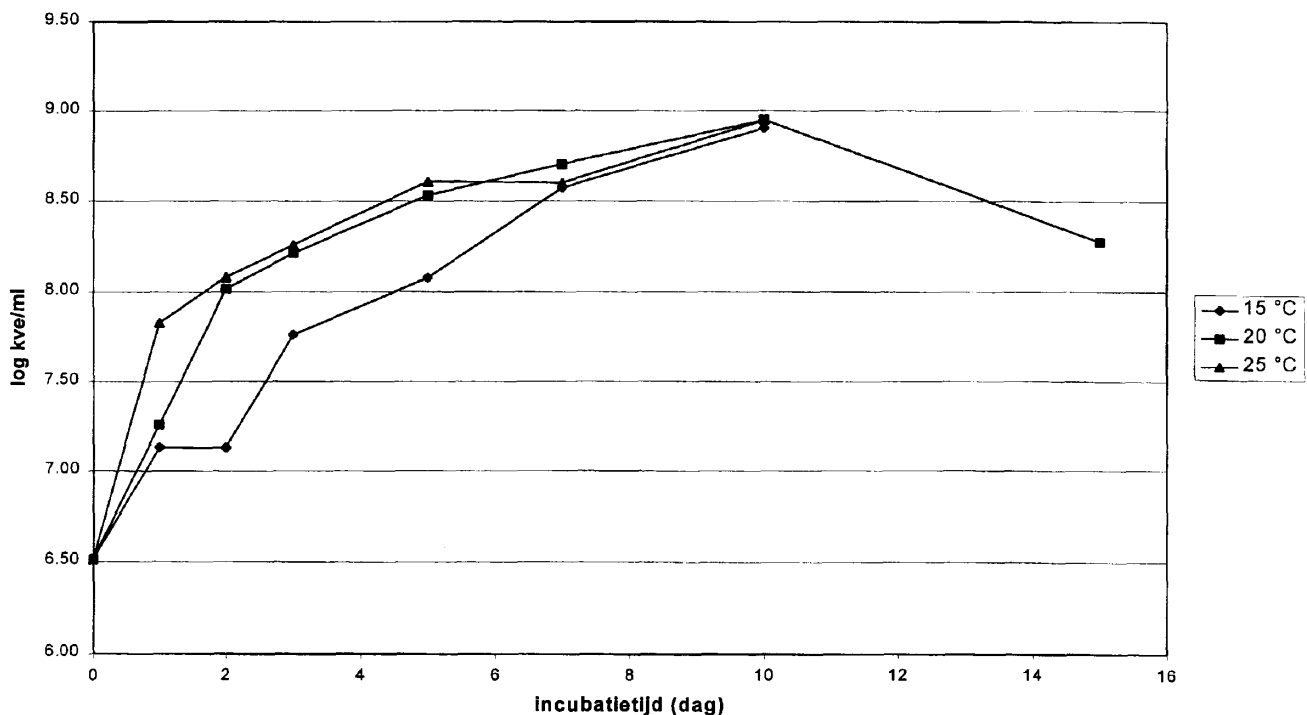
Silage monsters (100 g) werden geïncubeerd in polyethyleenschuim bakken bij 20 ± 1°C. De deksel en bodem van de bakken waren geperforeerd om zuurstof in te laten en om CO<sub>2</sub> uit te laten. De temperatuur in het materiaal werd continue gemeten met behulp van een thermokoppel. De aërobe stabiliteit wordt gedefinieerd als de tijd die nodig is om de temperatuur te laten stijgen tot 1 °C boven de referentie silage. De referentie silage werd gemaakt door deze te behandelen met een mix van mierenzuur en propionzuur (6.6 en 10.7 g kg<sup>-1</sup> silage, respectievelijk).

## RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 4.1 Deel 1

Het effect van de incubatietemperatuur op de aantallen melkzuurbacteriën gedurende de incubatieperiode staat weergegeven in Figuur 1. Gedurende de gehele meetperiode (10 dagen) was bij alle drie de incubatietemperaturen (15, 20 en 25 °C) een toename te zien van het aantal melkzuurbacteriën (van  $\pm 3 \cdot 10^6$  kve ml<sup>-1</sup> op dag 0 tot  $\pm 1 \cdot 10^9$  kve ml<sup>-1</sup> op dag 10). Bij de hoogste temperatuur (25 °C) was de toename het snelst. Maar vanaf dag 2 was het verschil in toename tussen 20 °C en 25 °C verdwenen. De toename van het aantal melkzuurbacteriën bij 15 °C liep achter tot dag 7. Daarna liep de toename gelijk op met 20 en 25 °C. Na 7 dagen incubatie was er geen verschil meer in aantallen melkzuurbacteriën ( $\pm 5 \cdot 10^8$  kve ml<sup>-1</sup>) tussen de drie incubatietemperaturen. Na 10 dagen waren de aantallen melkzuurbacteriën opgelopen tot  $\pm 1 \cdot 10^9$  kve ml<sup>-1</sup>. Dit was waarschijnlijk het maximum omdat een extra telling op dag 15 bij 20 °C een lager aantal liet zien (aantal melkzuurbacteriën gedaald tot  $\pm 2 \cdot 10^8$  kve ml<sup>-1</sup>). Volgens de gebruiksaanwijzing zou EM-A na 7 dagen incuberen nog 14 dagen bruikbaar zijn. Het is duidelijk dat de aantallen melkzuurbacteriën dan lager zullen liggen dan na 7 dagen (op dag 15 ongeveer een factor 2 lager dan op dag 7). Het is zeker niet optimaal om EM-A nog 21 dagen na bereiding pas te gebruiken bij het inkuilen, de melkzuurbacteriën bevinden zich dan namelijk al in de afstervingsfase.

Er van uitgaande dat een minimaal inoculatie-nivo van  $1 \cdot 10^5$  kve g<sup>-1</sup> gras nodig is voor een snelle verzuring, betekent dat er in EM-A minimaal  $1 \cdot 10^8$  kve ml<sup>-1</sup> moeten zitten (bij een inoculatie-nivo van 0.8 ml EM-A per kg gras). Bij 20 en 25 °C werd dit al na 2 dagen incuberen bereikt en bij 15 °C na 5 dagen. De benodigde incubatieduur zou dus wat de aantallen melkzuurbacteriën betreft verkort kunnen worden (2-5 dagen in plaats van 7 dagen).



Figuur 1. Groei van melkzuurbacteriën in EM-A bij verschillende incubatietemperaturen.

## 4.2 Deel 2

### 4.2.1 Dosering melkzuurbacteriën

De hoeveelheid toegevoegde melkzuurbacteriën bij gras behandeld met EMA was  $2 \times 10^5$  kve melkzuurbacteriën per gram gras en bij gras behandeld met EM-Silage  $3 \times 10^4$  kve melkzuurbacteriën per gram gras.

### 4.2.2 Droge stof

Het droge stof gehalte van het gras voor inkuilen was  $480 \text{ g kg}^{-1}$ .

### 4.2.3 pH

Het effect van EMA en EM-Silage op de pH van de grassilages na 2 maanden incubatie was gelijk. De pH in de behandelde silages was ten opzichte van de controle silages  $\pm 0.7$  eenheden lager (pH 4.4 t.o.v. pH 5.1). Dit laatste gold voor de silages in de weckflessen (Tabel 2). Voor wat betreft de silages in zakken (Tabel 1) was het verschil in pH tussen de behandelde en controle silages nog groter, namelijk  $\pm 1.4$  eenheden (pH 4.4 t.o.v. pH 5.8).

Het effect van EMA en EM-Silage op de pH van de grassilages na 6 dagen incubatie was niet gelijk. Ten opzichte van de controle silages gaf alleen EMA een daling van de pH te zien (pH 5.5 t.o.v. pH 6.5). Waarschijnlijk werd dit veroorzaakt door de initiële hoeveelheid melkzuurbacteriën in de silage. De hoeveelheid melkzuurbacteriën toegevoegd via EMA ( $\pm 2 \cdot 10^5$  kve  $\text{g}^{-1}$  gras) lag een factor 7 hoger dan de hoeveelheid toegevoegd door EM-Silage ( $3 \cdot 10^4$  kve  $\text{g}^{-1}$  gras). Het verschil in inoculatie niveau tussen EMA en EM-Silage had geen effect op de uiteindelijke pH na 2 maanden incubatie, maar wel op de initiële pH dalingssnelheid. Een snelle pH daling in de silage vermindert de kans op ongewenste silagefermentaties.

Tabel 1: Effect van de toevoegmiddelen EMA (EMA) en EM-Silage (EMS) op het gewichtsverlies, pH en aërobe stabiliteit van grassilages in 1 kg zakken na 2 maanden incuberen. De getallen zijn gemiddelden van duplo incubaties.

	Na 2 maanden incubatie		
	CON	EMS	EMA
Gew. verlies ( $\text{g kg}^{-1}$ )	39.0 <sup>a</sup>	25.8 <sup>b</sup>	23.9 <sup>b</sup>
pH	5.88 <sup>a</sup>	4.36 <sup>b</sup>	4.29 <sup>b</sup>
Aërobe stab. (uur)	60 <sup>a</sup>	>525 <sup>b</sup>	>525 <sup>b</sup>

Gemiddelden in een rij met verschillende superscript lettercode zijn significant verschillend ( $p < 0.05$ )

### 4.2.5 Aërobe stabiliteit en fermentatieproducten

EMA en EM-Silage verhoogden de aërobe stabiliteit van de grassilages na 2 maanden incubatie. De controle silages begonnen al na 60 uren te broeien, terwijl de behandelde silages 3 weken stabiel bleven (Tabel 1). De aërobe stabiliteitstest wordt standaard bij 3 weken gestopt omdat de test daarna niet meer representatief is voor de kuilsituatie (het materiaal droogt te veel uit). Bij het verklaren van verschillen in aërobe stabiliteit spelen

de aantallen bederfororganismen (gisten en schimmels) en de gehalten aan organische zuren (o.a. melkzuur, azijnzuur) een belangrijke rol.

De aantallen bederfororganismen waren voor alle silages zeer laag en lagen onder de detectiegrens ( $< 10^2$  kve  $g^{-1}$ ) of net iets hierboven (Tabel 2).

Melkzuur, azijnzuur en ethanol waren in alle silages de dominante fermentatieproducten na 2 maanden incubatie (Tabel 2). Het gehalte aan melkzuur en azijnzuur was in de met EM-A en EM-silage behandelde silages veel hoger dan in de controle silage. Daarnaast werden zowel in de met EM-A als in de met EM-silage behandelde silages hoge gehalten 1,2-propaandiol en 1-propanol gemeten. Dit kan duiden op een stimulatie van de activiteit van *Lactobacillus buchneri* en/of aanverwante melkzuurbacteriën. Deze bacteriën spelen een belangrijke rol spelen bij het verbeteren van de aërobe stabiliteit van silage (Oude Elferink et al., 2001). De hogere ammoniakgehalten in de met EM behandelde silages kunnen gevormd zijn door melkzuurbacteriën, maar ook door andere bacteriën in de EM-inoculant.

Het positieve effect van EM-A en EM-silage op de aërobe stabiliteit van de behandelde silages ten opzichte van de controle silage komt goed overeen met de veel hogere concentraties conserverende zuren in de met EM behandelde silage.

Tabel 2 Effect van de toevoegmiddelen EM-A (EMA) en EM-Silage (EMS) op silagekarakteristieken van grassilages in 1 l Weckflessen na 6 dagen en 2 maanden incubatie.

De getallen zijn de gemiddelden van de duplo incubaties.

	Na 6 dagen incubatie			Na 2 maanden incubatie		
	CON	EMS	EMA	CON	EMS	EMA
Drogestof geh ( $g\ kg^{-1}$ )	nb <sup>1</sup>	nb	nb	451	440	436
Gew. verlies ( $g\ kg^{-1}$ )	2.73 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>	6.70 <sup>b</sup>	11.5 <sup>a</sup>	24.0 <sup>b</sup>	21.2 <sup>b</sup>
pH	6.55 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	5.49 <sup>b</sup>	5.11 <sup>a</sup>	4.42 <sup>b</sup>	4.36 <sup>b</sup>
Gisten ( $\log\ kve\ g^{-1}$ )	nb	nb	nb	2.15	<2	<2
Schimmels ( $\log\ kve\ g^{-1}$ )	nb	nb	nb	<2	<2	<2
Melkzuur ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	41.9	79.3	85.2
Azijnzuur ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	7.6	36.2	39.2
Ethanol ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	11.2	17.7	11.7
1,2-Propaandiol ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	0	10.0	9.0
2,3-Butaandiol ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	0.3	0.3	0.3
Propionzuur ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	2.2	2.4	2.7
1-Propanol ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	0	2.3	2.9
Ammoniak ( $g\ kg^{-1}\ ds$ )	nb	nb	nb	2.5	3.5	3.6

Gemiddelden in een rij met verschillende superscript lettercode en dezelfde incubatietijd zijn significant verschillend ( $p < 0.05$ )

<sup>1</sup>nb = niet bepaald



## 5 CONCLUSIE

Behandeling van gras met EM-A als EM-Silage tijdens inkuilen had in dit experiment een zeer duidelijk positief effect op de eind pH en de aërobe stabiliteit van de grassilage in vergelijking met niet geïnoculeerde silage. EM-A had daarnaast ook een duidelijk positief effect op de initiële verzuringssnelheid.

Activatie van EM-1 volgens de door Agriton geadviseerde methode voldeed goed om de inoculant te activeren, maar deze methode kan verder worden geoptimaliseerd (de geadviseerde activatietijd kan bij hogere incubatietemperaturen mogelijk verkort worden).

## 6 REFERENTIES

- Informatie en Kenniscentrum Veehouderij (IKC)** (1993) Handboek voor de rundveehouderij. IKC, Lelystad.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, F., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F.** (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl. Environ. Microbiol. 67:125-132.
- Robinson, P.H., Tamminga, S., van Vuuren, A.M.** (1986) Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen fermentation in dairy cows. Livestock Prod. Sci. 15:173-189.