

Epiphytische Laktobakterien auf Gras-Leguminosen-Gemischen

BADRE EL HIMDY und GÜNTER PAHLOW

Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung

Einleitung

Die auf Futterpflanzen vorkommende epiphytische Mikroflora variiert nach Art und Zahl unter dem Einfluß von Faktoren wie Standort, Jahreszeit, Reifestadium sowie Pflanzenart und Pflanzenteil (Allen et al., 1937; Beck, 1965; Leben, 1965; Weise, 1969; Koch et al., 1973; Mundt, 1970 und Ruser, 1989). Es ist davon auszugehen, daß diese Faktoren sich indirekt unter anderem über Witterungseinflüsse bzw. die Verfügbarkeit von Nährstoffen auf die epiphytischen Organismen auswirken.

Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß auf Mais und Sorghumarten offenbar mehr epiphytische Milchsäurebakterien (MSB) vorkommen als auf den übrigen Futterpflanzen (Koch et al., 1973; Ely et al., 1981), und auf Gras wiederum mehr als auf Luzerne (Kroulik et al., 1955; Bol-

sen et al., 1987). Da jedoch in der Mehrzahl dieser Untersuchungen die Probenahme von unterschiedlichem Pflanzenmaterial nicht zeitgleich erfolgte, bleibt offen, ob die ermittelten Unterschiede im Besatz mit MSB saisonal bedingt sind oder von der jeweiligen Pflanzenart abhängen. Die oben zitierten Studien beziehen sich überwiegend auf reine Futterpflanzenbestände sowie einige Gras-Leguminosen-Gemische. Dagegen gibt es nach unserer Kenntnis bisher keine Untersuchungen zum epiphytischen Status der Einzelkomponenten von Futterpflanzengemischen. Nach Daeschel et al. (1987) bietet jede Pflanzenart ihrer epiphytischen Mikroflora ganz spezifische Milieubedingungen sowohl hinsichtlich der Verfügbarkeit und Konzentration von Nährsubstanzen im pflanzlichen Exsudat als auch auf Grund ihrer morphologischen Eigenschaften.

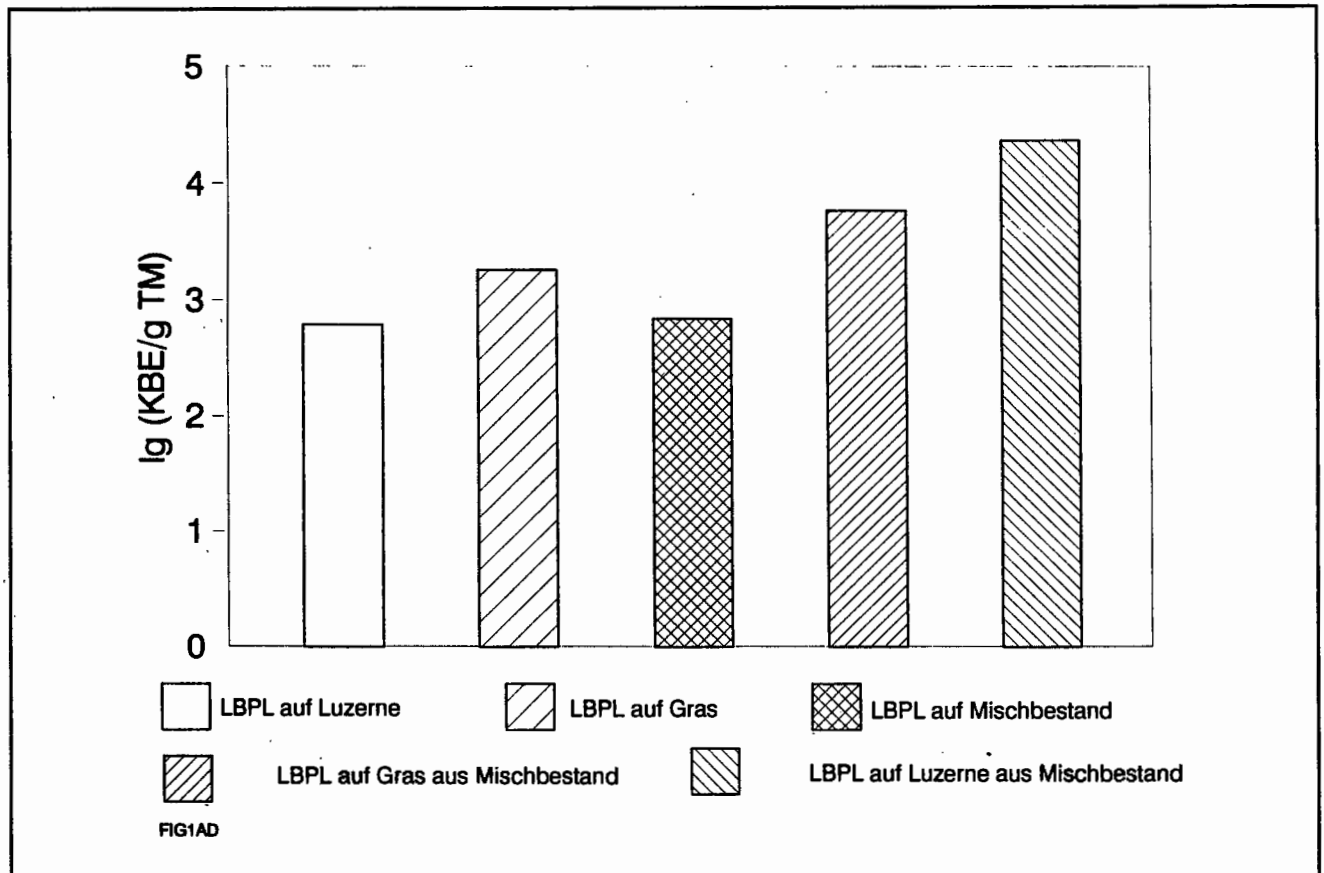


Abbildung 1: Epiphytischer Laktobakterienbesatz auf einem Gras-Luzerne-Mischbestand sowie auf seinen Einzelkomponenten (Mittelwert aus 3 Ernteterminen)

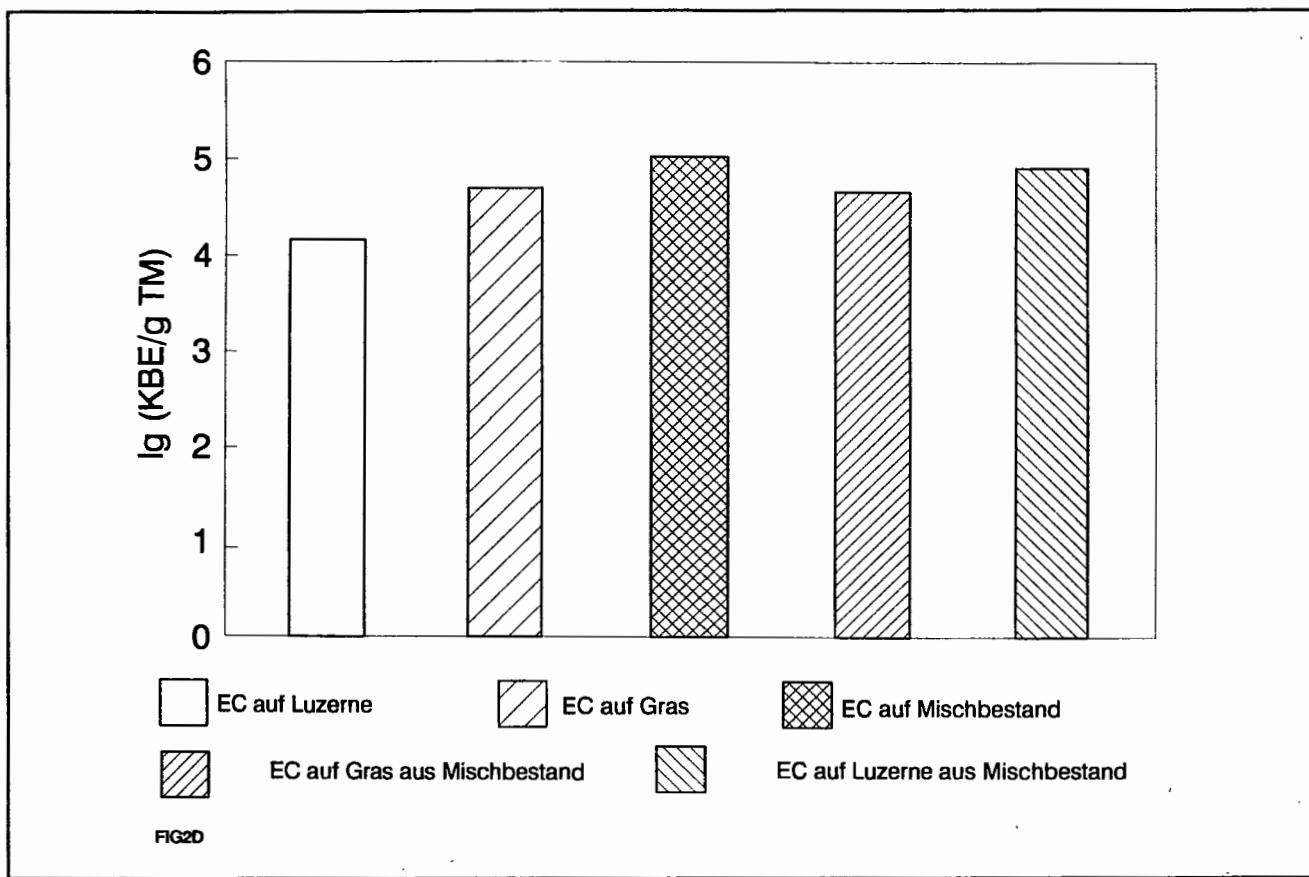


Abbildung 2: Epiphytischer Enterococcusbesatz auf einem Gras-Luzerne-Mischbestand sowie auf seinen Einzelkomponenten (Mittelwert aus 3 Ernteterminen)

Die hier vorgelegten Untersuchungen befassen sich mit dem Vorkommen von Milchsäurebakteriengruppen sowohl auf Reinsaat von Gras bzw. Luzerne als auch auf einem Mischbestand sowie schließlich auf den von Hand separierten Mischungspartnern. Sie sollen ersten Aufschluß über eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung der Gärflora verschiedener Futterpflanzen und mögliche Auswirkungen auf die Beurteilung ihrer Siliereignung geben.

Material und Methoden

Unmittelbar nebeneinander liegende Parzellen auf den Versuchsfeldern der FAL wurden am 02. April 1990 mit Luzerne, einjährigem Weidelgras sowie einer Mischung beider Futterpflanzen im Verhältnis 1 : 1 eingesät. Alle dazu getroffenen Kulturmaßnahmen richteten sich nach den Anforderungen des Bundessortenamtes für die Wertprüfung von Futterpflanzensorten. Beerntet wurde zu drei Terminen im zweiwöchigen Abstand (17. und 31. August sowie am 14. September 1990). Einzelproben von ca. 200 g Frischmasse (FM) wurden mit der Schere geschnitten und innerhalb von 15 Minuten in das mikrobiologische Labor des Institutes für Grünland- und Futterpflanzenforschung transportiert. Für jede Probe erfolgte die Bestimmung des Trockenmassegehaltes in zwei Wiederholungen. Eine Teilprobe der Futterpflanzenmischung wurde unverzüglich in ihre beiden Komponenten getrennt. Proben von je 30 g dienten für die mikrobiologische Untersuchung.

An die Einwaage in einen sterilen Kunststoffbeutel schloß sich bis zur Weiterverarbeitung eine Aufbewahrung bei 5°C an. Die Aufbereitung geschah im Stomacher 400 für zwei Minuten (30g FM in 270 ml sterilem, demineralisiertem Wasser). Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte aus dem wässrigen Extrakt. Von einer dezimalen Verdünnungsreihe mit Ringerlösung wurden der zu erwartenden Keimdichte entsprechende Verdünnungsstufen bei dreifacher Wiederholung ausgeplattet. Zur gemeinsamen Erfassung der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* (im weiteren: LBPL) diente Rogosa-Agar (Kochsches Platten-Gußverfahren, Bebrütung für 3 Tage unter Stickstoff-Kohlendioxid-Atmosphäre im Verhältnis von ca. 15:1). Der Anteil der Gattung *Enterococcus* (EC) wurde durch Oberflächenausspätung auf Slanetz & Bartley-Agar nach aerober Bebrütung, gleichfalls 3 Tage bei 30°C, festgestellt. Die mittels Koloniezählgerät ausgewerteten Ergebnisse sind jeweils in koloniebildenden Einheiten (KBE) je Gramm Trockenmasse angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Das zeitgleich von benachbarten Parzellen geerntete Gras wies an jedem der drei Erntetermine einen höheren Besatz an LBPL auf als die Luzerne. In der Abbildung 1 sind deshalb die Resultate der Keimzahlbestimmungen zusammengefaßt dargestellt. Das Ergebnis stimmt insofern mit den Angaben von Kroulik et al. (1955), sowie Bolsen et al. (1987) überein.

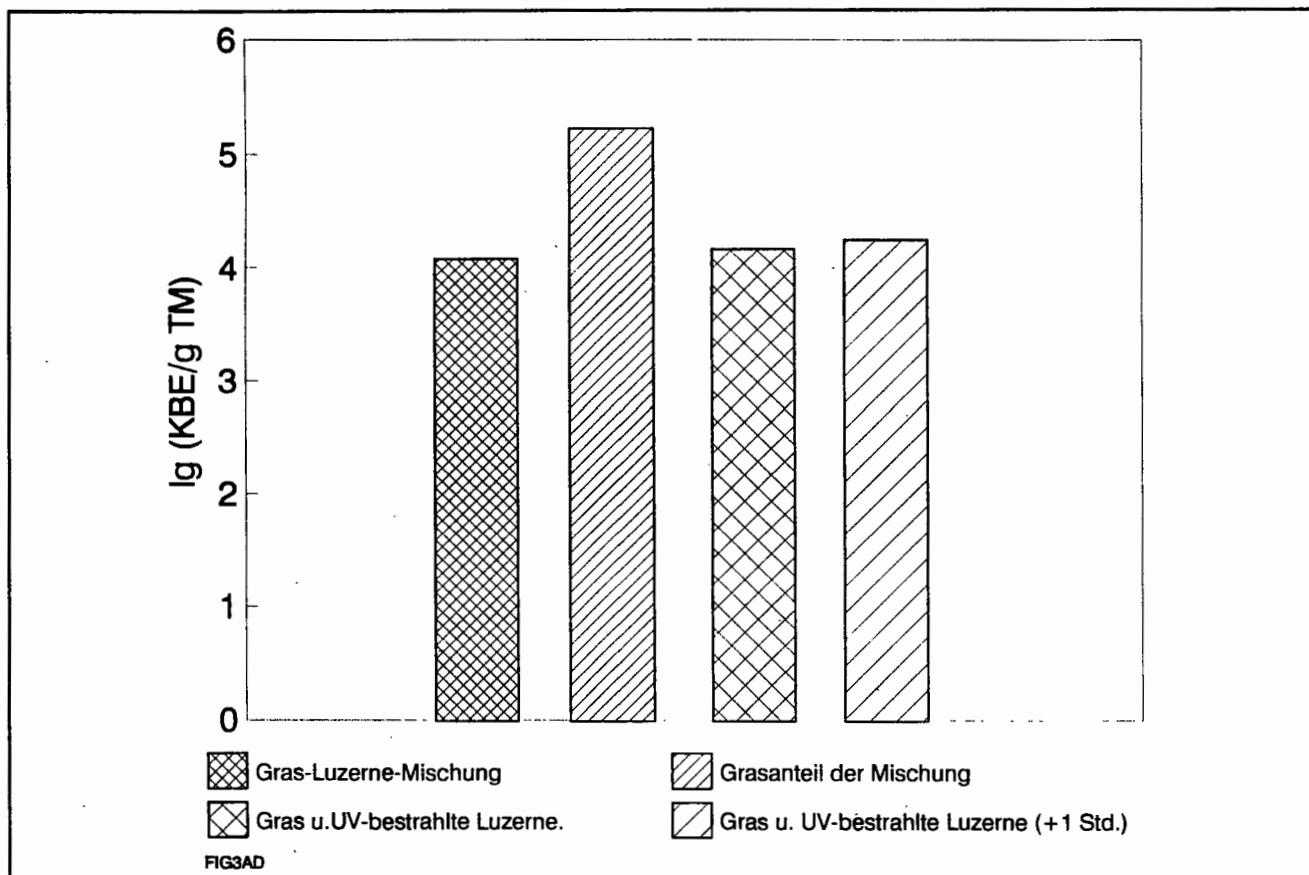


Abbildung 3: **Beeinflussung des Laktobakteriennachweises auf Gras durch die Anwesenheit von entkeimter Luzerne während der Probenaufbereitung (Mittelwert aus 3 Ernteterminen)**

Es stützt auch die Ansicht von Daeschel zu einer von der Pflanzenart abhängigen, bzw. für diese spezifischen Begünstigung bestimmter epiphytischer Mikroorganismen. Dabei ist offenkundig, daß sowohl Strukturen des Blattes, wie Größe der Atemöffnungen, ihre Anzahl und Verteilung, aber auch Charakteristika der Oberfläche und schließlich physiologische Eigenschaften, wie nährstoffhaltige Exsudate, sich von Pflanzenart zu Pflanzenart unterscheiden. Es liegt nahe, auf eine erhebliche Bedeutung dieser unterschiedlichen Merkmale für den Besatz mit Epiphyten zu schließen.

Für das Vorkommen der Gattung *Enterococcus* auf Gras bzw. Luzerne ergab sich kein einheitlicher Trend. Zwar wurde auf beiden Reinsaaten zu allen Ernteterminen eine höhere Keimdichte als für die LBPL insgesamt nachgewiesen (Abbildung 2), aber der jeweils erreichte Maximalwert wechselte zwischen den Futterarten.

Unterschiede in Abhängigkeit vom Erntetermin waren auch für die Gruppe der LBPL auf den Pflanzenmischungen festzustellen. In einem der Fälle war der Besatz dort höher als auf den Reinsaaten, im anderen Fall lag er auf gleichem Niveau. Die Keimdichte der Enterokokken auf dem Mischbestand war dagegen zu allen Zeitpunkten zumindest gleich oder lag höher als auf jeder der Reinsaaten (Abbildung 2).

Auf dem aus der Mischung aussortierten Gras- und Luzerneanteil waren jeweils höhere LBPL-Zahlen nachweisbar als im Ursprungsmaterial oder den entsprechenden Reinsaatbeständen (Abbildung 1).

Aus dem Ergebnis ist zu schließen, daß die Nachweisbarkeit der LBPL-Gruppe mit Hilfe des Standard-Zählverfahrens dann gemindert wird, wenn beide Pflanzenarten gemeinsam der Homogenisation während der Probenaufbereitung ausgesetzt werden. Hierbei könnte der LBPL-Besatz jeder der beiden Futterpflanzenarten auf den intensiven Kontakt mit dem jeweils fremden Milieu durch den Übergang in ein nicht kultivierbares Ruhestadium ("Somnicell") reagieren, wodurch diese Bakteriengruppe der Nachweisbarkeit entzogen wird (Roszak und Colwell, 1987). Bisher ist nicht geklärt, unter welchen Bedingungen dieser Zustand mit seiner Schutzfunktion gegen schädliche Umwelteinflüsse wieder aufgehoben wird, und ob dies zum Beispiel unter den Bedingungen im Silo der Fall sein könnte.

Die Somnicell-Hypothese wurde geprüft in einer weiteren Serie von Experimenten, in denen der LBPL-Besatz sowohl der Mischung, als auch der einzelnen, aussortierten Mischungspartner sowie der rekonstituierten Mischung ermittelt wurde, nachdem zuvor jeweils eine der Futterpflanzenarten durch 20-minütige, intensive UV-Bestrahlung in dünner, mehrfach gewendeter Schicht weitgehend entkeimt worden

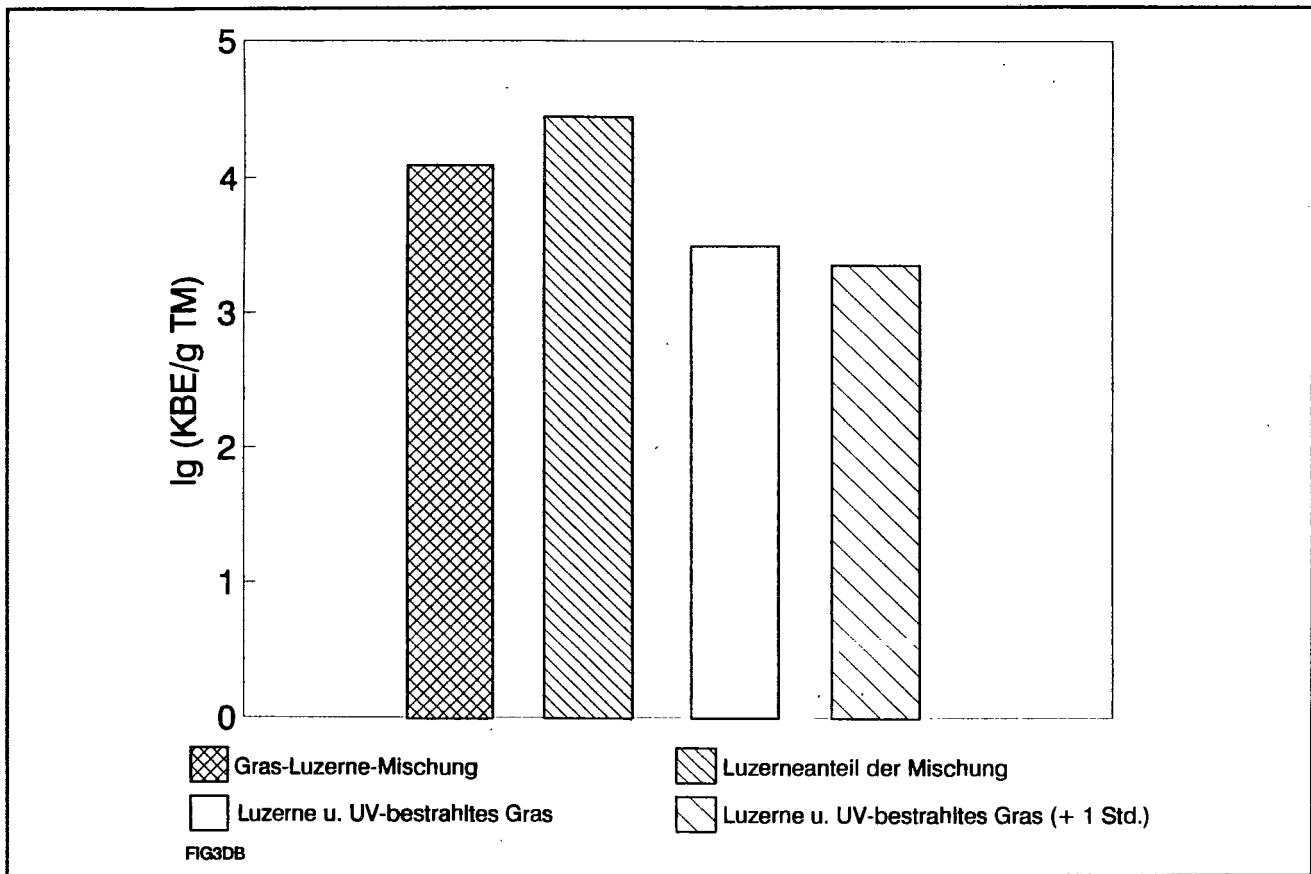


Abbildung 4: Beeinflussung des Laktobakteriennachweises auf Luzerne durch die Anwesenheit von entkeimtem Gras während der Probenaufbereitung (Mittelwert aus 3 Ernteterminen)

war. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen, daß tatsächlich die Nachweisbarkeit der hier untersuchten LBPL von jeder der beiden Pflanzenarten dann gesenkt wurde, wenn diese vor der Keimzahlanalyse mit der teilsterilisierten anderen Futterart im Homogenisationsvorgang kombiniert worden war. Auch eine daran anschließende einstündige Aufbewahrung des Homogenates bei Raumtemperatur trug nicht zu einer Erholung der Bakteriengruppe etwa durch Anpassung an das Fremdmilieu bei.

Derartige Befunde besitzen praktische Bedeutung im Hinblick auf die Silierung von Futterpflanzenmischungen. Die bisher von solchen Beständen ermittelten Besatzdichten scheinen danach eine Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Flora epiphytischer Laktobakterien darzustellen, wenn man sie mit der Summe der auf den einzelnen Pflanzenarten vorhandenen MSB-Gruppen vergleicht.

Zusammenfassung

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß auf einem reinen Grasbestand höhere Milchsäurebakterienzahlen vorkommen als auf einer zeitgleich und am selben Standort beernteten Reinsaat von Luzerne. Dies läßt sich möglicherweise auf pflanzenartspezifische Unterschiede der jeweiligen Exsudatzusammensetzung oder der Blattflächenstruktur zurückführen. Auf Mischbeständen dieser Futterpflanzen lassen sich we-

niger Milchsäurebakterien nachweisen als auf jeder der beteiligten Pflanzenarten. Soweit es um die Beurteilung des mikrobiellen Status zur Silierung vorgesehener Mischungen von Futterpflanzen geht, so scheint eine separate Keimzahlbestimmung ausgehend von den Einzelkomponenten zwar die zahlenmäßig zutreffenderen Werte zu liefern. Andererseits entsprechen jedoch die Bedingungen in der Anfangsphase eines Silierprozesses mit dem raschen Zusammenbruch pflanzlicher Gewebe und der Freisetzung von Zellinhaltsstoffen annähernd denen nach dem Probenaufschluß im Stomacher-Homogenisator für die mikrobiologische Analyse. Dasselbe trifft in noch stärkerem Maße auch für die Ernte des Futters mit Häcksler oder anderen Aufbereitungsgeräten, wie der Mattenpresse, zu. Hieraus folgt, daß es trotz einer offensichtlichen Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Anzahl von Milchsäurebakterien keine sinnvolle Alternative zur Keimzahlbestimmung in Futtermischungen gibt, da diese auch die zu erwartende Stoffwechselaktivität der Keimgruppe bei der Vergärung von Futterpflanzenmischungen vermutlich am zutreffendsten widerspiegelt.

Eine Überprüfung dieser Ergebnisse mit weiteren Gras-Leguminosen-Gemischen, die mehr als nur die Luzerne einbeziehen, wäre dringend erforderlich.

Epiphytic lactic acid bacteria (LAB) in grass-legume mixtures

The results of the study demonstrate that pure grass, harvested in the same location and at the same time as a lucerne crop, tends to contain higher epiphytic numbers of lactic acid bacteria (LAB) than lucerne. This might be accountable for by either the composition of exudates or by structural differences of the plant surfaces as well as stomata density between both crops.

When mixtures of grass and lucerne are investigated a smaller number of LAB can be recovered from the composite sample than from each of the individual components. As far as the microbial status of mixtures and their suitability for ensiling is concerned, the determination of the epiphytic LAB from each crop separately seems to reflect the situation numerically more accurate. However, the early stage of ensiling with its sudden collapse of tissue structures and the release of cell contents, creates conditions comparable to the disintegration of the forage sample after preparation for the microbiological analysis in the stomacher lab blender. The same applies to an even larger extent to the harvesting process with a chopper or other methods such as the mat making technique. Consequently, in spite of the obvious underestimation of the true LAB population, there is no other significant alternative, than to use the composite sample for the enumeration of LAB, especially as this approach probably also reflects in the best possible way the metabolic activity of the LAB to be expected during the silage fermentation of such forage mixtures.

A verification of these results by using other grass legume mixtures but just lucerne will be necessary.

Literatur

Allen, L.A., Harrison, J., Watson, S.J. and Ferguson, W.S., 1937: A study of the chemical and bacteriological changes occurring in grass silage. - J. Agric.Sci. 27: 271-293.

Beck, Th., 1965: Untersuchungen über die Ökologie und Physiologie der Gärfutterflora. - Landw. Forsch. 18: 243-250.

Bolsen, K., Fung, D., Ilg, H., Laytimi, A., Hart, R., Chain, V. and Nuzback, L., 1987: Effect of commercial inoculants on the fermentation of alfalfa, corn, forage sorghum and triticale silages. - Cattlemen's day, Agricultural Experiment Station, Kansas State University, Manhattan, 107-125.

Daeschel, M.A., Andersson, R.E. and Fleming, H.P., 1987: Microbial ecology of fermenting plant material. - FEMS Microbiology Reviews 46: 357-367.

Ely, L.O., Sudweeks, E.M. and Moon, N.J., 1981: Inoculation with *L. plantarum* of alfalfa, corn, sorghum and wheat silages. - J. Dairy Sci. 64: 2378-2387.

Koch, G., Morwarid, A. und Kirchgessner, M., 1973: Zum Einfluss der Mikroorganismen der Maispflanzen auf die Stabilität der Silagen. - Das Wirtschaftseigene Futter 19: 15-20.

Kroulik, J.T., Burkey, L.A. and Wiseman, H.G., 1955: The microbiological population of the green plant and of the cut forage prior to ensiling. - J. Dairy Sci. 38: 256-262.

Leben, C., 1965: Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. - Annu. Rev. Phytopathol. 3: 209-230.

Mundt, J.O., 1970: Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. - J. Milk Food Technology. 33: 550-553.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R., 1987: Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. - Applied and Environmental Microbiology. 53: 2889-2893.

Ruser, B., 1989: Erfassung und Identifizierung des epiphytischen Milchsäurebakterienbesatzes auf Gras und Mais in Abhängigkeit von Standort, Sorte, Entwicklungsstadium sowie Ernte- und Klimaeinflüssen. - Landbauforschung Völkenrode. Sonderheft 103. 1989

Weise, F., 1969: Einfluss des epiphytischen Keimbesatzes auf den Gärverlauf. - Proceedings of the 3rd General Meeting of the European Grassland Federation. Braunschweig, 1969.

Verfasser: El Himdy, Badre, Dr., Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II B.P. 6202 Rabat-Institut, RABAT, Royaume du Maroc; Pahlow, Günter, Dr., Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Professor Dr. agr. habil. Friedrich Weißbach.