



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER  
UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE HANNOVER, FOUNDATION

**Abschlussbericht gemäß dem Forschungs- und Entwicklungsvertrag  
zwischen der Niedersächsischen Tierseuchenkasse (TSK) und der  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) zum Thema:**

**Untersuchungen zur Klärung der Rolle des Botulismus bei  
chronischen Erkrankungen im Milchviehstall  
und  
zum Einfluss von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißanteilen auf  
die Pansenfermentation (in vitro)**



## Inhaltsverzeichnis

	Seite	
<b>1</b>	<b>Ziele und Aufgabenstellung des Projektes</b>	2
1.1	Stand der Wissenschaft vor Beginn der Studien	2
1.2	Projektplanung	2
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	3
2.1	Versuchsablauf	3
2.2	Reineiweiß	3
2.3	Analyse der eingesetzten Grassilagen	3
2.4	Analytik der Proben der RUSITEC-Versuche	3
2.4.1	Bestimmung des pH-Werts	3
2.4.2	Untersuchung der mikrobiellen Population	4
2.4.2.1	Konzentrationen einzelner und aller Nukleobasen als Indikator für die Bakterienmasse	4
2.4.2.2	Protozoenzahlen	4
2.4.3	Beurteilung des Kohlenhydratstoffwechsels	4
2.4.3.1	Tägliche Produktionen an flüchtigen Fettsäuren	4
2.4.3.2	Cellulaseaktivität	4
2.4.4.	Beurteilung des Stickstoffstoffwechsels	5
2.4.4.1	Ammoniakkonzentration	5
2.4.4.2	Produktionen an flüchtigen i-Fettsäuren	5
2.4.4.3	Gehalt an bakteriellem Protein	5
2.4.4.4	Konzentrationen freier Aminosäuren	5
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	6
3.i	Grassilagen	6
3.1.1	Nährstoffzusammensetzung der Schad- und Kontrollgrassilagen	6
3.1.2	Zur Ermittlung der Reineiweißgehalte in den eingesetzten Grassilagen	6
3.1.3	Freie AS- (fAS) und AS-Gesamtgehalte sowie prozentuale Anteile der fAS an den Gesamt-AS-Gehalten in den untersuchten Grassilagen	6
3.2	Beeinflussung der mikrobiellen Population im Pansensaft und der Pansenfermentation in vitro durch Grassilagen mit unterschiedlichen Reineiweißanteilen am Rohprotein	7
3.2.1	pH-Wert bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01	7
3.2.2	Mikrobielle Population: Nukleobasen und Protozoenzahl bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01	7
3.2.3	Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01	8
3.2.4	Veränderungen im Stickstoffstoffwechsel bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01	8
<b>4</b>	<b>Abschließende Beurteilung</b>	10
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	11
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	11
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis des Anhangs</b>	13
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	15

## 1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Seit dem Jahr 2000 wird in Deutschland über den „Viszeralen Botulismus“ bzw. die „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ berichtet. Die Krankheitszeichen sind ähnlich: Tiere sind chronisch krank, wobei besonders häufig Kühe während der ersten Laktation betroffen sind. Klinisch fallen folgende Symptome auf: verminderte Milchleistung, erhöhter Zellgehalt in der Milch, erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen, vermehrt Lahmheiten, Geburtsprobleme, Nachgeburtsverhaltungen, Sterilitäten, Verdauungsstörungen, erhöhter Anteil festliegender Kühe zu atypischen Laktationsstadien, Abmagerung und plötzliche Todesfälle. Untersuchungen auf Stoffwechselerkrankungen bzw. latente Pansenazidosen oder Hypocalcämien verlaufen negativ.

Beim „Viszeralen Botulismus“ soll es analog zur Pathogenese des Botulismus beim menschlichen Säugling zu einer Besiedlung der unteren Darmabschnitte mit *Clostridium botulinum* kommen. Eine kontinuierliche Resorption geringer Mengen des Botulinumtoxins führe zu dem oben beschriebenen Krankheitsbild (Böhnel et al. 2001).

Eine weitere Hypothese zur Ätiologie der beschriebenen Symptomatik besteht darin, dass die Verfütterung von Grassilage mit reduzierten Reineiweißanteilen am Rohprotein und teilweise auch an Vitamin E zur Entstehung des Krankheitsbildes führt. Die entsprechende Erkrankung wird als „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ definiert (Eicken 2005 a).

### 1.1 Stand der Wissenschaft vor Beginn der Studien

Untersuchungen von Heimbeck et al. (2002), Coenen et al. (2004) und Eicken (2005 a) hatten Hinweise auf veränderte Aminosäuregehalte in betroffenen Grassilagen aus Betrieben mit dem Krankheitsbild „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ geliefert. Des Weiteren zeigten Vorversuche, die im Jahr 2006 im Pansenlabor der Klinik für Rinder mit veränderten Grassilagen mittels RUSITEC durchgeführt wurden, erhebliche Beeinflussungen des ruminalen N-Stoffwechsels.

### 1.2 Projektplanung

Ziel dieser Untersuchung war die Klärung der Frage, welchen Einfluss die Eiweißqualität (prozentualer Reineiweißanteil am Rohproteingehalt) von Grassilagen auf das bisher unter „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ beschriebene Krankheitsgeschehen in Milchkuhbeständen hat. Dazu wurde überprüft, ob die Pansenfermentation nach Fütterung von sog. Schad- gegenüber Kontrollgrassilagen unter in vitro Bedingungen verändert ist. Erfasst wurden Parameter des Stickstoff- und Kohlenhydratwechsels, die Bakterienmasse sowie die Protozoenzahl und der pH-Wert im Pansensaft. Die Versuche wurden mit dem künstlichen Pansen (Rumen Simulation TECnique) durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsablauf

In insgesamt 18 Versuchsläufen à 28 Tagen wurden zehn Grassilagen, die aus von der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ betroffenen Betrieben stammten, und sieben Kontrollgrassilagen aus erkrankungsfreien Betrieben im RUSITEC inkubiert (s. GAST 2010). Der Ablauf eines einzelnen Versuchslaufes kann Abbildung A.1 entnommen werden.

Die Grassilagen aus erkrankten Betrieben, im Folgenden als Schadgrassilagen (S-02 bis S-13, s. Tab. A.1) bezeichnet, wiesen mehrheitlich Reineiweißanteile am Rohprotein unter 50 % auf, während bei fast alle Kontrollgrassilagen die Reineiweißanteile am Rohprotein über 50 % lagen. Tabelle A.1 ist der Einsatz der einzelnen Grassilagen im RUSITEC zu entnehmen, Tabelle A.2 zeigt den Probenentnahmeplan im Rahmen dieses Projektes.

### 2.2 Reineiweiß

Als Reineiweiß wird in Deutschland eine chemisch heterogene Gruppe von Substanzen definiert, die entweder mit Kupfersulfat- oder Tanninlösung fällbar ist (VDLUFA-Methoden nach Barnstein 1900 bzw. Mothes 1926). Unklar ist, welcher Natur alle im „Reineiweiß“ enthaltenen Verbindungen sind und ob tatsächlich alle Proteine im eigentlichen Sinn (Polypeptidketten) gefällt und erfasst werden. Im amerikanischen Raum wird im Rahmen des Cornell Net Carbohydrate and Protein Systems (CNCPS) das Verhalten einzelner N-Fractionen gegenüber chemischen Agentien genutzt (Sniffen et al. 1992), um die Reineiweißfraktion quantitativ zu erfassen. Letztere umfasst mit Trichloressigsäure oder Wolframsäure (Van Soest 1994) fällbare Verbindungen. Hierzu zählen u. a. neben Proteinen auch zellwandgebundene, hitzedenaturierte und an Tannine gebundene Proteine. Nicht als Reineiweiß erfasst werden niedermolekulare NPN-Verbindungen der sog. A-Fraktion wie Harnstoff (Südekum et al. 2005), Aminosäuren, Peptide (Südekum et al. 2005; bis zwei bzw. zehn Aminosäuren Länge), Ammoniak und Nitrat (Chalupa u. Sniffen 1996) sowie Nukleinsäuren, Amide und Amine (Nolan 1993).

### 2.3 Analyse der eingesetzten Grassilagen

Die Analysen der in den Versuchen eingesetzten Futtermittel erfolgten durch das Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Die Ergebnisse der Analysen können den Tabellen A.3 und A.4 entnommen werden.

Die Reineiweißgehalte der Grassilagen wurden darüber hinaus in verschiedenen Laboren nach den VDLUFA- Richtlinien (Methode 4.4.1; und 4.4.2; Fällung mittels alkalischer Kupfersulfat- bzw. Tanninlösung) bestimmt.

Die Analytik der Gehalte freier Aminosäuren und der Gesamtaminosäuregehalte in den eingesetzten Grassilagen erfolgte durch die Fa. Evonik. (s. Tab. A.5 bis A.7).

### 2.4 Analytik der Proben der RUSITEC-Versuche

#### 2.4.1 Bestimmung des pH-Werts

Die Bestimmung des pH-Werts erfolgte mit einem pH-Meter der Fa. WTW (Typ pH 9.1) in 10 mL frisch entnommener Fermenterflüssigkeit. Als Elektrode kam die pH-Elektrode Blue Line 22 pH der Fa. Schott zum Einsatz.

## 2.4.2 Untersuchung der mikrobiellen Population

### 2.4.2.1 Konzentrationen einzelner und aller Nucleobasen als Indikator für die Bakterienmasse

Die Aufbereitung der Pansensaftproben zur Messung der Nucleobasen Cytosin, Uracil, Guanin, Adenin und Thymin erfolgte wie bei Janson (2001) und Chawanit (2003) beschrieben. Zur eigentlichen Messung wurde ein HPLC-System genutzt, Die Chromatogrammauswertung wurde mit dem Programm Class-LC10 Vers.1.6 (Shimadzu<sup>®</sup>) durchgeführt (s. Gast 2010).

### 2.4.2.2 Protozoenzahlen

Die Protozoenzahlen im Pansensaft wurden mit Hilfe des „Cell Counter and Analyzer Systems“ (CASY<sup>®</sup>, Model TT) der Fa. Innovatis AG ermittelt. Informationen zu Probengewinnung und -aufbereitung können Gast (2010) entnommen werden.

Eine Speziesbestimmung ist bei dem verwendeten Verfahren nicht möglich, wohl aber eine Einteilung der erfassten Protozoen entsprechend ihrer Größe (Einteilung in sog. Countklassen, Ckl):

Ckl 1:	17 µm	-	20 µm
Ckl 2:	>20 µm	-	40 µm
Ckl 3:	>40 µm	-	60 µm
Ckl 4:	>60 µm	-	80 µm
Ckl 5:	>80 µm	-	100 µm
Ckl 6:	>100 µm	-	120 µm

## 2.4.3 Beurteilung des Kohlenhydratstoffwechsels

### 2.4.3.1 Tägliche Produktionen an flüchtigen Fettsäuren

Die Messung der Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren Essig-, Propion-, n-Butter-, n-Valerian-, und Hexansäure erfolgte gaschromatographisch mit Hilfe eines Zweikanalgaschromatographen (Shimadzu Typ GC-9AM, Kyoto, Japan) mit Flammenionisationsdetektor.

Die täglichen Produktionen einzelner flüchtiger Fettsäuren wurden in der Folge rechnerisch aus ihrer Konzentration in der Überstandsflüssigkeit und dem Überstandsvolumen bestimmt.

### 2.4.3.2 Cellulaseaktivität

Die Cellulaseaktivitätsbestimmung erfolgte photometrisch (Enzym-Substrat-Reaktion) in festem Fermenterinhalt nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC (Rückstände in den Futterbeuteln).

#### 2.4.4. Beurteilung des Stickstoffstoffwechsels

##### 2.4.4.1 Ammoniakkonzentration

Die Messung erfolgte in 10 mL Pansensaft nach Zulage von 10  $\mu$ L 10M NaOH (hergestellt aus NaOH der Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland, Best.-Nr. 1064679010) mit Hilfe einer Ammoniakmesselektrode und einem Ammoniak-Analyzer (Typ 9512 bzw. 290A, beide Geräte Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, vormals Orion®).

##### 2.4.4.2 Produktionen an flüchtigen i-Fettsäuren

Die Messung der flüchtigen i-Fettsäuren erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie die der übrigen flüchtigen Fettsäuren (s. Kap. 2.4.3.1).

##### 2.4.4.3 Gehalt an bakteriellem Protein

Die Bestimmung des bakteriellen Proteingehalts im Pansensaft erfolgte nach Isolierung der bakteriellen Fraktion und Freisetzung der bakteriellen Proteine (modifiziertes Zentrifugationsverfahren nach Smith u. McAllan 1974, s. Elias 1999) photometrisch nach Bradford (1976).

##### 2.4.4.4 Konzentrationen freier Aminosäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen freier Aminosäuren in der Fermenterflüssigkeit erfolgte nach Enteiweißung und Zentrifugation mit Hilfe eines HPLC-Gradientensystems. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Class-LC 10 (Vers. 1.6, Fa. Shimadzu ®; s. auch Kap. 2.4.2.1).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Grassilagen

##### 3.1.1 Nährstoffzusammensetzung der Schad- und Kontrollgrassilagen

Die Nährstoffzusammensetzungen der Grassilagen sind den Anhangstabellen A.3 und A.4 zu entnehmen. Die meisten Schadgrassilagen wiesen gegenüber den Kontrollgrassilagen einen niedrigeren Reineiweißanteil am Rohprotein auf, unterschieden sich aber hinsichtlich der anderen bestimmten Parameter nicht von den Kontrollgrassilagen.

**In keiner der eingesetzten Grassilagen konnten vom Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit Toxingene von Clostridium botulinum Typ A-F nachgewiesen werden.**

##### 3.1.2 Zur Ermittlung der Reineiweißgehalte in den eingesetzten Grassilagen

In Voruntersuchungen der LUFA wies die Grassilage K-01, die aus einem erkrankungsfreien Milchviehbetrieb stammte, einen RE-Gehalt von 129 g/kg TS, entsprechend einem Reineiweißanteil von 83,2 % am Rohproteingehalt, auf. Diese Grassilage wurde als Standardkontrolle für die RUSITEC-Versuche ausgewählt. In einer vom Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (s. Tab. A.3) wiederholten Untersuchung konnte der sehr hohe prozentuale RE-Anteil jedoch nicht bestätigt werden<sup>1</sup>. Möglicherweise sind unterschiedliche Trocknungsverfahren vor der eigentlichen RE-Bestimmung oder lagerungsbedingte Veränderungen (unterschiedliche Probennahmeterminale und -orte) Ursache der differierenden Analyseergebnisse. Bei Anwendung gleicher Trocknungsverfahren scheinen die Ergebnisse der Messungen nach VDLUFA-Methode 4.4.1, die nach Barnstein (1900) erfolgt, aber reproduzierbar zu sein. Nach der Methode von Mothes (1925; VDLUFA-Methode 4.4.2; Proteinfällung mit Tanninlösung) ermittelte RE-Gehalte liegen bei den untersuchten Grassilagen nur leicht unter denen, die nach Barnstein (1900) bestimmt wurden.

##### 3.1.3 Freie AS- (fAS) und AS-Gesamtgehalte sowie prozentuale Anteile der fAS an den Gesamt-AS-Gehalten in den untersuchten Grassilagen

Alle Schadgrassilagen, mit Ausnahme von S09, wiesen im Vergleich zu K01 höhere fAS-Gehalte auf (g/kg Trockensubstanz; s. Tab A.5 bis A.7). Bei S08 und S12, die hohe prozentuale Reineiweißgehalte am Rohprotein aufwiesen (59,7 und 58,5 %), sind die höheren fAS-Gehalte vermutlich auf die hohe Konzentrationen an N-Verbindungen zurückzuführen (221 und 277 g/kg TS). Bei S09 war der N-Abbau vermutlich schon soweit fortgeschritten, so dass auch die freien Aminosäuren bereits zuvor abgebaut worden waren (Abb. 1).

---

<sup>1</sup> beide RE-Bestimmungen nach dem gleichen VDLUFA-Verfahren durchgeführt



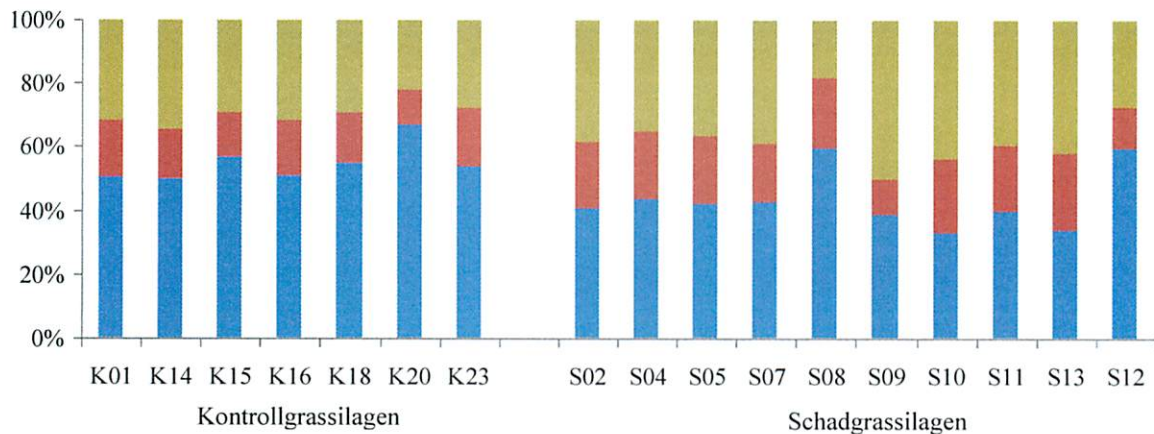


Abb. 1: Prozentuale Anteile am Rohprotein von Reineiweiß (■), fAS (■) und Nicht-Protein-Stickstoff (■, excl. fAS) in den Kontroll- und Schadgrassilagen.

Die AS-Gesamtgehalte der Schadgrassilagen korrelierten zwar mit den Rohproteingehalten ( $r = 0,93$ ), ein genauso eindeutiger Zusammenhang mit Reineiweißgehalten ( $r = 0,85$ ) bzw. Reineiweißanteilen am Rohprotein bestand aber nicht ( $r = 0,67$ ).

Alle Schadgrassilagen wiesen bis auf S09 höhere prozentuale Anteile freier Aminosäuren am Gesamtaminosäuregehalt auf als K01. In S09 war der N-Abbau möglicherweise schon so weit fortgeschritten, dass bereits freie Aminosäuren abgebaut wurden, und nicht mehr akkumulieren konnten. In S08 und S12 waren die prozentualen Reineiweißgehalte am Rohprotein (59,7 und 58,5 %) so hoch, dass die fAS-Anteile dementsprechend niedriger lagen (s. Abb. 1).

### 3.2 Beeinflussung der mikrobiellen Population im Pansensaft und der Pansenfermentation in vitro durch Grassilagen mit unterschiedlichen Reineiweißanteilen am Rohprotein

#### 3.2.1 pH-Wert bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01

Bei Inkubation des RUSITEC Schad- im Vergleich zu Kontrollgrassilagen änderte sich der ruminale pH-Wert nur geringfügig. Die **pH-Werte** lagen in allen Fällen mit Werten von 6,51 bis 6,86 im pansenphysiologischen Bereich (s. Gasteiner et al. 2010).

#### 3.2.2 Mikrobielle Population: Nukleobasen und Protozoenzahl bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01

Die **Nukelobasengesamtgehalte** als Indikator der Bakterienmasse nahmen bei Inkubation mit fünf der Schadgrassilagen im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen deutlich zu, während sich bei den anderen fünf Schadgrassilagen kaum Unterschiede zeigten. Der Nukelobasengehalt war bei der Schadgrassilage S-04 nahezu doppelt hoch wie bei der Kontrollgrassilage. Auch bei den Schadgrassilagen S-05, S-08, S-11 und S-12 waren deutliche Zunahmen (18 bis 43 %) in den Nukelobasengehalten gegenüber der Kontrollgrassilage zu verzeichnen. Bei den übrigen Schadgrassilagen lagen die relativen Veränderungen der Nukelobasengehalte gegenüber den Kontrollgrassilagen unter 10 % (s. Tab. A.9).

Unterschiede im Mengenverhältnis einzelner Nukleobasen zueinander deuten drüber hinaus auch auf qualitative Veränderungen innerhalb der Bakterienpopulation hin. Die Veränderungen sind aber geringen Ausmaßes, so dass daraus zunächst gefolgert werden kann, dass die



Schadgrassilagen einen eher geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakterienpopulation hatten.

Die **Protozoenzahl**, die nach Zulage von sechs Schadgrassilagen bestimmt wurde, war in allen Fällen gegenüber der Kontrollgrassilage reduziert. Der relative Unterschied lag zwischen -3 und -21 % (s. Tab. A.9).

### 3.2.3 Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01

Die Zugabe von Schadgrassilagen hatte gegenüber K-01 nur vereinzelt Auswirkungen auf die täglichen Produktion der flüchtigen Fettsäuren **Essig-** und **Propionsäure** (s. Tab. A.10). Dies deckt sich auch mit den Untersuchungen der Grassilagereste nach 48 Stunden Verdauung im RUSITEC (s. Anlage der Ergebnisse des Instituts für Tierernährung).

Hinsichtlich der Propionsäureproduktion ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da die täglichen Stärkgaben im Wesentlichen über die Zugabe von Kraftfutter während des gesamten Versuches konstant gehalten wurden. Auffällig war die geringgradige Zunahme der Essigsäureproduktion nach Inkubation mit den Schadgrassilagen bei gleichzeitig erniedrigter **Cellulaseaktivität** nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC. Es kann daraus gefolgert werden, dass es unter dem Einfluss der Schadgrassilagen zunächst zur Aktivitätssteigerung der celluloseabbauenden Mikroorganismen gekommen sein muss. Selbiges bedingte trotz erniedrigter Cellulaseaktivität in den Proben der Futterreste eine ähnliche Abbaubarkeit der untersuchten Grassilagen (s. auch Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung; Abb. A.2 bis A.15).

Erhebliche Veränderungen gegenüber K-01 konnten hingegen bei den länger-kettigen flüchtigen Fettsäuren **n-Butter-, n-Valerian- und Hexansäure** festgestellt werden: die n-Buttersäureproduktion war um 4 bis 40 % erhöht, sehr hohe Differenzen wurden auch bei der n-Valerian- (+16 bis +73 %) und Hexansäure (+18 bis +139 %) gemessen (s. Tab. A.10). Diese Unterschiede sind als weitere Hinweise auf erhebliche Verschiebungen im Pansenstoffwechsel, entweder bedingt durch die bereits beschriebenen Veränderungen in der Pansenbakterien- und Protozoenpopulation (s. Nukleobasen, Kap. 3.2.2) oder lediglich durch eine Änderung der Stoffwechselwege, zu werten. Gegen die letztgenannte Vermutung spricht aber die relativ hohe Spezialisierung der Pansenmikroorganismen auf bestimmte Stoffwechselvorgänge (Hungate 1966; Ogimoto u. Imai 1981; Marounek et al. 1989).

Zusammengefasst zeigt die nur moderat veränderte **Gesamtproduktion der flüchtigen Fettsäuren** (-1 bis +28 %, s. Tab. A.10), dass Grassilagen mit erniedrigten Reineiweißanteilen am Rohprotein keine erheblichen Auswirkungen auf die Energiebilanz des Pansens haben. Jedoch kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des Fettsäuremusters. Die Erhöhung von n-Butter-, n-Valerian- und Hexansäureproduktionen könnte auf erhöhte Aktivitäten bestimmter Bakterien zurückzuführen sein, da nur einzelne Bakterienarten wie *Megasphaera elsdenii*, *Eubacterium limosum* oder auch *Eubacterium pyruvativorans* diese flüchtigen Fettsäuren bilden können.

### 3.2.4 Veränderungen im Stickstoffstoffwechsel bei Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC gegenüber Kontrollgrassilage 01

Die **Ammoniakkonzentrationen** stiegen nach der Zugabe von Schadgrassilagen gegenüber Kontrollgrassilagezulagen an (s. Tab. A.11), wobei die relativen Zunahmen mit 6 bis 81 % stark differierten. Dementsprechend stiegen auch die Produktionen der **flüchtigen i-Fettsäuren**, die im Eiweißstoffwechsel entstehen (i-Butter- und i-Valeriansäure), bei Zulagen von Schadgrassilagen im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen deutlich an (i-Buttersäure: +14 bis 65 %; i-Valeriansäure: +4 bis 97 %).

Die Wirkung einzelner Schadgrassilagen auf die Zusammensetzung des fAS-Pools im künstlichen Pansen kann durch die vorliegenden Ergebnisse noch nicht abschließend beurteilt werden. Die Messergebnisse der fAS sind sehr heterogen und zeigen kaum Ähnlichkeiten auf, da die Verschiebungen wahrscheinlich das Resultat komplexer biochemischer und biologischer Prozesse sind, die anhand der bisher erhobenen Parameter nicht nachvollzogen werden können. Auch hatte die Inkubation der Schadgrassilagen im RUSITEC im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen keine einheitlichen Auswirkungen auf den **Gehalt bakteriellen Proteins** im Pansensaft. Die relativen Veränderungen lagen zwischen -18 und +17 %. Die Erhöhungen waren bei bestimmten Schadgrassilagen (u. a. S-05) geringer als erwartet (s. Rohproteingehalte, Tab. A.3 und A.4). Denkbar ist, dass hierfür die Akkumulation bakteriell nicht nutzbarer, nicht detektierter N-Verbindungen ursächlich ist. Die gestiegenen Konzentrationen an Ammoniak und i-Säurenproduktionen lassen hingegen vermuten, dass desaminierende Spezies wie *Megasphaera elsdenii* und gegebenenfalls auch HAP-Bakterien bei Zulagen der Schadgrassilagen vermehrt metabolisch aktiv waren. Proteo- und Peptidolyten hingegen fehlten möglicherweise wichtige N-haltige Substrate (bestimmte Proteinbruchstücke, Peptide etc.) bzw. waren ihnen nicht zugänglich. Wenn es nicht, wie bei S04-Zulagen, zu sehr starker Vermehrung der desaminierenden Bakterien kam (Hinweise durch erhöhte Nukleobasen- und Protein- sowie stark gestiegene Ammoniakkonzentrationen und i-Säureproduktionen, s. Tab. A9 und A11), waren niedrige Gehalte bakteriellen Proteins im Pansensaft die Folge (erhöhter Proteinturnover infolge Desaminierung).

Nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass eine (temporäre) energetische Unterversorgung spezieller Bakteriengruppen zu bestimmten Zeitpunkten die Proteinsynthese hemmte (s. Produktionen der flüchtigen Fettsäuren und Rohproteingehalte der eingesetzten Grassilagen, Tab. A.10 und Tab. A.4), während desaminierende Spezies weiterhin Energie aus dem Abbau von AS gewinnen konnten. Alleinige Ursache für die Veränderungen im ruminalen Eiweißstoffwechsel im Pansensaft ist die unzureichende Energieverfügbarkeit aber vermutlich nicht. Darüber hinaus deutet die Erholung von an der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ erkrankten Beständen durch die zusätzliche Fütterung von RE-reichem Sojaschrot darauf hin, dass tatsächlich die Supplementierung bestimmter, bisher unbekannter Proteinkomponenten für die Rekonvaleszenz entscheidend ist (Eicken 2005 b).

Die beobachteten Veränderungen im Proteinstoffwechsel im Pansensaft sind jedoch vermutlich ebenfalls zu gering, um allein verantwortlich für die Ätiologie der „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ zu sein. Jedoch kann eine ineffiziente mikrobielle Proteinproduktion durchaus zu marginalen Proteinmangelzuständen bei Wiederkäuern mit hoher Milchleistung führen und relativ zum ME-Gehalt der Ration eine inadäquate Absorption bestimmter, essentieller AS bedingen (Nolan u. Dobos 2005).

#### 4 Abschließende Beurteilung

Durch Schadgrassilagen kommt es zu quantitativen (Bakterienzunahme, Protozoenabnahme) und qualitativen Veränderungen innerhalb der mikrobiellen Population im Pansensaft (s. Nukleobasen, Protozoenkonzentration, Verschiebungen im flüchtige Fettsäurenmuster, Ammoniakkonzentration und i-Säurenproduktionen). Der ruminale Kohlenhydratstoffwechsel wird nur geringgradig, der Eiweißstoffwechsel hingegen deutlich beeinflusst.

Die beobachteten Veränderungen im Pansenmilieu schränken möglicherweise die Abwehrfunktion des Pansens gegenüber exogenen Noxen, wie z.B. Fremdbakterien, ein. Die herabgesetzte ruminale Barrierefunktion könnte so maßgeblich an der Ätiologie des unspezifischen Krankheitsbildes in Zusammenhang mit der Verfütterung von Grassilagen mit erniedrigten Reineiweißanteilen am Rohprotein beteiligt sein.

Darüber hinaus besteht die Vermutung, dass einzelne, im Pansen entstehende Peptidabbauprodukte möglicherweise für einige der klinischen zentralnervösen Symptome verantwortlich sein könnten. Selbige werden gegenwärtig identifiziert.

#### 5 Ausblick

In den letzten Monaten wurden neben Grassilagen aus betroffenen Milchviehbetrieben auch Serumproben erkrankter Rinder untersucht. Bei einigen dieser Tiere konnten bisher nicht näher identifizierte Substanzen gefunden werden, die in ihrem analytischen Verhalten mehreren aus den Grassilagen gewonnenen Analyten ähneln. Hierzu ist ein neues Projekt Anfang 2011 gestartet worden.

Darüber hinaus hat sich unter Leitung der Klinik für Rinder ein Konsortium aus verschiedenen Institutionen an der Ausschreibung "Bedeutung von Clostridium botulinum bei chronischen Krankheitsgeschehen" der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung beteiligt [Clostridium botulinum im Pansen (Klinik für Rinder, Pansenlabor), Interaktionen zwischen Grassilagen und Pansenprotozoen (Institut für Tierernährung der Veterinärfakultät Universität Leipzig), Clostridium botulinum in Problembetrieben (Klinik für Rinder u. Außenstelle für Epidemiologie), Clostridium botulinum im epidemiologischen Zusammenhang mit Biogasstandorten (Außenstelle für Epidemiologie), Diagnose Botulismus in Rinderbeständen und die Beziehung zum Menschen (Klinik für Rinder u. Ripac Labor/ Dr. H. Köhler sowie Abteilung Neurologie der Klinik für Kleintiere), Clostridium botulinum in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Institut für Lebensmittelsicherheit und -qualitätssicherung - LMQS), Clostridium botulinum beim Menschen (Medizinische Hochschule Hannover)].

## 6 Literatur

- Barnstein, F. (1900): Über eine Modifikation des von Ritthausen vorgeschlagenen Verfahrens zur Eiweißbestimmung. Landwirtsch. Versuchsstn. 54, 327 - 336
- Böhnel, H., B. Schwagerick, F. Gessler (2001): Visceral botulism – a new form of bovine Clostridium botulinum toxication. J. Vet. Med. a. Physiol. Pathol. Clin. Med. 48, 373 - 383
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248 - 254
- Chalupa, W., C. J. Sniffen (1996): Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle – today and tomorrow. Anim. Feed Sci. Technol. 58, 65 - 75
- Chawanit, M. (2003): Wirkung anionischer Futterzusätze auf Protein-, Lipid- und Thiaminstoffwechsel im Pansensaft des Rindes (in vitro). Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Coenen, M., K. Eicken, S. Kock (2004): „Fortbildungsveranstaltung zur Milchviehfütterung“, Hannover, 27.02.2004
- Eicken, K. (2005 a): Mögliche gesundheitlichen Problem von Milchkühen bei Grassilage-betonten Rationen. Nutztierpraxis Aktuell 13, 13 - 16
- Eicken, K. (2005 b): Erfahrungen aus der tierärztlichen Praxis bei Umsetzung bestimmter, gezielter Fütterungsempfehlungen. Nutztierpraxis Aktuell 14, 56 - 59
- Elias, K. (1999): Ruminale Fermentation unter chronisch-azidotischen Bedingungen (*in-vitro*) bei unterschiedlicher Vitamin B<sub>1</sub>-Verfügbarkeit. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Gast, A. (2010): Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffälligen Reineiweißgehalten auf die Zahl der Bakterien und der Protozoen im Pansensaft (in vitro). Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Gasteiner 2010: Gesundheitsprobleme beim Einsatz von Grassilagen in Milchviehbeständen – Clostridium botulinum. [www.tieraerztekammer-schleswig-holstein.de/fileadmin/pdf/Husum.pdf](http://www.tieraerztekammer-schleswig-holstein.de/fileadmin/pdf/Husum.pdf)
- Heimbeck, W., M. Coenen, K.-H. Südekum, L. Hogeback, S. Höpken, K. Eicken (2002): Nutrient content and protein quality in grass silages with regard to their utilisation in rations for high-yielding dairy cows, WBC Hannover
- Hungate, R. E. (1966): The rumen and its microbes. Academic Press
- Janson, C. (2001): Einfluss von mit Cladosporium herbarum bzw. Fusarium graminearum künstlich verpilztem Heu auf Fermentation und Thiaminstoffwechsel im Pansen des Rindes (in vitro). Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Marounek M., K. Fliegerova, S. Bartos (1989): Metabolism and some characteristics of ruminal strains of Megasphaera elsdenii. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1570 - 1573
- Moths K. (1925): Ein Beitrag zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen (unter Ausschluss des Keimlingstadiums und unter besonderer Berücksichtigung der Säureamide. Planta 1, 472 - 552
- Nolan, J. V. (1993): Nitrogen kinetics. in: J. M. Forbes, J. France (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CAB International, 123 - 143
- Nolan, J. V., R. C. Dobos (2005): Nitrogen transactions in ruminants. in: J. Dijkstra, J. M. Forbes, J. France (Hrsg.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CAB International, 177 - 206
- Ogimoto, K., S. Imai (1981): Atlas of rumen microbiology, Japan Scientific Soc. Press

Sniffen C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, J. B. Russell (1992): A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 2. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci. 70, 3562 - 3577

Südekum, K.-H., M. Pries, E. Leisen (2005): Charakterisierung des Proteinwertes von siliertem Grünfütter: Ein Beitrag zur Verbesserung der Proteinversorgung von Milchkühen im ökologischen Landbau.  
[http://www.oekolandbau.nrw.de/pdf/projekte\\_versuche/leitbetriebe\\_2005/37\\_proteinwert\\_fuetterung.pdf](http://www.oekolandbau.nrw.de/pdf/projekte_versuche/leitbetriebe_2005/37_proteinwert_fuetterung.pdf)

Van Soest, P. J. (1994): Nitrogen metabolism. in: P. J. Van Soest: Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, 290 - 311

**7            Abbildungs- und Tabellenverzeichnis des Anhangs**

- Abb. A.1:      Verschiedene Versuchsphasen während eines RUSITEC-Laufs
- Tab. A.1:      Einsatz der verschiedenen Grassilagen im RUSITEC während der Zulagephase
- Tab. A.2:      Probenentnahmeplan und Beladung des RUSITEC während der Versuchsläufe des Hauptversuchs.
- Tab. A.3:      Nährstoffgehalte der verwendeten Kontrollgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- Tab. A.4:      Nährstoffgehalte der verwendeten Schadgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)
- Tab. A.5:      Aminosäuregesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt [%] in den Kontrollgrassilagen
- Tab. A.6:      Aminosäuregesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt AS- Gehalte [%] in den Schadgrassilagen S-02, S-04, S-05, S-07 und S-08
- Tab. A.7:      Aminosäuregesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt [%] in den Schadgrassilagen S-09, S-10, S-11, S-13 und S-12
- Tab. A.8:      Prozentuale Veränderung des pH-Wertes während der Zulagephase gegenüber der jeweiligen Kontrolle
- Tab. A.9:      Parameter der mikrobiellen Populationszusammensetzung:  
Prozentuale Veränderung einzelner Nukleobasen, der Nukleobasengesamtkonzentration (Indikatoren für die Bakterienmasse) und der Protozoenzahlen im Pansensaft während der Zulage von Schadgrassilagezulagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle
- Tab. A.10:     Parameter des Kohlenhydratstoffwechsels:  
Prozentuale Veränderung der täglichen Produktionen einzelner flüchtiger Fettsäuren, ihrer Summe und der Cellulaseaktivität während der Zulage von Schadgrassilage gegenüber der jeweiligen Kontrolle
- Tab. A.11:     Parameter des N-Stoffwechsels:  
Prozentuale Veränderung der Ammoniakkonzentration, der Gehalte bakteriellen Proteins, der i-Flüchtige Fettsäurenproduktion und der Gesamtkonzentration der freien Aminosäuren sowie einzelner Aminosäuren im Pansensaft während der Zulage von Schadgrassilagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle
- Abb. A.2/3    Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohfasergehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.4/5: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.6/7: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.8/9: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.10/11: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.12/13: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohaschegehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC

Abb. A.14/15: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Roheiweiß- und Reineiweißgehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC



**A Anhang**

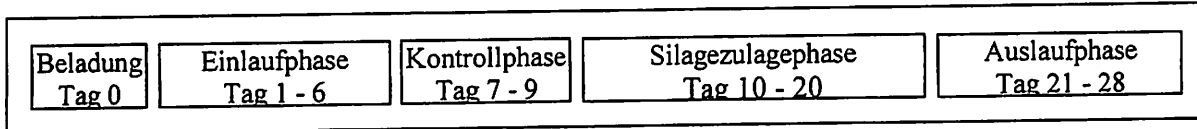


Abb. A.1: Verschiedene Versuchsphasen während eines RUSITEC-Laufs

Tab. A.1: Einsatz der verschiedenen Grassilagen im RUSITEC während der Zulagephase

Läufe	Eingesetzte Grassilage
2, 3, 4	K-01
	S-02
	S-04
5, 6, 7	K-01
	S-05
	S-07
8, 9, 10	K-01
	S-08
	S-09
11, 12, 13	K-01
	S-10
	S-11
16, 17, 18	K-01
	S-13
	S-12
14	K-16
	K-15
	K-14
15	K-18
	K-20
	K-23

K Kontroll-, S Schadgrassilage

Tab. A.2: Probenentnahmeplan und Beladung des RUSITEC während der Versuchsläufe des Hauptversuchs. Die Probenentnahme erfolgte jeweils vor der täglichen Futterzulage

Tag	Fütterung	pH	NH <sub>3</sub>	fIFS	Protein	fAS	Überstände	Cellulase	Nukleobasen
1	Heu + KF	x	x	x			x		
2	Heu + KF	x	x	x			x		
3	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
4	Heu + KF	x	x	x			x		
5	Heu + KF	x	x	x			x		
6	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
7	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
8	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
9	Grassilage + KF	x	x	x	x		x	x	x
10	Grassilage + KF	x	x	x	x		x	x	x
11	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
12	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
13	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
14	Grassilage + KF	x	x	x	x		x	x	
15	Grassilage + KF	x	x	x	x		x	x	
16	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
17	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
18	Grassilage + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
19	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
20	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
21	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
22	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
23	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
24	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
25	Heu + KF	x	x	x	x		x	x	
26	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
27	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x
28	Heu + KF	x	x	x	x	x	x	x	x

fIFS Flüchtige fettsäuren, fAS freie Aminosäuren, KF Kraftfutter; Überst. Überstand

Tab. A.3: Nährstoffgehalte der verwendeten Kontrollgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Nährstoff	Dimension	Kontrollgrassilage						
		K-01	K-14	K-15	K-16	K-18	K-20	K-23
Rohasche	g/kg TS	109	89,1	97,6	107	106	k.A.	k.A.
Rohprotein	g/kg TS	165	164	203	198	164	150	155
Reinprotein	g/kg TS	83,3	81,7	116	102	90,9	101	84,0
Reineiweiß	% von Rp	50,5	49,8	57,1	51,5	55,4	67,3	54,2
Rohfett	g/kg TS	34,1	32,8	35,3	42,1	35,3	k.A.	k.A.
Rohfaser	g/kg TS	250	275	246	262	264	k.A.	k.A.
NDF	g/kg TS	494	563	527	554	533	k.A.	k.A.
ADF	g/kg TS	305	321	286	310	311	k.A.	k.A.
pH		4,83	5,3	5,17	4,83	5,47	5,83	4,00
Trockensubstanz	g/kg uS	472	579	615	439	569	693	412
NfE	g/kg TS	209	255	257	171	245	-	-
NEL	MJ/kg TS	6,65	6,45	6,71	6,57	6,43	-	-

ADF saure Detergens-Faser; NDF neutrale Detergens-Faser; NEL Netto-Energie Laktation; NfE N-freie Extraktstoffe; Rp Rohprotein; TS Trockensubstanz; uS ursprüngliche Substanz (Frischsubstanz)

Tab. A.4: Nährstoffgehalte der verwendeten Schadgrassilagen (Analyseergebnisse des Instituts für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Nährstoff	Dimension	Schadgrassilage									
		S-02	S-04	S-05	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-13	S-12
Rohasche	g/kg TS	110	85,0	126	103	105	119	85,4	98,2	99,6	96,4
Rohprotein	g/kg TS	174	180	231	178	221	156	180	188	277	207
Reinprotein (Rp)	g/kg TS	71,0	78,9	97,0	75,8	132	61,0	60,1	74,8	162	70,6
Reineiweiß	% von Rp	40,8	43,8	42,0	42,6	59,7	39,1	33,4	39,8	34,1	58,5
Rohfett	g/kg TS	34,3	41,0	41,7	31,5	45,1	29,1	32,6	37,7	37,9	39,1
Rohfaser	g/kg TS	280	278	205	273	227	327	290	258	218	254
NDF	g/kg TS	520	496	433	520	395	610	543	523	491	481
ADF	g/kg TS	318	296	262	310	247	385	333	325	273	292
pH		4,37	4,57	k.A.	4,90	3,98	5,35	5,25	4,16	4,53	4,94
Trockensubstanz	g/kg uS	321	446	365	410	304	413	451	329	445	509
NfE*	g/kg TS	129	186	145	170	122	152	185	138	180	187
NEL**	MJ/kg TS	6,45	6,56	7,17	6,53	7,13	5,78	6,45	6,81	7,20	6,75

Abkürzungen s. Tab. A.3

Tab. A.5: Aminosäuregesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt [%] in den Kontrollgrassilagen. Gehaltsangaben sind in g/kg Trockensubstanz angegeben. Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

AS	K-01			K-14			K-15			K-16			K-18			K-20			K-23		
	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>frei</sub>
Asp	13,0	*	-	12,9	*	-	14,6		-	16,5	*	-	11,7	*	-	12,3	*	-	12,0	*	-
Glu	12,3	2,86	23	11,3	2,20	19	15,9	2,77	17	16,5	4,13	25	12,8	2,49	19	12,7	1,32	10	12,3	2,53	21
Ser	5,6	*	-	5,5	*	-	6,4		-	7,2	*	-	5,2	*	-	5,6	*	-	5,7	*	-
His	2,3	*	-	2,0	*	-	2,6		-	3,4	*	-	2,2	*	-	2,2	*	-	2,6	*	-
Gly	7,1	1,97	28	6,9	1,77	26	8,9	1,93	22	9,4	2,42	26	7,2	1,66	23	7,1	1,07	15	7,2	1,68	23
Thr	6,0	2,72	46	5,9	2,50	43	7,2	2,34	33	8,1	3,55	44	5,8	2,15	37	6,1	1,50	24	6,0	2,30	38
Ala	9,9	5,41	55	9,5	4,77	50	12,2	5,32	44	12,7	5,95	47	9,9	4,82	49	9,4	3,12	33	9,7	4,57	47
Arg	4,2	1,11	26	4,7	1,04	22	6,9	1,70	25	5,8	0,68	12	6,1	2,14	35	6,7	1,62	24	6,6	3,06	46
Val	8,3	3,94	47	8,2	3,40	42	10,1	3,57	35	10,6	4,21	40	8,2	3,30	40	8,0	2,09	26	7,9	3,27	42
Met	2,2	0,60	27	2,3	0,47	21	2,8	0,53	19	3,2	0,93	29	2,4	0,42	18	2,4	0,23	10	2,4	0,88	37
Phe	6,9	3,19	46	6,9	2,45	35	9,0	2,65	29	9,6	3,47	36	7,2	2,47	34	7,3	1,48	20	6,9	2,81	41
Ile	6,3	2,91	46	6,1	2,51	41	7,8	2,64	34	8,2	3,13	38	6,4	2,55	40	6,3	1,63	26	6,1	2,29	38
Leu	10,7	4,77	45	10,7	4,06	38	13,8	4,39	32	14,5	5,72	40	11,1	4,13	37	11,1	2,52	23	10,9	4,93	45
ΣAS	94,7	32,5	32	92,9	25,2	27	118	27,8	24	126	34,2	27	96,2	26,1	27	97,2	16,6	17	96,3	28,3	29

AS Aminosäure; AS<sub>ges</sub> Gesamtgehalt einer Aminosäure; AS<sub>frei</sub> Gehalt an einer freien Aminosäure; %AS<sub>frei</sub> freier Anteil einer AS an ihrem Gesamtgehalt;

\* Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; - Berechnung nicht möglich

Tab. A.6: Aminosäurengesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt [%] in den Schadgrassilagen S-02, S-04, S-05, S-07 und S-08. Die Gehaltsangaben sind in g/kg Trockensubstanz angegeben, die Werte für S02 und S05 beziehen sich auf gefriergetrocknetes Material. Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

AS	S-02**			S-04			S-05**			S-07			S-08		
	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>fr</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>fr</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>fr</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>fr</sub>	AS <sub>ges</sub>	AS <sub>frei</sub>	% AS <sub>fr</sub>
Asp	10,5	*	-	13,7	*	-	14,9	*	-	10,7	*	-	17,9	*	-
Glu	8,5	2,39	28	11,2	3,49	31	12,7	4,72	37	10,2	3,61	36	16,8	5,48	32
Ser	5,2	*	-	6,2	*	-	6,8	*	-	4,3	*	-	7,9	*	-
His	1,4	*	-	2,5	*	-	2,6	*	-	2,0	*	-	3,9	*	-
Gly	6,2	2,97	48	8,0	2,83	35	8,6	4,24	49	6,8	2,75	40	10,5	4,39	42
Thr	5,6	3,76	67	6,5	3,35	51	7,7	5,16	67	4,9	2,53	52	8,7	4,86	56
Ala	9,8	6,84	70	11,1	6,57	59	13,1	9,10	69	10,0	6,38	64	13,4	7,85	59
Arg	1,9	0,17	9	4,5	1,52	34	2,7	0,11	4	3,3	0,87	27	3,5	0,15	4
Val	7,8	4,92	63	9,1	4,76	52	10,3	6,19	60	8,0	4,51	56	11,6	5,82	50
Met	2,2	0,92	41	2,5	0,66	26	3,1	12,3	40	2,1	0,52	24	3,7	1,50	41
Phe	6,1	4,57	75	7,8	4,75	61	8,5	5,90	69	6,2	3,11	50	9,9	6,11	62
Ile	5,7	3,46	61	7,0	3,73	54	7,9	4,60	59	6,0	3,35	55	8,3	4,25	48
Leu	10,2	6,54	64	12,4	6,48	52	13,4	8,44	63	10,0	5,35	53	15,9	9,15	58
∑AS	81,1	36,5	45	103	38,1	37	112	49,7	44	84,5	33,0	39	132	49,6	38

AS Aminosäure; AS<sub>ges</sub> Gesamtgehalt einer Aminosäure; AS<sub>frei</sub> Gehalt an einer freien Aminosäure; %AS<sub>frei</sub> freier Anteil einer AS an ihrem Gesamtgehalt;

\* Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; \*\* Angaben auf gefriergetrocknetes Material, nicht auf TS bezogen; - Berechnung nicht möglich

Tab. A.7: Aminosäuregesamtgehalte, Gehalte freier Aminosäuren und ihrer Anteile am Gesamtaminosäuregehalt [%] in den Schadgrasslagen S-09, S-10, S-11, S-13 und S-12. Die Gehaltsangaben sind in g/kg Trockensubstanz angegeben. Die Analysen wurden durch EVONIK DEGUSSA-Amino Lab® (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) erstellt.

	S09			S10			S11			S13			S12		
	AS	fAS	% fAS	AS	fAS	% fAS	AS	fAS	% fAS	AS	fAS	% fAS	AS	fAS	% fAS
ASp	5,3	*	-	11,4	*	-	12,9	*	-	15,3	*	-	20,8	*	-
GlU	5,4	0,85	16	10,4	4,78	46	12,3	3,99	32	13,4	5,54	41	20,7	4,15	20
Ser	2,1	*	-	4,7	*	-	6,3	*	-	7,3	*	-	9,3	*	-
His	0,9	*	-	2,0	*	-	2,9	*	-	3,0	*	-	3,7	*	-
Gly	4,1	0,93	23	7,4	3,36	45	8,1	3,13	39	9,3	4,11	44	11,7	2,56	22
Thr	2,3	0,57	25	5,5	3,37	61	7,1	4,13	58	7,8	5,27	68	10,0	3,60	37
Ala	6,4	3,39	53	11,3	7,78	69	11,3	6,76	60	12,8	8,34	66	15,4	6,74	44
Arg	1,9	0,28	15	3,3	1,13	34	3,4	0,43	13	3,6	0,80	23	8,1	1,02	13
Val	6,1	3,19	52	8,7	5,41	62	9,5	4,87	51	10,5	6,23	59	13,1	4,69	36
Met	1,0	1,59	30**	2,4	0,77	31	2,8	1,19	42	3,1	1,40	45	3,7	0,36	10
Phe	3,8	1,57	41	7,0	4,34	62	7,6	4,10	54	8,5	5,08	60	11,4	3,50	31
Ile	9,3	1,72	45	6,6	4,19	63	7,2	3,65	51	8,1	4,83	60	9,9	3,45	35
Leu	6,9	2,99	43	11,2	6,77	60	12,3	6,95	57	14,0	8,38	60	17,2	5,42	31
ΣAS	55,5	17,1	31	91,9	41,9	46	104	39,2	38	117	45,0	43	155	35,5	23

AS Aminosäure; AS<sub>ges</sub> Gesamtgehalt einer Aminosäure; AS<sub>frei</sub> Gehalt an einer freien Aminosäure; %AS<sub>frei</sub> freier Anteil einer AS an ihrem Gesamtgehalt; \* Bestimmung des freien Anteils nicht möglich; \*\* Mittelwert (Rechenwert); - Berechnung nicht möglich

Tab. A.8: **pH-Wert:**  
Prozentuale Veränderung des pH-Wertes während der Zulage von Schadgrassilagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle

Parameter	Schadgrassilage									
	S-02	S-04	S-05	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-13	S-12
pH-Wert	-1,08	-1,85	+0,14	-0,39	-0,20	-0,34	-0,29	-0,31	+0,52	+1,65

Tab. A.9: **Parameter der mikrobiellen Populationszusammensetzung:**  
Prozentuale Veränderung einzelner Nucleobasen, der Nucleobasengesamtkonzentration (Gesamt-NB; Indikator für die Bakterienmasse) und der Protozoenzahlen im Pansen saft während der Zulage von Schadgrassilagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle

Parameter	Schadgrassilage									
	S-02	S-04	S-05	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-13	S-12
Gesamt-NB	+9,23	+97,4	+31,6	+9,43	+43,3	+7,04	+4,19	+19,6	-2,66	+18,7
Cytosin (%)	-0,67	-2,88	-1,94	-1,76	-5,98	-2,34	-1,36	-2,57	-0,39	-0,39
Uracil (%)	+0,85	+3,69	+8,62	-0,52	+3,05	-0,59	+2,88	+3,27	+1,85	+1,15
Guanin (%)	+0,29	+0,08	-0,23	+1,14	+1,67	+0,69	-1,97	+2,55	-0,06	-0,63
Adenin (%)	+0,03	+1,40	+1,48	+1,22	+1,89	0,34	+1,90	+3,17	-0,28	+1,12
Thymin (%)	+0,09	-1,40	-8,58	-3,54	-1,32	+2,40	+1,14	+1,97	-2,36	-0,89
Protozoen:										
Ckl. 1	-	-	-	-	-3,39	-21,1	-8,98	-11,7	-9,15	-15,6
Ckl. 2	-	-	-	-	+11,0	-39,9	-2,34	-11,2	-7,60	-24,1
Ckl. 3	-	-	-	-	-1,85	-53,6	-19,7	-38,2	-27,5	-35,8
Ckl. 4	-	-	-	-	-16,9	-57,5	-27,7	-40,3	-26,8	-32,3
Ckl. 5	-	-	-	-	-18,2	-39,8	-25,9	-31,4	-20,2	-18,1
Ckl. 6	-	-	-	-	+22,5	-22,4	-26,9	-24,1	-18,7	-25,7
Ckl. 1-6	-	-	-	-	-0,41	-21,8	-3,58	-11,9	-9,47	-18,2

Ckl Countklasse (s. Kap. 2.4.2.2); NB Nucleobasen

Tab. A.10: **Parameter des Kohlenhydratstoffwechsels:**  
Prozentuale Veränderung der täglichen Produktionen einzelner flüchtiger Fettsäuren, ihrer Summe und der Cellulaseaktivität während der Zulage von Schadgrassilagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle

Parameter	Schadgrassilage									
	S-02	S-04	S-05	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-13	S-12
Essigsäure	+7	+14	-1	-2	+3	+3	+7	-1	+8	-1
Propionsäure	+25	+22	-5	-4	+10	-2	-2	-2	+5	-13
n-Buttersäure	+8	+40	+29	+4	+28	+25	+11	+13	+4	-9
n-Valeriansäure	+30	+73	+60	+16	+60	+26	+16	+48	+17	+15
i-Buttersäure	+16	+48	+38	+14	+35	+65	+57	+42	+22	+45
i-Valeriansäure	+38	+97	+33	+4	+40	+53	+32	+31	+24	+21
Hexansäure	+29	+139	+61	+18	+49	+53	+19	+40	+9	-4
Σ flFS	+14	+28	+10	+0,5	+15	+11	+8	+7	+1	-1
Cellulaseaktivität	-24	-33	-1	-3	-36	-19	+16	-19	-33	-30

flFS flüchtige Fettsäuren



Tab. A.11: **Parameter des N-Stoffwechsels:**  
 Prozentuale Veränderung der Ammoniakkonzentration, der Gehalte bakteriellen Proteins, der i-fIFS-Produktionen und der Gesamtkonzentration der freien Aminosäuren sowie einzelner Aminosäuren im Pansensaft während der Zulage von Schadgrassilagen gegenüber der jeweiligen Kontrolle

Parameter	Schadgrassilage									
	S-02	S-04	S-05	S-07	S-08	S-09	S-10	S-11	S-13	S-12
Ammoniak	+27,5	+81,3	+41,9	+6,12	+58,8	+73,7	+19,6	+19,8	+10,8	30,3
bakterielles Protein	-10,0	+16,7	+11,0	+5,00	+10,0	+15,6	+4,05	-7,10	-17,9	-0,27
Produktionen der i-fIFS:										
i-Buttersäure	+16	+48	+38	+14	+35	+65	+57	+42	+22	+45
i-Valeriansäure	+38	+97	+33	+4	+40	+53	+32	+31	+24	+21
fAS:										
Σ fAS	+7,31	+62,2	+3,37	+13,7	+6,53	-5,35	-5,41	-8,82	-6,71	+11,8
Aspartat	+7,76	+142	+10,8	+19,3	+9,35	-19,6	-12,3	-14,5	-1,84	+26,1
Glutamat	+4,28	+34,3	+13,2	+10,1	+11,3	-13,0	-6,37	-2,20	-3,15	+14,8
Serin	+19,7	+67,2	+7,74	6,81	-17,1	+24,8	-14,5	-15,7	-27,2	+6,70
Histidin	-15,1	+164	-28,8	+46,2	-31,4	+26,8	-30,1	-54,5	-52,8	-45,0
Glycin	+12,8	+71,3	-8,59	+12,8	+17,7	+12,6	+5,95	-5,82	-12,3	+14,6
Threonin	+17,3	+97,6	+11,2	+20,9	+19,9	+9,67	-2,99	-1,32	-7,48	16,6
Alanin	+3,77	+24,0	23,2	+8,26	-17,5	-11,4	-8,29	-11,2	-4,45	+2,83
Arginin	+8,47	+70,9	+30,9	+14,5	+16,6	-6,85	-4,02	+2,38	-8,96	+0,21
Tyrosin	+14,7	+88,1	-3,42	+1,37	+15,6	+0,86	+10,5	-8,33	-14,8	+7,37
Valin	+39,0	+78,0	-4,98	+19,5	+21,3	+13,2	+13,0	-13,6	-6,23	+9,69
Methionin	+45,1	+53,0			+28,6	0,00	+20,8	-4,40	+8,52	+19,3
Tryptophan	-21,6	+94,1	+45,6	+35,3	-1,92	-7,69	+16,4	-1,46	+16,6	+33,8
Phenylalanin	-11,4	+5,61	-8,82	+9,80	-2,95	+41,7	-17,9	-5,51	+7,77	+39,2
Isoleucin	+15,3	+85,5	-22,1	+9,05	+92,4	10,3	-2,00	-29,6	+194	+1,70
Leucin	+20,9	+127	-15,5	+11,1	+29,7	+50,0	+5,50	-21,9	+25,2	+13,5

fAS freie Aminosäuren

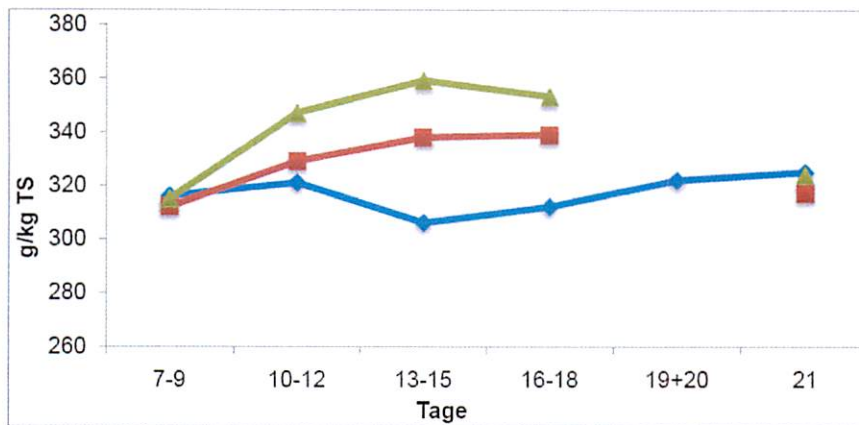


Abb. A.2: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohfasergehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-02 ▲ = S-04

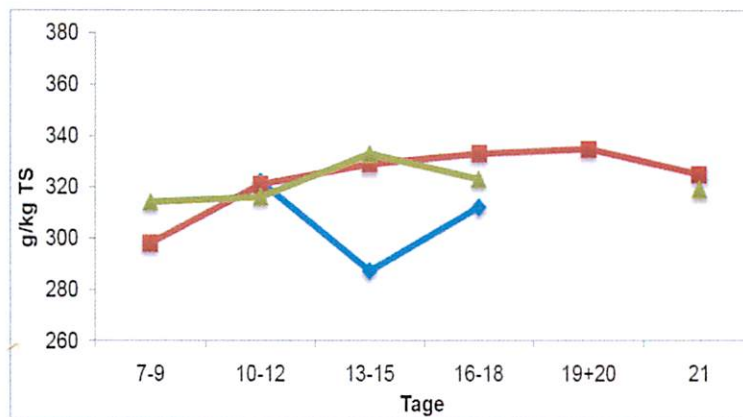


Abb. A.3: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohfasergehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-10 ▲ = S-11

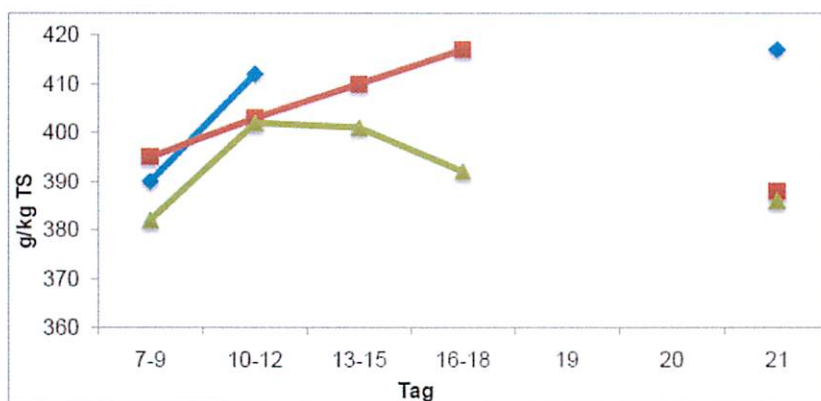


Abb. A.4: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-02 ▲ = S-04

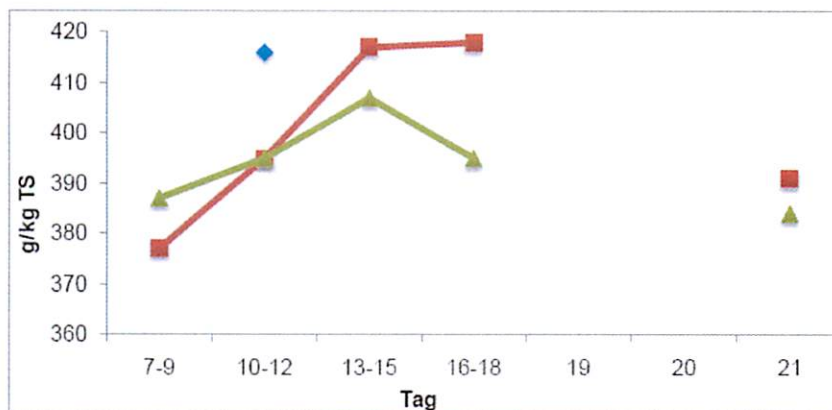


Abb. A.5: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-10 ▲ = S-11

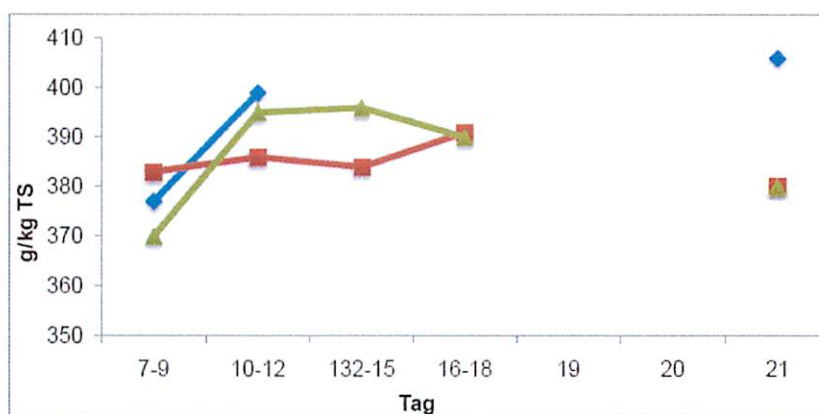


Abb. A.6: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-02 ▲ = S-04

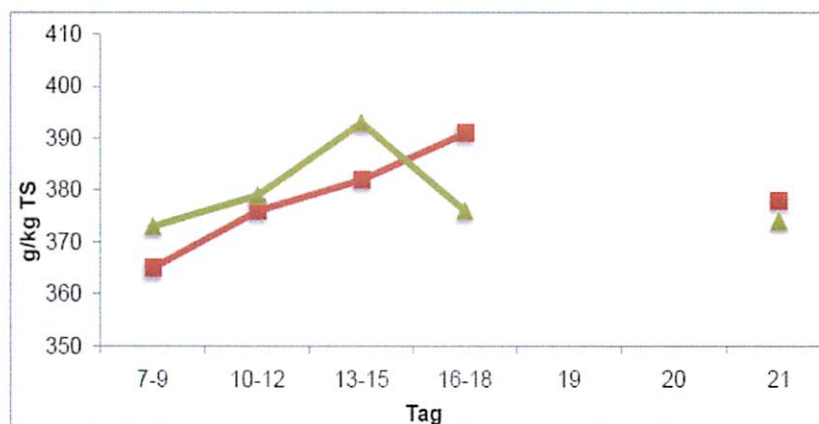


Abb. A.7: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: ADF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-10 ▲ = S-11

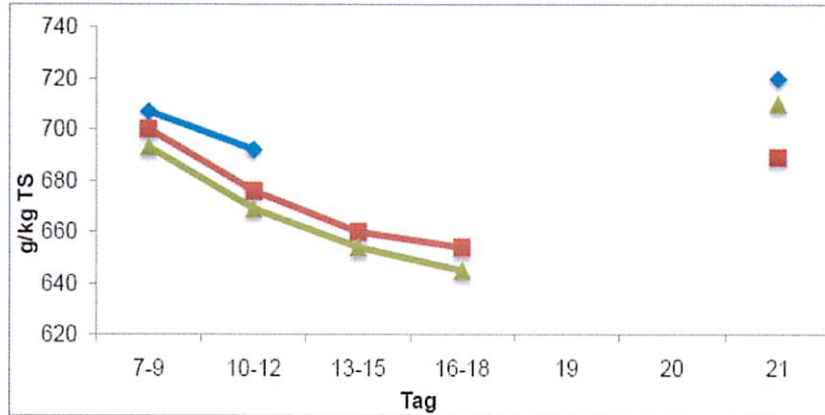


Abb. A.8: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-02 ■ = S-04

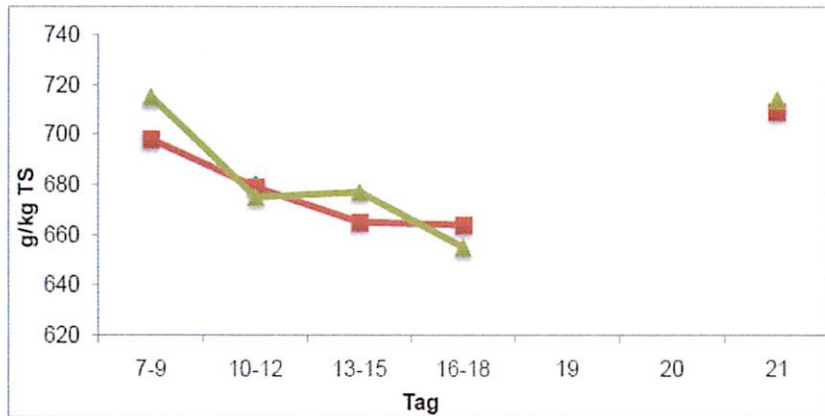


Abb. A.9: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-10 ■ = S-11

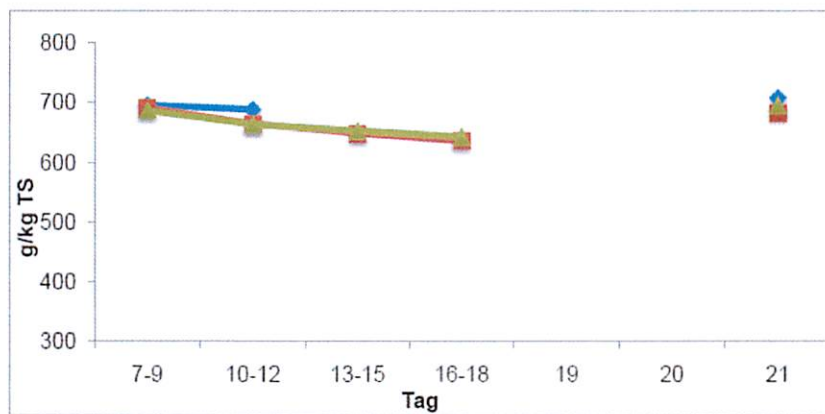


Abb. A.10: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
■ = K-01 ■ = S-02 ■ = S-04

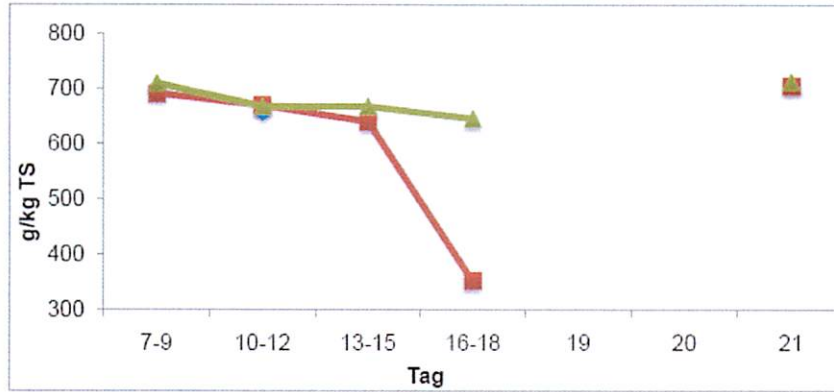


Abb. A.11: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: NDF<sub>org</sub>-Gehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-10 ■ = S-11

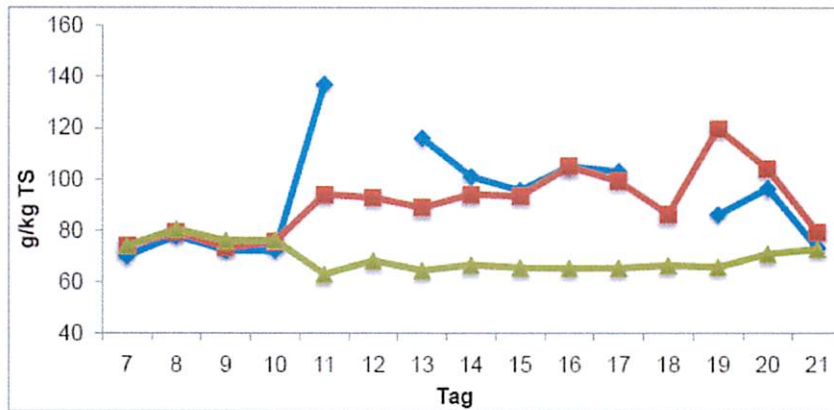


Abb. A.12: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohaschegehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-02 ■ = S-04

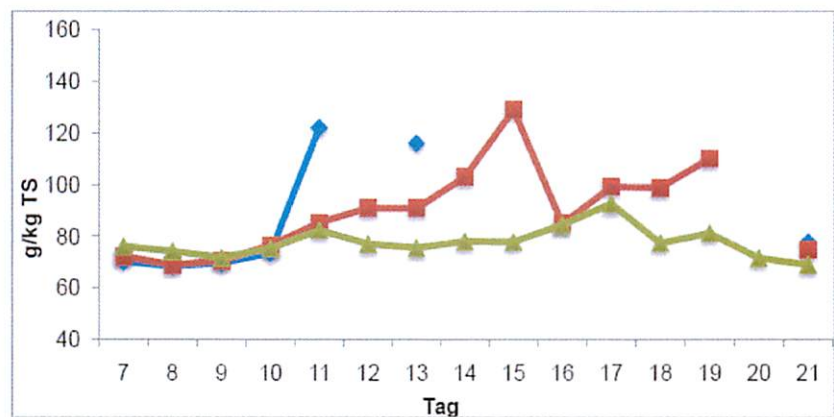


Abb. A.13: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Rohaschegehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC  
 ■ = K-01 ■ = S-10 ■ = S-11



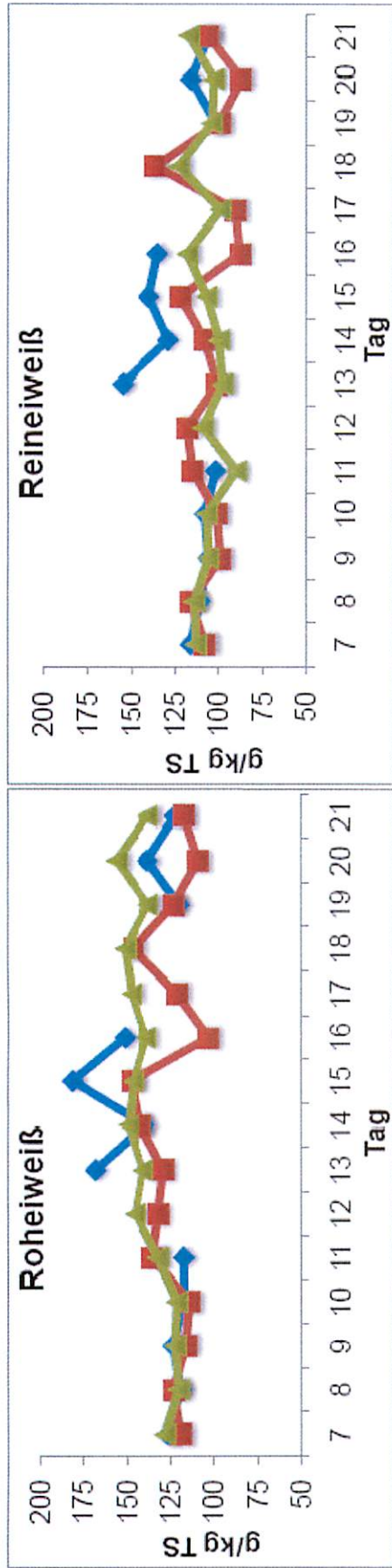


Abb. A.14: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Roheiweiß- und Reineiweißgehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC; ■ = K-01 ■ = S-02 ■ = S-04

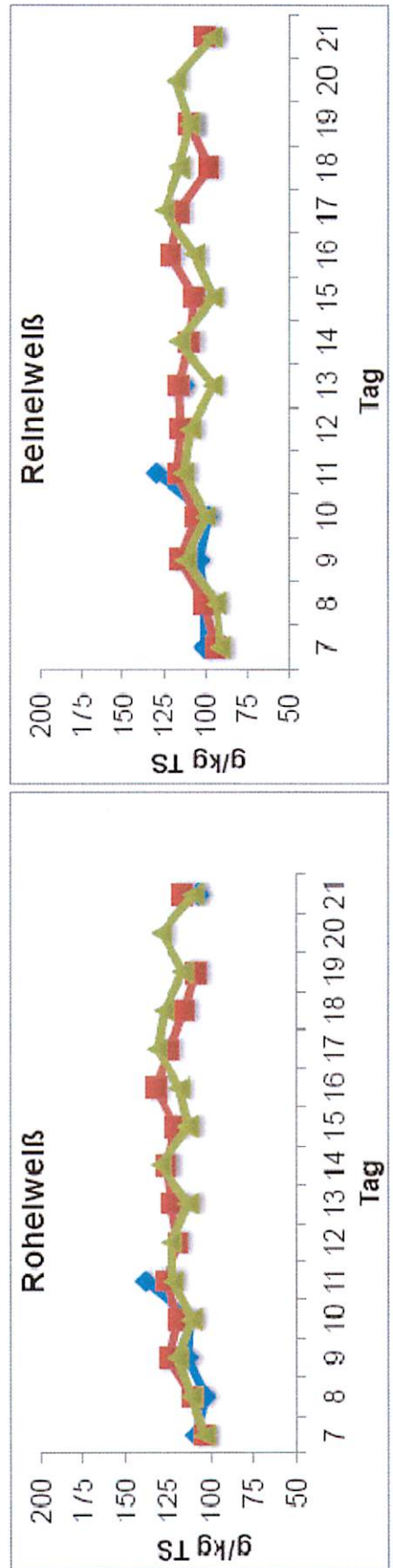


Abb. A.15: Ergebnisse aus dem Institut für Tierernährung: Roheiweiß- und Reineiweißgehalte in den Beutelinhalten nach 48-stündiger Inkubation im RUSITEC; ■ = K-01 ■ = S-11 ■ = S-12