

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

BACTERIOLOGISCHE ONDERZOEKINGEN OVER ENSILEERING
MET TOEVOEGING VAN ZURE WEI, ONDERMELK OF SUIKER,

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE.

(Ingezonden 17 December 1936.)

1. Inleiding.

Bij het conserveeren van groene voederstoffen in vochtigen toestand door inkuiling of ensileering van het versch gewonnen voeder ondervindt men de moeilijkheid, dat in vele gevallen de aldus opgeslagen voedervoorraad ten gevolge van microbenwerkzaamheid bederft. De bij minder goede afsluiting van de lucht optredende oxydatieprocessen, voornamelijk door schimmels bewerkstelligd, verteren de voedermassa op de plaats van inwerking zóódanig, dat practisch alle bestanddeelen ontleed worden. Bij goede afsluiting van de lucht kunnen anaerobe bacteriële processen het voeder bederven, zij het dat deze processen een minder volledige ontleding veroorzaken. Boterzuurgisting en rotting kunnen echter de kwaliteit zeer nadeelig beïnvloeden. Daar het meer of minder goed slagen van een conserveering van verschillende factoren afhankelijk is en in een practisch veehoudersbedrijf daarom in hooge mate op het toeval berust, heeft men gezocht naar mogelijkheden om met meer zekerheid een goede silage te kunnen bereiden. Door toevoeging van de conserveering bevorderende stoffen tracht men tot grootere bedrijfszekerheid te komen.

In Nederland zijn in vorige seizoenen verscheidene proefensileeringen gedaan volgens de Finsche methode, waarbij anorganische zuren werden toegevoegd ter verhinderend van bacterieel bederf. Het onderzoek van deze conserveeringsmethode heeft aangetoond, dat inderdaad een zeer goede conserveering bereikt wordt indien aan den eisch van een voldoende hoogen zuurgraad voldaan wordt. De verkregen silage vertoont meestal een goeden geur en is ook op het oog van goede kwaliteit (licht van kleur). De eiwit-aantasting is zeer beperkt ¹⁾. Bovendien is het voordeel van deze methode, dat men door gebruik van anorganisch zuur den eindzuurgraad van het product in zekere mate kan beheerschen, daar met practisch mogelijke zuurdoses een pH zelfs lager dan 3 bereikt kan worden.

(1) C. 105.

Toch bleek uit het bacteriologisch onderzoek, dat ook bij de mineraalzuur-methode boterzuurgisting kan optreden, waarvan de kaasbereiding nadeelen kan ondervinden ²⁾. Deze boterzuurgisting moest geweten worden aan de gelaagde structuur der mineraalzuursilage, welke in de niet-zure tusschenlaagjes van het voeder boterzuurbacteriënontwikkeling mogelijk maakt. Pas bij zeer hooge zuurgraden (ongeveer bij pH beneden 3,5) bleek deze voor kaas gevaarlijke boterzuurgisting practisch afwezig te blijven, waarbij het weinige ook dan nog aanwezige boterzuur toegeschreven moest worden aan de werking van de voor de kaasbereiding ongevaarlijke suikervergistende boterzuurbacteriën.

Daar bovendien velen niet overtuigd zijn van de onschadelijkheid van dit physiologisch sterk zure voeder (zoutzuur en zwavelzuur worden in het dierlijk lichaam niet verbrand, in tegenstelling met melkzuur) en het gebruik van geconcentreerde zuren op de boerderij niet geheel zonder gevaar beschouwd wordt, bestaat er alle aanleiding om ook andere methoden, waarbij door toevoeging van bepaalde stoffen aan het te ensileeren voeder getracht wordt de conserveering meer bedrijfszeker te maken, te onderzoeken.

Zoo is in de laatste jaren de aandacht gevestigd op het gebruik van wei en andere stoffen uit het zuivelbedrijf, als ondermelk (centrifugemelk) en karnemelk. Het is vooral naar aanleiding van een artikel van Ir. G. J. LIENESCH, dat in den zomer en het najaar van 1935 veel voeder is geënsileerd met toevoeging van deze stoffen ³⁾. De belangstelling uit de practijk, benevens de mogelijkheid om op deze wijze deze zuivelstoffen nuttig te gebruiken, maakte een onderzoek naar deze ensileeringsmethode zeer wenschelijk, vooral daar er op grond van vroeger verrichte onderzoekingen eenige reden bestond om van de toevoeging van wei een begunstigende werking te verwachten. In de eerste plaats wordt door deze toevoeging een vochtige silage verkregen, waardoor de conserveerende melkzuurgisting eerder en vollediger plaats vindt, in de tweede plaats wordt met deze stoffen het suikergehalte verhoogd, waardoor meer melkzuur kan ontstaan ten minste als de in silage optredende melkzuurgisting melksuiker als koolstofbron kan gebruiken. Verder werd van het gebruik van deze zuivelstoffen in zuren toestand, dus zuur geworden door de werkzaamheid van zuivelmelkzuurbacteriën, een betere melkzuurgisting verwacht wegens de hiermede gepaard gaande enting van het geënsileerde materiaal met melkzuurbacteriën. De invloed van dezen factor was echter zeer onzeker, daar het aantal soorten melkzuurbacteriën in de natuur zeer groot is en van te voren niet vaststond dat de zuivelmelkzuurbacteriën voor de melkzuurgisting in silage van eenig belang konden zijn. Ook is als argument voor het gebruik van gezuurde zuivelstoffen genoemd de gunstige werking van het in deze stoffen aanwezige zuur. Hierbij heeft men de zure

wei dus vergeleken met het zure toevoegsel van de mineraalzuurmethode, hetwelk een snelle dooding van het gras veroorzaakt. Daar de met de zure zuivelstoffen ingebrachte hoeveelheid zuur zeer gering is, en niet vergelijkbaar met de bij de mineraalzuurmethode gebruikte, kunnen we a priori van dezen factor bezwaarlijk eenigen practischen invloed verwachten.

Uit het bovenstaande moge blijken dat een onderzoek der genoemde factoren noodzakelijk was om een inzicht in de zure wei methode te krijgen.

Dit onderzoek is uitgevoerd door middel van laboratoriumproeven, ensileeringen in het groot en door analyse van door de praktijk beschikbaar gestelde silagemonsters. In dit artikel worden alleen de laboratoriumproeven besproken.

2. Bacterieele processen in een silage.

Alvorens over te gaan tot een bespreking van de proeven met wei, willen we eerst nagaan, welke bacterieele processen in een silage kunnen optreden en wat de gevolgen hiervan zijn. Wij beperken ons tot die silages, welke een melkzuurgisting doormaken, daar de maatregelen, welke bij ensileering met wei toegepast worden, er in het algemeen toe leiden, dat er melkzuurgisting optreedt (laag blijvende temperatuur wegens het vullen van den silo in een snel tempo en besproeiing met een koude vloeistof).

Na het vullen en afsluiten van den silo begint al spoedig de melkzuurgisting, waardoor de zuurgraad, tengevolge van de bacterieele omzetting van suikers in melkzuur, stijgt. Deze stijging eindigt als de beschikbare hoeveelheid suiker uitgeput is of als de zuurgraad zóó hoog wordt, dat de bacteriën door het zuur in hun werkzaamheid geremd worden. Bij een snel verloopende melkzuurgisting vormt zich geen boterzuur tijdens deze gisting, daar aan de vorming van boterzuur eerst een ontkieming der boterzuurbacteriënsporen en de verdwijning van alle luchtzuurstof moet voorafgaan. Bij een langzame melkzuurgisting is nog wel eenige boterzuurvorming mogelijk, in de eerste plaats uit de nog aanwezige suiker door *Cl. saccharobutyricum*. Bij proeven met ensileering van gras in glazen potten vonden wij tijdens de periode der melkzuurgisting soms geen boterzuur gevormd, soms zeer geringe hoeveelheden als 0,03 % na 3 dagen; 0,01 % na 3 dagen.

Is na het einde der melkzuurgisting en het bereiken van het chemisch evenwicht in de silage de zuurgraad zóó hoog geworden, dat de pH omstreeks of beneden 4 is, dan zijn de andere microbiëele processen, als b.v. boterzuurgisting, onmogelijk en blijft de silage bij dezen zuurgraad in goeden toestand bewaard, gelijk men ziet uit tabel 1. Bij deze proeven werd, evenals bij andere laboratoriumproeven, gras geënsileerd in glazen potten met toevoeging van

150 ml water per 600 g gras om een homogene massa te krijgen. Het gras-vloeistofmengsel werd afgesloten en geperst door een paraffineblok met looden gewicht en van de lucht afgesloten door een laag paraffineolie.

TABEL 1.

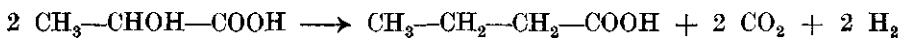
600 g weilandgras met 150 ml water in glazen potten.
Bewaard bij ongeveer 20° C. ¹⁾

Potten gemaakt op:	N ^o .	Onderzocht na:	Onderlaag			
			pH	M.Z.	A.Z.	B.Z.
7-5 '35	V A	3 dagen	4,63	0,97	0,16	0,01
	V B	13 "	4,25	1,54	0,205	0,01
	V C	71 "	4,11	2,14	0,34	0,06
5-6 '35	IX A	8 dagen	4,00	1,36	0,18	0
	IX B	28 "	3,92	1,71	0,32	0
	IX C	71 "	3,85	2,03	0,28	0

¹⁾ Onder M.Z., A.Z. en B.Z. worde verstaan resp. % melkzuur, % azijnzuur en % boterzuur in de vochtige silagemassa.

Bij dergelijke hooge zuurgraden vindt dus een conserveering van het gras plaats door het ontstane melkzuur, daar bij deze zuurgraden geen bedervende bacteriële processen kunnen optreden.

Anders wordt het als de melkzuurgisting het tot een minder hoogen zuurgraad brengt. In dat geval is boterzuurgisting na afloop van de melkzuurgisting wel mogelijk en zal dus boterzuur gevormd worden uit het door de melkzuurbacteriën geproduceerde melkzuur. Het gevolg daarvan is een ontwikkeling van voor de kaasbereiding zoo nadeelige boterzuurbacteriën van de soort *Cl. tyrobutyricum*, doch daarnaast wordt door deze boterzuurgisting de zuurgraad verminderd, daar uit 2 moleculen melkzuur hoogstens 1 molecule boterzuur kan ontstaan, mogelijk als volgt:



Door deze zuurgraadverminderende werking der boterzuurbacteriën kunnen ook de bacteriën der anaerobe eiwitrotting tot ontwikkeling komen, zoodat een dergelijke silage steeds verder bederft bij een stijging van den pH.

In tabel 2 geven wij hiervan een tweetal voorbeelden.

(4) C. 108.

TABEL 2.

*Potten met 600 g gras en 150 ml water.
Bewaard bij ongeveer 20° C.*

Potten gemaakt op:	N°.	Onderzocht na:	Onderlaag			
			pH	M.Z.	A.Z.	B.Z.
26-4 '35 . . .	I A	3 dagen	4,50	1,10	0,165	0,03
	I B	10 "	4,26	1,50	0,385	0,07
	I C	59 "	4,56	0,98	0,475	0,28
4-10 '35 . . .	XXXII a	5 dagen	4,46	0,81	0,20	0
	XXXII b	10 "	4,51	0,89	0,31	0
	XXXII c	15 "	4,59	0,82	0,40	0,02
	XXXII d	25 "	4,79	0,68	0,48	0,13
	XXXII e	61 "	5,22	0,08	0,64	0,85

Men ziet er duidelijk de met de pH-stijging gekoppelde vermindering van het melkzuurgehalte en vermeerdering van het gehalte aan boterzuur.

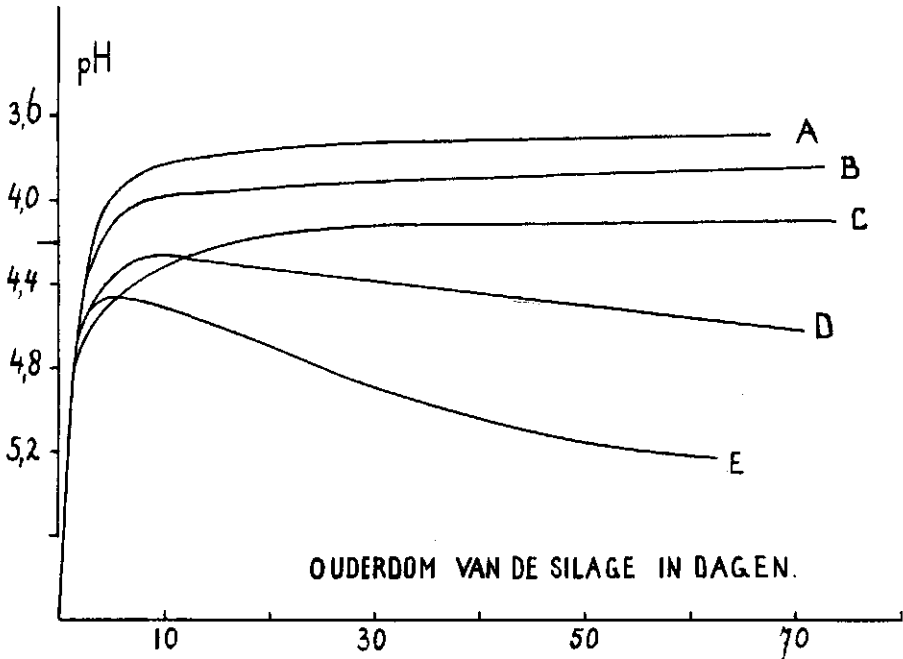
Voor dit verloop van den pH geven we in tabel 3 nog enkele voorbeelden.

TABEL 3.

Potten gemaakt op:	N°.	pH van het bovenstaande sap na							
		1 d.	3 d.	4 d.	7 d.	17 d.	23 d.	33 d.	41 d.
10-9 '34 . .	I	6,33	5,07	4,91	5,04	—	—	—	—
19-6 '35 . .	XIII	5,91	5,26	—	—	—	4,94	—	5,46
25-6 '35 . .	XIX	5,07	—	4,89	4,83	5,75	—	—	—
23-9 '35 . .	XXVIII a	6,02	5,19	—	4,71	—	5,05	5,56	—

Bij dergelijke niet gelukte silages verloopt het proces dus in twee fasen, n.l. in de eerste fase een melkzuurgisting met stijgenden zuurgraad, in de tweede, daaropvolgende fase een dalende zuurgraad door boterzuurgisting en rotting.

In figuur 1 is het verloop van den zuurgraad in verschillende potproeven grafisch voorgesteld.



A = silage van 600 g gras met 150 ml 10 % glucoseoplossing, gemaakt op 4-10 '35.

B = silage van 600 g gras met 150 ml gepasteuriseerde zure wei, gemaakt op 5-6 '35.

C = silage van 600 g gras met 150 ml water, gemaakt op 7-5 '35.

D = silage van 600 g gras met 150 ml water, gemaakt op 26-4 '35.

E = silage van 600 g gras met 150 ml water, gemaakt op 4-10 '35.

Van deze 5 silages zijn er drie tot een voldoende hoogen zuurgraad gekomen, de twee andere, D en E, toonen de meer of minder snelle zuurgraadsdaling.

De optredende verandering in den zuurgraad, welke niet in alle gevallen even snel geschiedt, demonstreert zich tevens in den geur. De genoemde tweede phase is gekenmerkt door het ontstaan van boterzuur- en rottingsgeur.

De melkzuurgistingskuilen beslaan een pH-gebied, dat practisch van pH 3,5 tot pH 6 loopt. Uit het bovenstaande blijkt, dat een gedeelte van dit gebied onstabiel is. Silages, welke zich na de melkzuurgisting nog in het instabiele gebied bevinden, zullen door de gistingsprocessen, welke den zuurgraad verlagen, naar hooger pH-gebied verschoven worden. Bij het onderzoek van jonge silages kan men dus alle pH-waarden uit het gebied 3,5—6 vinden; bij oudere silages, waar de tijd de werkzaamheid der bedervende gistingen heeft mogelijk gemaakt, zal men de pH-waarden uit het niet-stabiele gebied

missen, omdat de pH-waarden van deze silages opgelopen zijn tot het pH-gebied omstreeks 5. Bij de oudere silages zal men dus 2 groepen moeten vinden, n.l. de stabiele silages in het pH-gebied omstreeks 4 en lager en de bedorven silages in het pH-gebied omstreeks 5 en hoger.

De grens van het stabiele gebied omstreeks pH 4 en het instabiele gebied is moeilijk precies aan te geven. De pH van een silage, welke na de melkzuurgisting in het instabiele gebied kwam, stijgt sneller naarmate deze pH oorspronkelijk hoger was, omdat zelfs al maakt de zuurgraad boterzuurgisting mogelijk, deze boterzuurgisting toch moeilijker begint en langzamer verloopt naarmate die pH lager was.

Toch mogen we op grond van tal van praktische ervaringen wel zeggen, dat de grens bij ongeveer een pH van 4,2 à 4,3 ligt. Dit komt overeen met de vroeger gevonden waarde voor de zuurgevoeligheid van boterzuurbacteriën.

3. Wat bepaalt de kwaliteit van een silage?

Men kan slechts een goede silage verwachten indien tengevolge van de melkzuurgisting de pH daalt tot omstreeks 4 en lager. Wordt door de melkzuurgisting het stabiele gebied niet bereikt, dan gaat de silage bederven. In zoo'n geval is dus de hoeveelheid melkzuur, welke bij de melkzuurgisting ontstond, te gering en zou men met meer melkzuur een betere silage hebben verkregen. Dat met melkzuur in dit opzicht veel bereikt kan worden en men dus niet alleen met minerale zuren tot een pH beneden 4 kan komen blijkt uit de tabellen 4 en 5, waarin enkele proeven met gras, geënsileerd met melkzuur, worden vermeld. Om geen hinderlijke bacteriële nevenwerkingen te krijgen, werd 0,5 % formaldehyde, berekend op de groene planten, toegevoegd. Slechts de potten, gemerkt e, bevatten geen formaline, ter vergelijking van den invloed van deze stof.

TABEL 4.

Potten met 600 g gras en 100 g oplossing van melkzuur en formaldehyde, gemaakt op 15-8 '35. Melkzuurpercentage berekend op het plantenmateriaal.

N°.	Melkzuur.	pH van het bovenstaande sap na			pH na 36 dagen in	
		2 dagen.	7 dagen.	28 dagen.	bovenlaag.	onderlaag.
XXV a	1 %	3,80	3,74	3,78	3,85	3,84
XXV b	1,5 %	3,63	3,55	3,62	3,69	3,61
XXV c	2 %	3,50	3,39	3,43	3,54	3,48
XXV d	3 %	3,34	3,21	3,29	3,34	3,32
XXV e	3 %	3,31	3,26	3,41	3,56	3,49

TABEL 5.

Als tabel 4, doch thans met een mengsel van gras en jonge klaver.

N ^o .	Melkzuur.	pH van het bovenstaande sap na			pH na 36 dagen in	
		2 dagen.	7 dagen.	28 dagen.	bovenlaag.	onderlaag.
XXIV a	1 %	3,82	3,84	3,90	4,02	3,97
XXIV b	1,5 %	3,62	3,64	3,68	3,82	3,77
XXIV c	2 %	3,42	3,45	3,49	3,65	3,64
XXIV d	3 %	3,15	3,23	3,28	3,45	3,45
XXIV e	3 %	3,21	3,28	3,46	3,73	3,70

Tijdens den duur dezer proef zijn alle potten steriel gebleven, behalve de potten zonder formaline (XXV e en XXIV e), waarin zich veel gist had ontwikkeld.

Zetten we in een grafische voorstelling de pH-cijfers der onderlagen uit tegen de toegepaste melkzuurconcentraties, dan blijkt uit de verkregen figuur 2, dat, althans bij de in deze proef gebruikte grasmonsters, met melkzuur zeer lage pH-waarden verkregen kunnen worden. In deze figuur is A de curve voor het gras, B die voor het gras-klaver-mengsel.

Volgens de bij onze proeven opgedane ervaring kan de groote hoeveelheid melkzuur, welke noodig is om den pH tot beneden 4 te brengen, ook inderdaad door de melkzuurbacteriën geleverd worden. Bij de proeven bleek ons tevens, dat het verse voeder onder de vele verschillende bacteriesoorten ook altijd die melkzuurbacteriën bevat, die een voldoende hoogen zuurgraad kunnen veroorzaken.

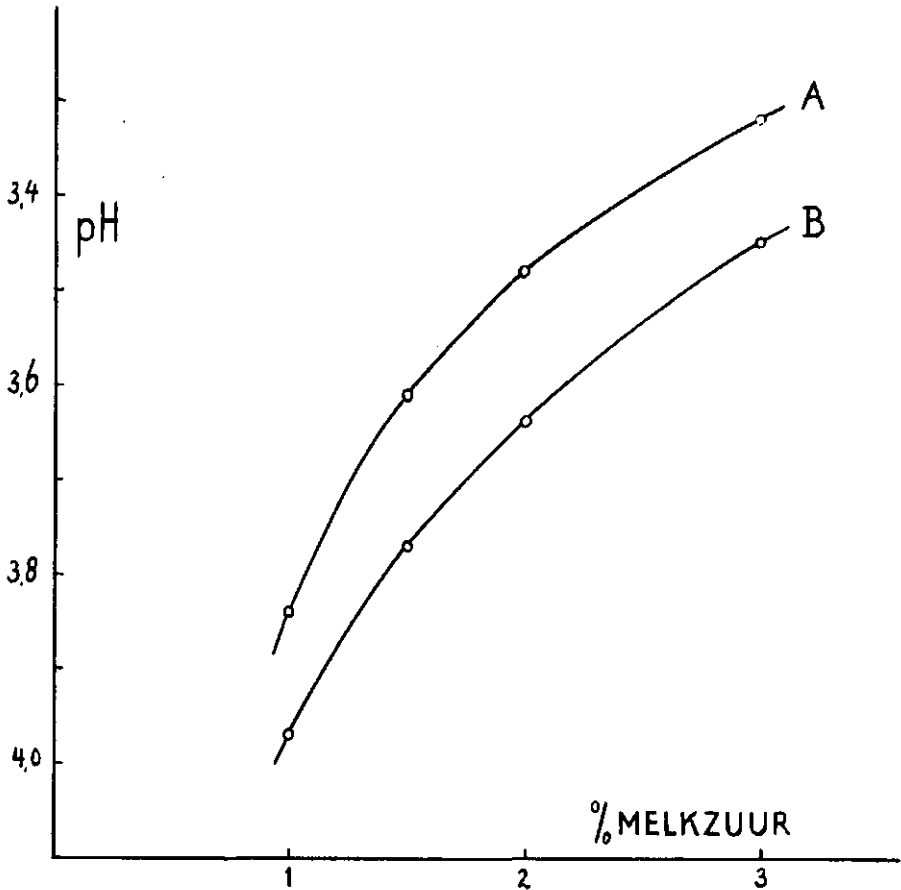
De onvoldoende melkzuurvorming in silages, welke te weinig zuur werden om het stabiele pH-gebied te bereiken, kan dus niet aan de melkzuurbacteriën geweten worden, doch wordt door de samenstelling van het voeder bepaald, n.l. door

een gering gehalte aan vergistbare koolhydraten en/of

een hoog gehalte aan bufferende bestanddeelen (b.v. eiwitten), waardoor met eenzelfde hoeveelheid melkzuur niet zoo'n lage pH wordt bereikt als bij een voeder met weinig bufferende stoffen.

Deze twee grootheden, suikergehalte en gehalte aan bufferende bestanddeelen, bepalen of bij aanwezigheid van de goede bacteriën de zuurgraad van de silage hoog genoeg kan worden, zij bepalen dus de geschiktheid van het voeder voor ensileeringsdoeleinden. In dit verband herinneren wij er aan,

dat de praktijk reeds ervaren heeft, dat er planten zijn, die zich goed en planten, welke zich slecht voor ensileering leenen. In de eerste groep vindt



men b.v. mais, in de tweede papilionaceën. Deze ensileeringsgeschiktheid blijkt echter niet allen afhankelijk van de plantensoort, doch ook in eenzelfde plantensoort vindt men groote verschillen. Dit kan zeer duidelijk met de potproeven aangetoond worden. Bij deze potproeven zijn door de toevoeging van water de omstandigheden het gunstigst gemaakt voor een snelle en maximale zuring.

In tabel 1 ziet men een voorbeeld van weilandgras, waarmee bij de potproeven uitstekende zuurgraden werden verkregen, tabel 2 daarentegen geeft 2 grasmonsters, welke niet een voldoende zuurgraad konden bereiken. Bij de potten I daalde de pH niet verder dan 4,26, bij de potten XXXII

niet verder dan 4,46. Bij proeven, genomen op 6-7 '34 en 23-5 '34, waarbij op denzelfden dag gras, afkomstig van 2 verschillende velden, geënsileerd werd, werd het volgende verloop van den pH geconstateerd.

TABEL 6.

Monster van:	pH van het bovenstaande sap na									Gemaakt:
	1 d.	3 d.	4 d.	5 d.	6 d.	7 d.	8 d.	10 d.	14 d.	
veld A	6,01	4,29	4,14	4,02	3,94	3,94	3,90	3,89	3,78	6-7 '34
„ B	6,49	4,77	4,71	4,67	4,90	5,08	—	—	—	
veld C	—	4,98	—	4,67	4,59	4,56	4,54	4,48	4,44	23-5 '34
„ D	—	5,93	—	4,64	4,51	4,39	4,33	4,24	4,19	

Bij een andere proef werd gras van hetzelfde veld op verschillende dagen in potten geënsileerd, waarbij verschillend resultaat werd verkregen.

TABEL 7.

Geënsileerd op:	Veld	pH van het bovenstaande sap na					Onderlaag	
		3 d.	4 d.	5 d.	7 d.	11 d.	na	pH
7-9 '34	A	5,10	4,83	4,72	4,90	5,04	—	—
10-9 '34	A	5,07	4,91	4,96	5,04	—	—	—
18-10 '35	B	—	—	—	4,82	—	38 d.	4,00
19-10 '35	B	—	—	—	5,90	—	107 d.	4,97

Daar bij deze proef niet precies hetzelfde gras kon worden geënsileerd, is zij niet ten volle bewijzend, doch zij bevat een duidelijke aanwijzing, dat men van eenzelfde veld niet ten allen tijde eenzelfde kwaliteit oogst, zelfs in korte tijdsintervallen. Waarschijnlijk zijn hierop de weersomstandigheden van invloed.

Hoe ontstellend gering de zuurvorming soms kan zijn, ziet men in enkele voorbeelden uit tabel 8.

TABEL 8.

Geënsileerd op:	Materiaal.	pH van het sap na		Laagst bereikte pH.
		1 dag.	2 dagen.	
8-8 '34	gras	6,11	4,79	4,70
18-8 '34	gras	—	4,92	4,76
12-9 '34	gras	—	5,50	4,56
19-6 '35	jonge klaver	5,91	—	4,94
25-6 '35	gras-klaver	5,07	—	4,82
23-8 '35	gras-klaver	5,45	—	5,12

4. Verbetering van de kwaliteit door toevoegingen.

Geënsileerd materiaal geeft dus niet altijd een voldoende zuurvorming om een rijpe silage van goede kwaliteit te krijgen. De praktijk der Hollandsche inkuilmethode heeft dit ook voldoende laten uitkomen. Silages, welke bij opening van kuil of silo een pH van omstreeks 5 vertoonen, zijn geen zeldzaamheid, ja, volgens onze ervaring eerder regel. Om meerdere zekerheid van slagen van het conserveeringsproces te krijgen heeft men daarom getracht door toevoegsels aan het te ensileeren materiaal een hooger en zuurgraad in de silage te veroorzaken. Als toevoegingen heeft men gebruikt anorganische zuren, suiker (of melasse) en wei. Over de anorganische zuren is hierboven reeds gesproken. De toevoeging van suiker, in Duitschland reeds veel toegepast, heeft als gevolg een ontstaan van meer melkzuur, vult dus een tekort aan suiker in het te ensileeren voeder aan. Het gebruik van zure wei zou, behalve op een verhooging van het suikergehalte, tevens nog kunnen berusten op een enting met melkzuurbacteriën.

In het volgende hoofdstuk zullen wij de verschillende factoren, welke invloed hebben bij de ensileering met weitoevoeging, gedetailleerd bespreken. De methode van ensileering met suikertoevoeging wordt daarbij, als onderdeel hiervan, eveneens behandeld.

Voordat hiertoe overgegaan wordt, willen wij eerst nog wijzen op een omstandigheid, welke in vele gevallen gevolg is van het gebruik van toevoegsels. Het toevoegen van verbetering brengende stoffen brengt n.l. dikwijls een belangrijk bezwaar mee, te weten de inhomogeniteit van een dergelijke silage. De mooiste ensileering krijgt men met voederstoffen, welke zonder

toevoeging tot een voldoende zuurgraad komen, omdat in dergelijke silages het zuur overal in gelijke concentratie ontstaat.

Voegt men tijdens het ensileren stoffen toe, dan dient dit met de grootst mogelijke zorgvuldigheid te geschieden, opdat overal de concentratie der toegevoegde stof even hoog zij. Is dit niet het geval, dan ontstaan laagjes of haardjes van een kwaliteit als welke men zou krijgen zonder de toevoeging, dus ook met boterzuurgisting. Wij wezen hierop bij de mineraalzuurmethode, doch dit bezwaar geldt ook andere toevoegsels. Is de toestand van het voeder, dat een dergelijke haard omgeeft, zoodanig, dat het zich op den rand van het stabiele pH-gebied bevindt, dan breiden deze haarden zich door hun neutraliserende werking licht uit, vooral bij hoog vochtgehalte van de silage, hetwelk diffusieprocessen en bacterieontwikkeling bevordert. Om dezelfde reden is ook de aanwezigheid van een laag van slechte kwaliteit (b.v. bij het ensileren van meerdere gewassen in één silo in verschillende lagen) een bron van gevaar.

5. Weitoevoeging.

Een eventueele gunstige toevoeging van wei aan het materiaal tijdens het vullen van den silo kan veroorzaakt worden door de volgende factoren.

1°. *Verhooging van het vochtgehalte.*

Deze kan, zooals wij zagen, als gunstig gevolg hebben een sneller inzetten van de melkzuurgisting en verdrijving van de lucht, dus beperking van de in het begin optredende omzettingen door oxydeerende en andere suiker-aantastende, doch daarbij geen melkzuur vormende bacteriën.

De gunstige werking van dezen factor is afhankelijk van de hoeveelheid gebruikt vocht. Waar door velen de weitoevoeging beperkt werd tot slechts 4 à 5 %, kan hiervan, vooral bij droog gras niet veel effect verwacht worden. Indien deze vochttoevoeging al een verbetering ten gevolge heeft, moeten we er toch bij bedenken, dat de samenstelling van het te ensileren materiaal niet altijd van dien aard is, dat van vochttoevoeging alleen, zelfs in voldoende hoeveelheid, een ver genoeg gaande verbetering te wachten is.

2°. *De beginzuurgraad.*

Gebruikt men bij de ensilering zure wei, dan wordt een zure stof toegevoegd, waardoor het in elkaar zakken van het gras bevorderd zou kunnen worden. Van deze omstandigheid kan echter practisch niet veel verwacht

worden, daar het zuurgehalte van zure wei maar zeer gering is en niet te vergelijken met de zuurtoevoeging bij het mineraalzuur-procédé. In tabel 9 is aangegeven hoe weinig invloed het zuur uit de zure wei op den zuurgraad van het mengsel heeft. Pas bij gebruik van zure wei, welke door lang staan ten gevolge van de ontwikkeling van staafvormige melkzuurbacteriën een zeer hoogen zuurgraad gekregen heeft, is een duidelijke invloed van het toegevoegde zuur te bemerken, doch deze blijft nog zeer beperkt. Bovendien blijkt uit de cijfers van het boven het gras staande sap na 2 dagen, dat het evenwicht zich snel instelt.

De proef werd gedaan met 2 soorten gras, waaraan per 600 g werd toegevoegd 30 ml 10 % formaldehydeoplossing en 120 cc vloeistof, resp. water, gepasteuriseerde cultuur van zuurselmelkzuurbacteriën (streptococcon) in wei (gewone zure wei) en gepasteuriseerde cultuur van staafvormige weimelkzuurbacteriën in wei (sterk zure wei). De pH-cijfers dezer weicultures waren resp. 4,11 en 3,50.

TABEL 9.

Gras, geënsileerd op 30-9 '35 (met formaline).

Grassoort.	Toegevoegd:	pH van het sap na 2 dagen.	pH onderlaag na 14 dagen.
A	water	5,31	5,25
	20 % gewone zure wei	5,01	5,11
	20 % sterk " "	4,65	4,71
B	water	5,37	5,31
	10 % gewone zure wei	5,27	5,27
	20 % " " "	5,26	5,16
	10 % sterk " "	5,05	4,99
	20 % " " "	4,80	4,71

3°. *Het suikergehalte van de wei.*

Versche onverdunde wei kan ongeveer 5 % melksuiker bevatten, welke door de melkzuurgisting in melkzuur omgezet kan worden. Het gebruik van suikerachtige stoffen bij de ensileering is zeer aan te bevelen. Wij hebben een aantal laboratoriumproeven genomen, welke den gunstigen invloed van suiker zeer duidelijk bewijzen. De suiker werd als oplossing in water met het voeder gemengd vóór het in de potten gedaan werd (tabel 10).

TABEL 10.

Geënsileerd op:	Materiaal.	Toegevoegd:	pH van het bovenstaande sap na					Onderlaag	
			2 d.	3 d.	4 d.	6 d.	9 d.	na	pH.
18-8 '34 . .	gras	water	4,92	4,91	4,91	4,76	5,05	4 d. 9 d.	4,91 4,65
		1 % saccharose	4,50	4,49	4,43	4,24	—	4 d. 9 d.	4,10 3,95
26-7 '35 . .	gras-klaaver	water	—	5,31	—	5,00	—	69 d.	4,20
		1 % glucose	—	4,38	—	4,30	—	69 d.	3,98
		1 % saccharose	—	4,43	—	4,37	—	69 d.	4,03
		1 % lactose	—	4,54	—	4,28	—	69 d.	4,12

Een proef met vollediger analyse der resultaten vermeldt tabel 11.

TABEL 11.

Potten gemaakt op:	N ^o .	Onderzocht na:	Onderlaag.				
			pH	M.Z.	A.Z.	B.Z.	Suiker.
4-10 '35 met 2½ % glucose (600 g gras + 150 ml oplossing)	XXXIII a	5 dagen	3,99	1,50	0,12	0	
	XXXIII b	10 „	3,84	1,74	0,14	0	++++
	XXXIII c	15 „	3,87	2,06	0,17	0	+
	XXXIII d	25 „	3,73	2,13	0,17	0	spoor
	XXXIII e	61 „	3,70	2,20	0,235	0	„

De bij tabel 11 behorende vergelijkingsproef, waarbij hetzelfde gras geënsileerd werd met alleen water, vindt men in tabel 2 (de potten gemerkt XXXII). Daaruit zien we hoe de glucose een veel grootere hoeveelheid melkzuur heeft doen ontstaan, dus een overeenkomstig veel lagere pH en dat tengevolge van de zuring tot in het stabiele pH-gebied dit melkzuur bewaard is gebleven zonder in boterzuur te zijn overgegaan.

Bij de proeven in tabel 10 zijn verschillende suikers gebruikt, n.l. glucose, omdat deze de gemakkelijkst vergistbare suiker is, saccharose met het oog op de toepassing in de praktijk en lactose, wijl dit de suiker van de wei is.

Gelijk ook andere proeven geleerd hebben, is er praktisch geen verschil in de werking dezer verschillende suikers. Bij het maken van een melkzuurgistingssilage kan men dus van al deze drie suikers gebruik maken.

Als het te ensileeren voeder van zoodanige samenstelling is, dat het zonder toevoeging geen goede silage geeft en men dus suiker wil gebruiken om een goede silage te bereiden, kan men verwachten, dat niet iedere suikerdosis voldoende is, d.w.z. de hoeveelheid suiker, noodig om een goede silage te krijgen, hangt van de samenstelling van het voeder af. Met te kleine hoeveelheden bereikt men geen afdoende verbetering (tabel 12).

TABEL 12.

Gras-klaver-mengsel, geënsileerd op 23-9 '35. 600 g voeder + 150 ml vloeistof.

Toevoeging.	pH van het bovenstaande sap na					Onderlaag na 133 dagen.		
	1 d.	3 d.	8 d.	22 d.	51 d.	pH.	Suiker.	Geur.
Water . . .	6,02	5,19	4,71	5,05	5,06	5,92		rot
½ % lactose	5,81	4,32	4,38	4,27	4,56	4,60		iets rot
1 % „	5,59	4,14	4,09	4,04	4,03	4,46	0	appel
2 % „	5,60	4,21	4,08	3,94	3,92	3,98	0	„
5 % „	5,72	4,06	4,05	3,90	3,86	3,90	weinig	„

In een ander geval werd bij jonge klaverblaadjes door 1 % glucose de pH niet verder verlaagd dan tot 4,31, terwijl daarentegen bij een ensileering van 12-9 '34 de pH door 0,1 % saccharose verlaagd werd van 4,56 tot 4,16 en door 0,5 % saccharose tot 3,98. Bij dit laatste geval was dus een geringe suikergift voldoende, bij het eerste niet. Bij ensileeringen in de praktijk met suikertoevoeging wordt zelden meer dan 0,5 % gebruikt. Het moge uit het bovenstaande blijken, dat deze hoeveelheid niet altijd voldoende kan zijn.

Bij goed ensileerbaar voeder heeft een suikertoevoeging als te verwachten, geen groote verbetering tengevolge, al verloopt de zuring er iets sneller door en wordt een hogere zuurgraad bereikt. Bij een ensileering op 7-5 '35 werd b.v. door het gras alleen met water een pH van 4,11 bereikt; met 1 % saccharose glucose en lactose daalde de pH tot 3,99.

Daar dus een toevoeging van suiker zeer gunstig blijkt te zijn, mogen we verwachten dat ook een toevoeging van wei, ondermelk, zure wei of karnemelk een goeden invloed zal hebben, omdat blijkens het bovenstaande ook lactose als bron voor het melkzuur kan dienen.

Om de waarde van deze toevoegsels als alleen suikergift te beoordeelen, moet de werking van de met deze stoffen ingebrachte bacteriën ervan gescheiden worden. Dit kunnen we doen door het toevoegsel van te voren te pasteuriseeren.

In tabel 13 ziet men de gunstige werking van dergelijke toevoegingen aan resp. een slecht en een goed ensileerbare grassoort. Als vergelijking hiervan dienen de potten I A, I B en I C uit tabel 2 (voor de potten II A, II B en II C) en de potten, gemerkt IX uit tabel 1 (voor de potten X en XI). Gebruikt werd 25 % wei. De verse wei was pas uit een kaasbak getapt (titer 2,3 cc n/10 per 10 cc), de zure wei had 1 dag gestaan (titer 3,9 per 10 cc).

TABEL 13.

Geënsileerd op:	Pot n°.	Toevoeging.	Onderzocht na:	Onderlaag			
				pH.	M.Z.	A.Z.	B.Z.
26-4 '35 . . .	II A	gepasteuriseerde, verse wei	3 dagen	4,65	1,26	0,19	0,01
	II B		10 "	4,16	1,76	0,295	0,03
	II C		59 "	3,92	2,30	0,42	0
5-6 '35 . . .	X A	gepasteuriseerde, verse wei	8 dagen	4,02	1,18	0,215	0
	X B		28 "	3,86	1,92	0,31	0
	X C		71 "	3,83	2,27	0,355	0
5-6 '35 . . .	XI A	gepasteuriseerde, zure wei	8 dagen	4,02	1,34	0,22	0
	XI B		28 "	3,90	2,20	0,32	0
	XI C		71 "	3,85	2,11	0,38	0

Zien we dus bij de potten X en XI geen verschil met de ensileering zonder wei, omdat het gras zelf tot voldoende zuurvorming neigt, bij de potten II is de invloed van de weitoevoeging zeer duidelijk gunstig geweest, dank zij de ingebrachte melksuiker, waardoor het melkzuurgehalte van 1,50 % tot 2,30 % verhoogd werd.

4°. *Enting met melkzuurbacteriën.*

Bij ieder proces, waarbij zich microbiële gistingen afspelen, is het van groot belang de omstandigheden zóó te kiezen, dat de gewenschte gisting bevoorreed wordt boven andere, die zouden kunnen optreden. Een dezer omstandigheden is de zorg voor de aanwezigheid van een voldoende aantal van de voor het proces noodzakelijke gistingsorganismen in den aanvang, opdat het proces zoo spoedig mogelijk de overhand krijgen kan.

Zoo ook bij de silage. Hoewel wij reeds opgemerkt hebben, dat op het

versche voeder altijd wel de juiste melkzuurbacteriën aanwezig zijn, behoeven wij er toch niet aan te twijfelen, dat een enting met deze bacteriën van voordeel zal zijn om de melkzuurgisting sneller te laten verloop.

In de gevallen dat het voeder van zoodanige samenstelling is, dat zelfs onder de gunstigste omstandigheden de zuurgraad niet hoog genoeg kan stijgen, kan een enting met de juiste melkzuurbacteriën dit gebrek niet opheffen, omdat de suiker ontbreekt, welke voor een voldoende melkzuurvorming noodig is. In zoo'n geval geeft de enting slechts een geringe verbetering, zooals b.v. blijkt uit de proef van tabel 14, waarbij vergeleken werd een silage, welke spontaan zuurde en een van hetzelfde grasmonster, doch geënt met cultuur van krachtig zurende staafvormige melkzuurbacteriën, geïsoleerd uit een silage van goede kwaliteit.

TABEL 14.

Gras, geënsileerd in glazen potten op 18-8 '34.

	pH van de onderlaag na				
	2 dagen.	3 dagen.	4 dagen.	6 dagen.	9 dagen.
Niet geënt	4,78	4,61	4,60	4,58	4,65
Geënt	4,50	4,44	4,44	4,42	4,40

Bij de ensileering zonder enting ontwikkelen zich n.l. in den beginne allerlei types van melkzuurbacteriën (zie hoofdstuk 6), waaruit de krachtig zurende pas later op den voorgrond treden. Bij enting vangt dadelijk de goede zuring aan en wordt ook de eerste phase, de ontwikkeling van suiker ontleedende bacteriën, welke niet tot de melkzuurbacteriën behooren, beperkt.

Bij het gebruik van zure wei voor de ensileering ent men den silo-inhoud met de bacteriën, welke in de zure wei voorkomen en dit is een zeer groot aantal, daar in uitgezuurde zuivelvloeistoffen vele millioenen melkzuurbacteriën per ml voorkomen. Daar men de wei meestal slechts enkele dagen oud laat worden vóór ze bij de ensileering te gebruiken, daar bij langer bewaren in open kuipen of tanks dit product sterk beschimmelt, zijn deze bacteriën practisch alle van het streptococcentype, welk type algemeen in de Nederlandsche zuivelindustrie voorkomt. De siloinhoud wordt dus geënt met melkzuurbacteriën van de soorten *Streptococcus cremoris* en *Streptococcus lactis*, welke afkomstig zijn uit het bij de kaasbereiding gebruikte zuursel en uit de rauwe melk. Indien deze bacteriën goede silagebacteriën waren, zou van hun enting in de plantenmassa wel eenig effect verwacht kunnen worden. Er bestaat evenwel gerechte twijfel of deze bacteriën van eenig nut in een silage

kunnen zijn. Het zuringsvermogen van de zuivelstreptococceen is n.l. gering in vergelijking met dat van in een goede silage voorkomende melkzuurbacteriën. Bij vergelijking van de zuurvorming in verdunde gistautolysaat (1 deel gistautolysaat ⁴) + 9 deelen water) met koolhydraat, in welken bodem zoowel de in silages als in zuivelproducten voorkomende melkzuurbacteriën goed groeien, vonden wij b.v. na 1 maand bij 20°.

TABEL 15.

(Januari 1936.)

Weistrectococceen.					Silagemelkzuurbacteriën.				
Stam n°.	Gistautolysaat (1 + 9) + 2 %				Stam n°.	Gistautolysaat (1 + 9) + 2 %			
	Glucose.		Lactose.			Glucose.		Lactose.	
	pH	titer	pH	titer		pH	titer	pH	titer
IV	4,08	1,7	4,27	1,1	I b	3,72	4,3	3,84	5,2
15	4,13	1,6	4,26	1,3	I n	3,47	7,1	—	—
18	3,88	2,7	4,10	1,9	II a	3,69	4,9	3,89	3,8
21	3,87	2,7	4,01	2,0	III l	3,44	9,6	3,72	6,6
24	3,84	3,2	3,95	2,4	IV l	3,44	8,3	3,63	6,4
30	3,88	2,7	3,99	2,3	VII d	3,60	5,1	3,61	6,2
48	3,87	2,7	4,09	1,9	XXI	3,49	9,6	4,37	3,2
62	3,92	2,6	4,02	2,2	XXIII	3,55	7,4	—	—
R 6	3,98	2,1	4,07	1,8	XXIV	3,49	8,3	3,66	7,1
Ongeënt . .	5,65	—	5,65	—	XXVIII	3,39	9,0	3,56	7,2

De titer is opgegeven in ml n/10 per 10 ml na aftrek van den titer der ongeënte.

Daar de meeste van de in deze tabel vermelde silagemelkzuurbacteriën van het staafvormige type zijn, is dit verschil ook te verwachten, omdat de sterkst zurende melkzuurbacteriën onder de staafvormige gevonden worden.

Bij een silage, waarvan het koolhydraatgehalte hoog genoeg is om een flinke zuring te kunnen ondergaan, kunnen dus de weistrectococceen in geen geval aan de laatste phase der zuring meedoen. De laatste phase moet geschieden door de werkzaamheid der staafvormige melkzuurbacteriën.

Men zou dus alleen in de eerste phase der zuring een gunstigen invloed van de weistrectococceen kunnen verwachten, vooral omdat de snelheid, waarmede de verzuring geschiedt, voor deze bacteriën zoo groot is. Doch ook dit valt ten zeerste te betwijfelen, omdat de zuivelstreptococceen in een silage een geheel anderen voedingsbodem vinden dan in melk. In een silage vinden zij als voedingsvloeistof grassap en dat grassap geen gunstige bodem is, bleek bij een proef van Maart 1934, toen 21 stammen van zuivelstreptococceen in graswater (bereid door gelijke gewichtsdeelen versch gras en water in een

stoompot te verhitten gedurende 1 uur en daarna te filtreren en te steriliseeren) van pH 5,6 geënt werden. Van deze 21 stammen bereikten er

5	een eind-pH van 4,1 à 4,2,
2	„ „ „ 4,2 à 4,3,
3	„ „ „ 4,3 à 4,5,
6	„ „ „ 4,5 à 5,0,

terwijl 5 zelfs niet gegroeid waren.

Bij een dergelijke proef van April 1935 was het resultaat evenzoo. Van 35 stammen bereikten

1	een eind-pH van 4,1,
1	„ „ „ 4,4,

alle andere gaven een hoogere waarde.

Zelfs bij toevoeging van 1 % lactose aan het graswater, waarvan men van te voren niet weet of het voldoende koolhydraten bevat, werd geen verbetering gekregen. Ook bij deze proef van April 1935 weigerde een aantal stammen zelfs te groeien.

Ongekeerd zien wij, dat de hierboven reeds genoemde silagemelkzuurbacteriën in het algemeen een slechte ontwikkeling in melk en wei vertoonen. Hoewel de uit koude silages geïsoleerde best zurende staafvormige melkzuurbacteriën een sterker zurend vermogen hebben dan de zuivelstreptococcen, is de door hen in melk veroorzaakte eindzuurgraad slechts weinig hoger dan die der zuivelstreptococcen. In melk zuren deze uit silages geïsoleerde bacteriën dan meestal ook niet tot een pH beneden 4. (Zie tabel 16).

Ter vergelijking met de in tabel 16 opgenomen gegevens diene, dat de eindtiter van zuivelstreptococcen in melk ongeveer 10 cc n/10 per 10 g bedraagt en die van de vroeger reeds genoemde (in verband met tabel 9) en hieronder nog nader te bespreken speciaal aan melk aangepaste staafvormige zuivelmelkzuurbacteriën 19 à 21.

TABEL 16.

Eindtiter van staafvormige silagemelkzuurbacteriën in melk in cc n/10.

N ^o .	Titer per 10 g.	N ^o .	Titer per 10 g.
I l	7,15	32 L	9,0
I o	11,9	III g	9,0
I p	12,0	IV h	13,6
XXIV	12,45	III	12,8
a g	11,4	H. 115	10,4
October 1935.		September 1936.	

Uit het bovenstaande moeten wij wel de conclusie trekken, dat silage en melk ieder hun eigen melkzuurbacteriënflora bezitten. Om deze reden ligt het ook niet voor de hand om te verwachten, dat de toevoeging van wei, als zijnde een gunstige voedingsbodem voor verschillende melkzuurbacteriën, de silage tot een beteren voedingsbodem voor de gewenschte melkzuurbacteriën maakt.

Bij het bovenstaande is alleen nog maar rekening gehouden met de streptococcenflora in melk en wei. In deze stoffen kan zich ook nog een andere melkzuurbacteriënflora ontwikkelen. Indien men n.l. wei of melk lang bewaart bij afsluiting van de lucht om schimmelwoekering tegen te gaan, dus b.v. in gesloten fleschjes, stijgt de zuurgraad steeds verder, terwijl de streptococci sterven. Er ontstaat een heterogene flora van staafvormige bacteriën.

Dit proces duurt zeer lang. Bij 20° wordt de eindzuurgraad pas na ongeveer 4 weken bereikt, gelijk men ziet in tabel 17.

TABEL 17.

Rauwe verse wei op 3 Juli 1935 in fleschjes.

Na	Titer per 10 g.	pH.
1 week	5,7	3,96
2 weken	5,9	4,16
3 „	9,0	4,00
4 „	13,0	3,64

Ent men uit een dergelijk 4 weken oud fleschje over, dan verloopt deze zuring sneller.

TABEL 18.

Overenting van 4 weken oude gezuurde wei in fleschjes gesteriliseerde melk en wei.

Na	Melk.		Wei.	
	Titer per 10 g.	pH.	Titer per 10 g.	pH.
1 week	15,7	4,00	7,15	4,06
2 weken	—	3,68	15,6	3,59
3 „	20,7	3,66	17,2	3,57
4 „	20,2	3,64	18,1	3,53

Uit het zeer heterogene mengsel van bacteriën in deze ophooping kan één soort geïsoleerd worden, welke voor deze sterke zuring in melk of wei verantwoordelijk is. Het is „*Streptobacterium casei*”. Deze bacterie vormt in reincultuur in melk ongeveer 20 cc n/10 zuur per 10 g bij een eind-pH van 3,55.

Van deze bacteriesoort zou men, eerder dan van de weistreptococcon, een gunstige werking in silages kunnen verwachten. Doch ook hiervoor moet men zich hoeden. In de praktijk wordt uit praktische overwegingen versche wei gebruikt of wei, welke slechts gedurende 1 à 3 dagen gelegenheid tot zuren gehad heeft vóór het voeder ermee geënsileerd werd. In deze periode is het aantal bacteriën van het type *Sb. casei* echter nog uiterst gering, zoodat met het oog op de aanwezigheid van zoo vele melkzuurbacteriën van ander type, van een enting van eenige beteekenis met deze bacteriën geen sprake is. In deze gevallen wordt de zuring in de silage volvoerd door de typische gras-melkzuurbacteriën. Bij onze proeven werd de *Sb. casei* in het algemeen slechts gevonden indien de silage er van te voren zwaar mede geënt was. Slechts in 1 geval werd een hoofdflora van *Sb. casei* gevonden zonder dat een enting met deze bacteriën toegepast was en dit was nog bij een proef, waarbij zeer veel gesteriliseerde wei werd gebruikt, zoodat de daarbij voor de bacteriën ontstane voedingsbodem zeer veel van grassap verschilde.

Resumeerende mogen wij dus zeggen, dat bij een praktijkensileering met wei of andere zuivelstoffen de typische zuivelbacteriën: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* en *Streptobacterium casei* van geen belang kunnen zijn. *Het gras zelf beschikt over goede melkzuurbacteriën.*

Men ziet dan ook hoe bij proefensileeringen het resultaat practisch onafhankelijk is van deze zuivelmelkzuurbacteriën. In tabel 19 ziet men bij de potten, gemerkt II en III hoe in het verloop van de zuring en in den eindtoestand geen verschil is of men rauwe zure wei of gepasteuriseerde versche wei gebruikt. Ook bij de potten X, XI en XII is geen noemenswaard verschil te constateeren. Bij de pottenreeks XXII had de toevoeging van een suspensie van zuivelstreptococcon niet het minste effect op den eindzuurgraad. Analyse van het sap in de eerste dagen na de ensileering deed eveneens geen verschil tusschen de potten met en zonder deze streptococcon te voorschijn komen. Bij de potten XXVI was er slechts verschil dat de zuurgraadstoename in de pot met alleen streptococcon-wei (XXVI e) iets achter die met streptococcon- en streptobacteriën-wei (XXVI c) aankwam.

Bij de parallelproeven in deze tabel werd zorg gedragen voor een zooveel mogelijk gelijke suikerconcentratie. Voor de potten II en III werd eenzelfde hoeveelheid van dezelfde wei gebruikt; voor de potten II werd deze wei in verschen toestand gedurende een half uur gepasteuriseerd op 98° C; voor

TABEL 19.

Pot n°.	Ge-maakt op:	Inhoud der potten.	Na:	Onderlaag.			
				pH.	M.Z.	A.Z.	B.Z.
II A II B II C	26-4 '35	Gras + gepasteuriseerde verse wei	3 dagen 10 „ 59 „	4,65 4,16 3,98	1,26 1,76 2,30	0,19 0,295 0,42	0,01 0,03 0
III A III B III C	26-4 '35	Gras + rauwe zure wei (1 dag oud)	3 dagen 10 „ 59 „	4,54 3,95 3,81	1,05 1,86 2,34	0,045 0,185 0,42	0 0 0
X A X B X C	5-6 '35	Gras + gepasteuriseerde verse wei	8 dagen 28 „ 71 „	4,02 3,86 3,83	1,18 1,92 2,27	0,215 0,31 0,355	0 0 0
XI A XI B XI C	5-6 '35	Gras + gepasteuriseerde zure wei (1 dag oud)	8 dagen 28 „ 71 „	4,02 3,90 3,85	1,34 2,20 2,11	0,22 0,32 0,38	0 0 0
XII A XII B XII C	5-6 '35	Gras + rauwe zure wei (1 dag oud)	8 dagen 28 „ 71 „	3,98 3,82 3,87	1,13 2,00 2,04	0,13 0,24 0,325	0 0 0
XXII b XXII i	26-7 '35	Gras, klaver + water + 1 % glucose	69 dagen	3,98	2,27	0,29	0
		Idem + suspensie van zuivelstreptococci	69 „	4,00	2,16	0,325	0
XXII d XXII k		Gras, klaver + water + 1 % lactose	69 „	3,99	2,28	0,32	0
		Idem + suspensie van zuivelstreptococci	69 „	4,07	2,14	0,36	0,01
XXVI c XXVI e	23-8 '35	Gras, klaver + gewone zure wei + sterk zure wei	76 dagen	4,04	1,83	0,68	0
		Gras, klaver + gewone zure wei	76 „	4,12	1,81	0,60	0

de potten III was deze wei 24 uur rauw blijven staan. Een klein deel van de suiker in deze wei was dus reeds vóór de ensileering door melkzuurgisting in melkzuur omgezet. De pH van deze wei was op het oogenblik van ensileering 4,32. De pottenreeksen X, XI en XII werden op dezelfde wijze behandeld. De suspensie van zuivelstreptococci bij de potten, gemerkt XXII, werd verkregen door een cultuur in glucose-vleeschbouillon van kaazuurselbacteriën (dit zijn uitsluitend streptococci) te centrifugeeren en uit te wassen en het bacteriënneerslag in de voor de ensileering benodigde hoe-

veelheid suikeroplossing op te roeren. De pot XXVI c werd gemaakt van 600 g gras-klaver-mengsel met 75 ml cultuur van zuurselstreptococceen in gesteriliseerde wei (zure wei), waarvan de pH 3,94 was en 75 ml van een uitgezuurde wei, als bedoeld in tabel 18 (sterk zure wei), waarvan de pH 3,44 was.

Op grond van het vorenstaande moet dus geconcludeerd worden, dat de met de wei bij een ensileering ingebrachte melkzuurbacteriën practisch van geen belang in het ensileeringsproces zijn, doch dat de gunstige werking van weitoevoeging toegeschreven moet worden aan de met de wei toegevoerde suiker, welke een verder gaande verzuring mogelijk maakt. Ditzelfde geldt ook voor andere zuivelstoffen, zoodat in plaats van wei ook gebruikt kan worden: centrifugemelk, gezuurde centrifugemelk en karnemelk. Enkele voorbeelden hiervan geven wij nog in tabel 20.

TABEL 20.

Pot n°.	Gemaakt op:	Potten gevuld met:	pH van het sap na			Onderlaag				
			1 d.	6 d.	55 d.	na	pH	M.Z.	A.Z.	B.Z.
XIX	25-6 '35	Gras, klaver + water	5,07	4,82	—	—	—	—	—	—
XX		Gras, klaver + centrifugemelk, geënt met zuursel	4,82	3,95	—	—	—	—	—	—
XXII a	26-7 '35	Gras, klaver + water	—	5,00	4,66	69 d.	4,20	1,81	0,35	0
XXIII a		Gras, klaver + zuursel	—	4,25	4,09	69 d.	3,93	2,70	0,25	0
XXXVI a	19-10 '35	Gras + water	—	5,90	—	107 d.	4,97	—	—	—
XXXVI b		Gras + rauwe versche wei	—	4,34	—	107 d.	3,95	1,88	0,43	0,04

Zien wij thans terug op het in dit hoofdstuk medegedeelde, dan blijkt in de eerste plaats het nut van de toevoeging van suiker aan het te ensileeren voeder, gelijk deze reeds dikwijls in de ensileeringspraktijk wordt toegepast. Ter verkrijging van de noodzakelijke homogeniteit schijnt het aangewezen de suiker in opgelosten toestand te gebruiken.

Wat de wei betreft mogen we zeggen, dat een gunstige invloed van wei-toevoeging bij de ensileering niet een gevolg is van de met de wei ingebrachte

melkzuurbacteriën. Dit wil zeggen, dat de functie van de wei (zure wei) niet berust op een enting met melkzuurbacteriën. Het heeft dus geen zin om de zure wei als een entvloeistof van gunstige bacteriën te beschouwen. Weitoevoegingen in hoeveelheden als men zou gebruiken bij een entvloeistof, dus bv. 0,1 % à 1 %, hebben daarom geen beteekenis. Zelfs van de staafvormige *Streptobacterium casei* kan men weinig verwachten, daar deze in wei in slechts geringe aantallen voorkomt. Bovendien heeft deze bacterie voor algemeen gebruik in de silagezuring het nadeel, dat zij rietsuiker slechts in zeer beperkte mate aantast, wat van belang kan zijn daar in de silagepraktijk rietsuiker als toevoegsel veelvuldig gebruikt wordt.

De beteekenis van wei en dergelijke stoffen kan slechts liggen in het suikergehalte, hetwelk een hooger melkzuurpercentage als gevolg heeft en het verhoogde vochtgehalte, hetgeen een betere homogeniteit van de silage waarborgt. Daaruit volgt, dat niet ieder percentage wei voldoende is om den gewenscht hoogen zuurgraad te bereiken. Blijkens onze in de afgelopen 2 jaren verkregen ervaring, kan de samenstelling van verschillende grasmonsters zóó uiteenlopen en vermoedelijk ook binnen kort tijdsverloop zoodanig variëeren, dat niet aan te geven is welk weipercentage voor een goede conserveering noodig is. In het eene geval zal een hoeveelheid van 4 % goede resultaten kunnen geven (dit komt overeen met hoogstens 0,2 % suiker), in een ander geval zal 20 % (overeenkomende met 1 % suiker in de silage) niet voldoende zijn om de silage blijvend in het stabiele pH-gebied te brengen. Bij proeven in betonnen silo's, waarbij door ons herfstgras met 1 % suiker werd geënsileerd en andere, waarbij 20 % wei werd toegevoegd, kregen wij een zuurgraadsverhoging, welke nog onvoldoende was om de silage blijvend goed te houden.

Men kan het effect van weitoevoeging nog verbeteren door aan de wei extra-suiker, b.v. rietsuiker (beetwortelsuiker) toe te voegen, zooals in Nederland reeds eenige keeren in de praktijk gedaan werd.

Als nadeel van het gebruik van wei in vergelijking met dezelfde hoeveelheid suiker als oplossing in water moge hier nog genoemd worden, dat met de wei niet alleen suiker, doch ook nog bufferende stoffen toegevoegd worden.

Waar het nut van het gebruik van suiker voor verbetering van de ensileering wel zeer duidelijk gebleken is, schijnt het voor een goede ensileering wel het gunstigst te zijn als het suikergehalte zóó hoog is, dat zelfs bij het openen van den silo, dat is dus na eenige maanden, nog vergistbare suiker aanwezig is. Waarschijnlijk berust hierop ook de uitermate groote geschiktheid van mais als silageplant, gelijk men in de Vereenigde Staten van Noord-Amerika gevonden heeft. In verband hiermede wijzen wij op een artikel van PETERSON, HASTINGS en FRED ⁵⁾. Zij vonden in 140 dagen oude maissilage met ongeveer 8 % melkzuur in de droge stof en een pH van 3,8 nog een hoeveelheid van

ongeveer 2 % suiker, berekend als glucose op de droge stof. De aanwezigheid van zooveel vergistbare koolhydraat, dat hiervan na het einde der melkzuurgisting nog een deel aanwezig is, geeft wel de grootst mogelijke bedrijfszekerheid, doch in werkelijkheid behoeft de eisch, wat het suikergehalte betreft, niet zoo ver te gaan. Theoretisch is het voldoende als de suiker aanleiding kan geven tot de vorming van zooveel melkzuur, dat de silage in het stabiele pH-gebied komt. Uit veiligheidsoverwegingen moet evenwel een silage gunstiger beoordeeld worden naarmate zij verder van de grens tusschen het stabiele en het instabiele pH-gebied aflight, d.w.z. naarmate de pH lager is. Ligt n.l. de pH van een silage slechts weinig onder deze grens, dan kunnen kleine invloeden gedurende den langen tijd, dat een silage bewaard wordt, toch nog aanleiding zijn dat de grens in ongunstige richting overschreden wordt. Wij hebben deze invloeden reeds genoemd (b.v. kernen met hooger pH) en we kregen enkele aanwijzingen, dat mogelijkerwijze ook een langzaam toenemen van het gehalte aan oplosbare stikstof tijdens de bewaring de buffering van de silage vergroot, waardoor de pH een langzame stijging kan vertoonen. Deze stijging van het gehalte aan oplosbare stikstof is ook door PETERSON, HASTINGS en FRED ⁵⁾ waargenomen.

6. Bacteriologie der melkzuurgisting in een silage.

Bij vele der in de vorige hoofdstukken beschreven potproeven is de melkzuurbacteriënflora onderzocht. Daartoe werden enkele steriel uit de massa genomen grassprietjes geschud in steriel water en van de aldus verkregen suspensie koloniëncultures aangelegd in verschillende verdunningen op vleeschbouillon-glucose-gelatine. Van de verkregen cultures werden verschillende koloniën afgeënt; van deze bacteriën werden reïncultures gemaakt en de diverse reïncultures werden nader bestudeerd.

Een dergelijk onderzoek is zeer tijdroovend en vooral bij groote variatie in de bacterieflora is het moeilijk om de bacteriënanalyse zóó volledig te maken als men wel zou wenschen. Deze moeilijkheid ondervindt men vooral in het onderhavige geval, want het onderzoek der flora van silages geeft een zeer verward beeld. Naast elkaar komen voor coccus- en staafvormige bacteriën van zeer verschillend type en men vindt zoowel sterk zurende als zwak zurende melkzuurbacteriën. Deze indeeling in „sterk” en „zwak” zurende wordt uit practische overwegingen gebruikt. Met sterk zurende worden bedoeld de soorten, welke tijdens hun gisting een hooge concentratie aan melkzuur produceeren, met zwak zurende die, welke slechts weinig melkzuur vormen. Overgangstypes tusschen deze kwaliteiten van melkzuurbacteriën komen evenzeer voor en men vindt diverse soorten zoowel in jongere als in oudere,

in goede en in slechte silages, zoodat het schijnt, dat de melkzuurbacteriënflora geen verband houdt met den aard der silage.

Na een gedetailleerde studie is het ons toch mogen gelukken eenig inzicht te krijgen in de ontwikkeling der bacteriënflora, hoe moeilijk het ook leek in het verwarrende beeld der flora te oriënteren. Over de beschrijving, eigenschappen en indeeling dezer bacteriën hopen wij later te berichten.

In groote trekken moet men onderscheiden:

I. Zuivelmelkzuurbacterien. De coccusvormige uit deze groep, dat zijn dus *Streptococcus lactis* en *Sc. cremoris* zullen wij aanduiden als „zuivelcoccen”, de staafvormige van het type *Streptobacterium casei* als „zuivelstaven.”

II. Silagemelkzuurbacterien. De coccusvormige noemen wij gemakshalve „grascoccen”, de staafvormige „grasstaven”.

In de groep van silagemelkzuurbacteriën vinden we zoowel bij de coccen als bij de staven sterk zurende en zwak zurende types. De best zurende tegenwoordiger uit de groep der grasstaven is *Streptobacterium plantarum*.

De zwak zurende soorten kunnen voor de snelle melkzuurgisting in een silage geen beteekenis hebben, doch zij zijn het , die het beeld der bacteriënflora zoo vertroebelen. Laat men evenwel deze slecht zurende soorten, zij het coccen of staven, buiten beschouwing of isoleert men uit een silage alleen maar types, welke sterk zurende eigenschappen bezitten, dan wordt het beeld overzichtelijker.

Eerst worde het geval besproken van ensileering zonder toevoeging van gezuurde zuivelstoffen.

Als voorbeeld beschouwen we een silage van 600 g gras met 150 ml 10 % glucose-oplossing, gemaakt op 4 Oct. 1935.

Na 5 dagen werden hierin bij een pH van 3,99 sterk zurende grascoccen gevonden, na 10 dagen bij een pH van 3,84 sterk zurende grasstaven. Na 15 dagen werden bijna uitsluitend grasstaven gevonden van iets minder goede kwaliteit, doch na den 10den dag was ook geen verandering meer in den zuurgraad opgetreden.

Bij een zelfde ensileering van 18 Nov. 1935 werden tot 7 dagen in de goed zurende flora hoofdzakelijk sterk zurende grascoccen gevonden, toen de pH nog slechts tot 4,12 gedaald was.

Dergelijke proeven hebben ons doen zien, dat bij een ensileering, welke voert tot een hoog gezuurd product (pH beneden 3,90), de eerste phase der zuring uitgevoerd wordt door de sterk zurende grascoccen. De verdere zuring geschiedt door de sterk zurende grasstaven. Voor dit verloop zijn ook bacteriologische oorzaken aan te geven. In het algemeen produceeren coccusvormige

melkzuurbacteriën minder zuur dan de goede staaformige. Is er dus na het bereiken van den voor de cocceen geldenden eindzuurgraad nog suiker aanwezig dan kan deze suiker alleen nog maar door de staaformige tot melkzuur worden omgezet. Een tweede reden hiervoor is gelegen in de zuringssnelheid dezer beide groepen van melkzuurbacteriën. In het algemeen is de ontwikkelingsnelheid van melkzuurstreptococceen grooter dan van de melkzuurstaven, indien men ten minste deze snelheden vergelijkt in het temperatuurgebied, waarin beide een goeden groei vertoonen en zeker bij de temperatuur, waarbij in de z.g. koude silage de melkzuurgisting verloopt. Na het bereiken van den eindzuurgraad, zooals deze voor de streptococceen geldt, sterven de sterk zurende grascocceen spoedig af, waardoor men ze in oudere silages niet meer vindt.

We zien dus in een silage (bedoeld is eene zonder toevoeging van zuivelstoffen) een floraontwikkeling, welke volkomen parallel loopt met die in melk. Ook in rauwe melk vindt eerst een zuring plaats, welke door de zeer snel zurende streptococceen wordt uitgevoerd. Na deze zuring wordt hun verzuringstaak overgenomen door de Streptobacteriën, waarbij, tijdens de door deze uitgevoerde zuring, de streptococceen spoedig sterven. Het verschil met een silage bestaat slechts daarin, dat het suikergehalte van melk altijd hoog genoeg is om dit verschijnsel te doen geschieden en dat bij silages het suikergehalte dikwijls zoo laag is, dat de tweede phase, te weten de zuring der staaformige, slechts zeer beperkt is. Bovendien zijn er in een silage andere soorten van melkzuurbacteriën bij betrokken dan in melk.

In het geval, dat de suikerhoeveelheid in een silage slechts beperkt is, vindt de eerste phase der zuring weer, als te verwachten, plaats door de werkzaamheid der sterk zurende grascocceen. In de tweede phase vindt men dan slechts sporadisch de sterk zurende grasstaven, doch in hoofdzaak grasstaven van minder goede kwaliteit.

In oude silages vindt men dus geen sterk zurende grascocceen meer. Ook de sterk zurende grasstaven zijn meestal voor het allergrootste deel gestorven, zoodat men in oude silages van hoogen zuurgraad dikwijls slechts een zeer gering aantal bacteriën meer aantreft. Bij silages van minder hoogen zuurgraad wordt nog wel een groot aantal bacteriën gevonden, doch ook in deze flora missen de sterk zurende grascocceen en -staven. De flora in deze silages bestaat vrijwel uitsluitend uit zwak zurende grascocceen en minder goede of slechte grasstaven. De zwak zurende grascocceen schijnen zich te ontwikkelen in een suikerarm of suikervrij milieu van niet te hoogen zuurgraad. Het gevolg daarvan is, dat men ze dus vindt in jonge slechte silages, omdat de suikervoorraad hierin zoo spoedig uitgeput was, in oude silages van tamelijk goede kwaliteit, omdat hierin de gisting reeds lang afgelopen is zonder dat de zuurgraad al te hoog werd, en in oude silages van slechte kwaliteit.

De zwak zurende grasstaven werden altijd aangetroffen in zeer jonge silages, vooral op den eersten en tweeden dag.

Wat is nu de invloed van de toevoeging van wei of andere zuivelstoffen op de hierboven beschreven ontwikkeling der melkzuurbacteriënflora in een silage?

Bacteriënvrije wei veroorzaakt practisch geen verandering in deze flora-ontwikkeling. Zelfs bij groote hoeveelheden gepasteuriseerde wei bleef de eerste phase bestaan uit een zuring door grascoccen. In de tweede phase werden in dergelijke gevallen een enkele keer weistaven gevonden.

Bij het gebruik van zure wei bestond tijdens de eerste dagen de flora uitsluitend uit zuivelcoccen, die er bij onze proeven door het gebruik van 150 ml wei op 600 g gras bij zulke groote aantallen ingebracht waren, dat in de silage geen andere bacteriën waren te vinden. In de tweede phase zagen wij weer grasstaven, doch ook kwamen wel zuivelstaven voor. Bij enting met de z.g. sterk zure wei (een cultuur van *Streptobacterium casei*) werden deze zuivelstaven meer gevonden doch zelfs dan waren daarnaast de grasstaven niet altijd afwezig. Ook deze bacteriënanalyses bewijzen dus de weinig beteekenende waarde van zure wei als melkzuurbacteriënbron. Bij zware enting doen ze wel aan de zuring mede, doch noodig zijn ze niet en het verloop der zuring wordt er niet gunstiger van.

Wij hebben nog getracht entingen der silage met deze verschillende bacteriesoorten te verrichten. Deze proeven zijn evenwel zeer moeilijk uit te voeren, omdat, wil men ze eenigszins doen gelijken op natuurlijke silage, de steriliteit niet te handhaven is. Op den duur treden altijd storende infecties op. Daarom is in tabel 21 alleen het resultaat van een dergelijke proef in de eerste dagen vermeld.

TABEL 21.

*600 g gepasteuriseerd weilandgras met 90 ml 10 % -glucose-oplossing en 10 ml cultuur van melkzuurbacteriën in wei of in glucose-gistautolysaat.
Gemaakt op 18-10 '35.*

Geënt met:	pH van het sap na			Flora na 4 dagen.
	1 d.	2 d.	4 d.	
Grascoccen	5,66	4,44	4,28	coccen
Grasstaven	5,67	3,92	3,80	staven
"	5,65	4,04	3,78	"
Grascoccen + grasstaven	5,73	4,04	3,83	coccen + staven
Weicoccen	5,11	4,63	4,47	coccen
Weicoccen + weistaven	4,70	4,44	4,30	coccen + staven
Weicoccen + grasstaven	4,85	4,43	4,16	coccen + staven

We zien uit deze tabel hoe gunstig de grasstaven werken en hoe ook bij het mengsel van grascoccon en grasstaven de eene soort de andere niet hindert in haar zuurvorming. Men bedenke bij deze tabel dat deze proeven niet vergelijkbaar zijn met praktijkensileeringen, omdat door de enting een geheel andere begintoestand in de silage heerscht dan onder gewone omstandigheden.

7. Azijnzuursilages.

Bij silages met onvoldoende melkzuurvorming zien we na verloop van tijd steeds boterzuur ontstaan. Daarbij gaat in deze silages een stijging van het boterzuur gehalte gepaard met een daling van het gehalte aan melkzuur.

Bij onze proefreeksen zijn wij in een enkel geval gestuit op een silagebederf, waarbij als gewoonlijk een pH-stijging geconstateerd werd, samengaannde met rottingsverschijnselen. Daarnaast was echter niet in alle potten der proefreeksen boterzuur ontstaan, doch was de eindtoestand gekarakteriseerd door een abnormaal hoog azijnzuur gehalte.

TABEL 22.

*Ensileering van 500 g gras met verschillende hoeveelheden water op 7-9 '34.
Onderlaag onderzocht na 89 dagen.*

Hoeveelheid water.	Geur.	pH.	A.Z.	B.Z.
100 ml.	zeer rot	5,78	0,64	0,72
150 "	" "	6,24	0,49	0,82
200 "	rot	5,70	0,81	0,09
250 "	"	5,47	1,03	0,05
300 "	zuur, rot	5,09	0,96	0
350 "	" " "	4,89	1,08	0
400 "	" " "	5,45	0,95	0

In tabel 22 zien we het proces in de eerste twee potten volgens de verwachting verlopen. Bij de volgende twee potten is reeds bijna geen boterzuur aanwezig en in de laatste drie potten kon geen boterzuur aangetoond worden. Daarentegen was in deze 5 potten het gehalte aan azijnzuur sterk afwijkend.

Naar analogie van de boterzuurgisting is men bij dit abnormale verloop geneigd te veronderstellen, dat het melkzuur niet tot boterzuur doch tot azijnzuur vergist is. Daar geen melkzuurbepalingen verricht werden, is dit niet te constateeren geweest.

Nog in een ander geval is de boterzuurgisting, hoewel zij met het oog op den ongunstigen pH verwacht kon worden, uitgebleven. Hier waren jonge

klaverblaadjes met diverse toevoegsels geënsileerd. Rotting was in 5 van de 6 potten, blijkens den geur, niet opgetreden.

TABEL 23.

500 g jonge klaver, geënsileerd met 125 ml vloeistof op 19-6 '35.

Toevoegsel.	Laagste pH.	Onderlaag na 61 dagen.					
		Geur.	pH.	M.Z.	A.Z.	B.Z.	Suiker.
Water.	4,94	rot	6,00	—	—	—	—
4 % glucose-oplossing.	4,31	zuur, gras	4,80	0,99	0,64	0	afw.
4 % glucose, 1 % pepton-oplossing	4,26	„ , scherp	5,01	0,77	0,70	0	„
Zoete gepasteuriseerde wei	4,36	„ , gras	4,89	0,90	0,675	0,06	„
Zure wei	4,28	appel	4,77	1,21	0,63	0	„
Gepasteuriseerde zure wei.	4,21	zuur, gras	4,98	0,72	0,79	0	„

Bezien we de cijfers van tabel 23, dan valt wederom het hoge azijnzuur-gehalte op. Uit de gegevens is niet met zekerheid te concluderen of een deel van het azijnzuur uit melkzuur ontstaan is. Wel is opvallend, dat een hoger melkzuurcijfer correspondeert met een lageren pH en een lager azijnzuurgetal. Dit geeft wel een aanwijzing, zij het onduidelijk, dat bij het voortschrijden van het proces melkzuur door azijnzuur vervangen wordt.

Ten gevolge van de zeldzaamheid van dit verschijnsel zijn wij niet in de gelegenheid geweest hierover nadere onderzoekingen te doen, zoodat wij slechts op het feit kunnen wijzen, zonder er een nadere verklaring van te geven.

LITERATUUR.

- 1) J. C. DE RUYTER DE WILDT, E. BROUWER en N. D. DIJKSTRA, Proefnemingen omtrent inkuiling met en zonder toevoeging van mineraal zuur II. Versl. van Landbk. Onderz., 40 C (1934) 585, en Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1933, bladz. 161.
- 2) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Bacteriële processen in geconserveerd groenvoeder en hun invloed op de kaasbereiding. Versl. van Landbk. Onderz., 40 C (1934) 777, en Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1934, bladz. 1.
- 3) G. J. LIENESCH, Een nieuwe methode voor het conserveren van groenvoeder. Mededeelingen van het Landbouwkundig Bureau der Staatsmijnen in Limburg, N°. 9 (1935) 154.
- 4) Zie J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën. Versl. van Landbk. Onderz., 40 C (1934) 543, speciaal bladz. 565, en Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1933, bladz. 119, speciaal bladz. 141.
- 5) W. H. PETERSON, E. G. HASTINGS and E. B. FRED, A study of the principal changes which take place in the making of silage, Agric. Exp. Stat. of University of Wisconsin, Research Bulletin 61 (1925).

KORT OVERZICHT.

In 1935 zijn in Nederland in de praktijk vele silages gemaakt, waaraan, ter verbetering van de kwaliteit, zure wei, gezuurde ondermelk of karnemelk werd toegevoegd. Om een oordeel te krijgen over het nut van het gebruik van wei en over de oorzaken, waaraan een eventueele gunstige werking van wei bij de ensileering moet worden toegeschreven, is een onderzoek over deze methode van ensileering verricht.

Indien na het vullen van den silo met groenvoeder de temperatuur niet al te hoog stijgt, begint er spoedig een melkzuurgisting, welke eindigt als de voor deze gisting noodige koolhydraten verbruikt zijn of als de zuurgraad zóó hoog gestegen is, dat de melkzuurbacteriën door het zuur in hun werkzaamheid geremd worden.

Is nu na afloop van de melkzuurgisting de pH van de silage door deze gisting gebracht op omstreeks 4 of lager, dan blijft de silage in goeden toestand, omdat geen bedervende bacteriële werkingen kunnen optreden (tabel 1). Is evenwel de pH niet zoo laag gedaald, dan kan een boterzuurgisting optreden, veroorzaakt door *Cl. tyrobutyricum*, waarbij het melkzuur aangetast wordt en in boterzuur omgezet. De pH stijgt hierdoor. Na eenigen tijd beginnen ook rottingsverschijnselen merkbaar te worden. Tabel 2 toont de stijging van den pH en van het boterzuurgehalte, benevens de daling van het melkzuurgehalte. In fig. 1 zijn deze twee gevallen grafisch voorgesteld in resp. de curven A, B en C voor goed blijvende en de curven D en E voor bedervende silages. Deze proeven, evenals de andere in dit onderzoek, werden uitgevoerd in glazen potten, waarin gras werd geënsileerd met water of andere toevoegsels.

Er is dus een stabiel en een instabiel pH-gebied. Bij een silage, welke door de melkzuurgisting niet in het stabiele pH-gebied gebracht werd, gaat de pH weer stijgen naar waarden van 5 à 5,5. De grens tusschen beide gebieden ligt bij een pH van omstreeks 4,2. Deze grens valt juist samen met de vroeger door ons aangegevene voor de zuurgevoeligheid der boterzuurbacteriën.

Een silage kan door anorganische zuren in het stabiele pH-gebied gebracht worden, doch ook door melkzuur. Enkele voorbeelden van gras met melkzuur vindt men in de tabellen 4 en 5 en in fig. 2. Het benodigde melkzuur kan door melkzuurbacteriën, die altijd op het voeder voorkomen, geleverd worden. Het al of niet bereiken van het stabiele pH-gebied hangt af van de samenstelling van het te ensileren voeder en wordt bepaald door suikergehalte en gehalte aan bufferende bestanddeelen. Blijkens de kwaliteit van verkregen proefsilages, kan de samenstelling verschillen van veld tot veld (tabel 6), doch ook op hetzelfde veld van dag tot dag (tabel 7).

Voor het verbeteren van de kwaliteit van een silage door tijdens de ensileering stoffen toe te voegen, zijn dus in de eerste plaats die middelen nuttig, die een verhooging van den zuurgraad der silage veroorzaken, b.v. anorganische zuren, suiker. De menging van het voeder en de toevoegsels moet zóó zorgvuldig geschieden, dat een zoo homogeen mogelijke silage ontstaat, anders vormen zich toch weer plekken met te hoogen pH, van waaruit door langzame neutralisatie ten gevolge van de melkzuurontleding het bederf zich door den silo verbreiden kan.

Vragen we ons af, waaraan de eventueele gunstige werking van zure wei bij een ensileering is toe te schrijven, dan kan verondersteld worden, dat de hierna onder 1° tot 4° genoemde factoren van invloed zijn. Van het belang van elk dezer factoren kunnen wij het volgende zeggen:

1°. *Verhooging van het vochtgehalte.*

Hierdoor wordt de lucht sneller uit den silo gedreven, waardoor oxydeerende processen beperkt worden en de melkzuurgisting met beter rendement verloopt. Niet altijd is de samenstelling van het voeder zoodanig, dat deze factor alleen voldoende verbetering kan brengen.

2°. *Toevoeging van een zure stof.*

Hierdoor zou het gras eerder sterven en sneller in elkaar zakken. Deze factor is echter van geen belang, daar de hoeveelheid zuur slechts zeer gering is. (Tabel 9).

3°. *Het suikergehalte van de wei.*

Daar suiker de bron is, waaruit melkzuur ontstaat, is van de toevoeging van suiker een gunstig effect te wachten. Inderdaad geeft de ensileering met suiker een hooger melkzuurgehalte en een lageren pH (tabellen 10 en 11). Zoowel lactose als glucose en saccharose zijn bruikbaar. De hoeveelheid toegevoegde suiker is eveneens van belang (tabel 12). De verbetering werd ook gekregen met gepasteuriseerde wei, welke in deze proef alleen als suikerbron beschouwd kan worden, daar door de pasteurisatie de werking der melkzuurbacteriën van de wei was uitgesloten (tabel 13).

4°. *Enting met melkzuurbacteriën.*

Een enting met krachtige melkzuurbacteriën is nuttig om het proces der zuring snel te laten verlopen met zoo weinig mogelijk nevenwerkingen. Bij gebruik van zure wei wordt met zuivelstreptococcen geënt. Deze zijn echter voor de silage van weinig nut, daar zij slechts weinig zuur produceeren (tabel 15)

en in grassap geen goeden voedingsbodem vinden. De belangrijke laatste phase der melkzuurgisting moet uitgevoerd worden door staafvormige melkzuurbacteriën, die méér zuur produceeren dan coccen. Ook in zure wei komen staafvormige melkzuurbacteriën voor (tabel 17), echter slechts in zeer gering aantal, zoodat hun invloed, te midden van de melkzuurbacteriën, die op het voeder voorkomen, slechts van weinig belang kan zijn. Proefensileeringen met en zonder zuivelmelkzuurbacteriën verliepen dan ook gelijk (tabel 19).

Het nut van wei en dergelijke stoffen bij de ensileering berust dus op een verhooging van het suikergehalte en mede op het vocht, dat een betere homogeniteit waarborgt. De in de zure wei voorkomende bacteriën hebben practisch geen beteekenis. De proeven bewijzen tevens het voordeel van een ensileering met suikertoevoeging, waarbij dan aan een suikeroplossing de voorkeur boven droge suiker gegeven moet worden. Evenwel moet bedacht worden, dat de hoeveelheid toevoegsel, welke noodig is om de silage goed te maken, ook van groot belang is, zoodat men niet kan zeggen, dat 5 of 10 % wei voor alle gevallen voldoende is.

Bij de zuring van het voeder zonder weitoevoeging zijn andere soorten melkzuurbacteriën betrokken dan bij de zuring van melk. Wij onderscheiden bij de silagemelkzuurbacteriën coccusvormige en staafvormige, die wij gemakshalve grascoccen en grasstaven noemen. In deze twee groepen zijn soorten, die veel en soorten die weinig zuur produceeren. Bij het bestudeeren van het verloop der melkzuurgisting in een koud blijvende silage vonden wij in de eerste phase der zuring sterk zurende grascoccen, in de tweede phase waren deze afgestorven en traden sterk zurende grasstaven op den voorgrond (*Streptobacterium plantarum*). Deze opvolging moet toegeschreven worden aan de snellere zuring door coccen en aan de grootere zuurproductie van de staven. In silages van onvoldoenden eindzuurgraad vindt men in de tweede phase hoofdzakelijk grasstaven met lagere zuurproductie.

In oude silages zijn meestal ook de sterk zurende grasstaven verdwenen. In goede oude silages treft men nog slechts weinig bacteriën aan, doch in slechtere oude silages vindt men zeer veel grascoccen van zwak zurend vermogen.

Zeer zwak zurende grasstaven worden ook in silages van verschillenden ouderdom gevonden, vooral echter in de allereerste dagen.

Bij toevoeging van zeer veel zure wei bevat de silage tijdens de eerste zuringsphase practisch slechts zuivelstreptococcen. Zij nemen blijkbaar een deel van de taak der grascoccen over, zonder evenwel verbetering te brengen. Bij zware enting met een cultuur van staafvormige zuivelmelkzuurbacteriën

(*Streptobacterium casei*) werden deze in alle fasen gevonden, doch meestal waren in de tweede fase der zuring ook de sterk zurende grasstaven aanwezig.

Deze bacteriënanalysen bewijzen eveneens de slechts betrekkelijke waarde der weimelkzuurbacteriën voor ensileringsdoeleinden. Zij zuren wel, doch bij hun aanwezigheid verloopt de zuring in een silage niet beter dan wanneer ze niet zijn toegevoegd.

In hoofdstuk 7 wordt de aandacht gevestigd op enkele gevallen, waarbij in een silage, waarvan de zuurgraad zoodanig was, dat boterzuurgisting verwacht kon worden, geen boterzuur gevonden werd doch een abnormale hoeveelheid azijnzuur. De zeldzaamheid van dit verschijnsel heeft een nader onderzoek hiernaar verhinderd. Uit de verrichte analyses kon niet met zekerheid geconcludeerd worden of deze meer dan gewone hoeveelheid azijnzuur uit ontleed melkzuur ontstaan is.

SUMMARY.

Bacteriological investigations about ensiling green forage with the addition of acid whey, skimmilk or sugar.

During the summer-season of 1935 in Netherland many silages were made, to which acid whey, acid skimmilk or buttermilk had been added in order to improve the quality. Investigations were carried out to get information whether the use of whey could be excepted as favourable and to determine to which causes an improvement must be ascribed.

If the temperature in the silo does not rise too high, the lactic-acid-fermentation soon begins. This fermentation ends when all fermentable sugar has disappeared or when the acidity inhibits the action of the lactic-acid-bacteria.

The silage remains in good condition when this lactic-acid-fermentation brought the pH to an end-value of about or below 4, because bacterial actions, which might spoil the silage, cannot take place at such high acidity (table 1). If the pH is not lowered so far a butyric-acid-fermentation can occur, during which lactic-acid is attacked by *Cl. tyrobutyricum* and converted into butyric-acid. As probably one molecule of butyric-acid is formed out of two molecules of lactic-acid, the pH will rise slowly in the course of this process. After some time also putrefaction is observed. Table 2 shows this rise of pH and butyric-acid-concentration, together with the decrease of the lactic-acid-content. The curves A, B and C of fig. 1 show the changes of pH with time of good silages, the curves D and E those of silages of bad quality.

These and other investigations were made with glass jars in which grass was ensiled with water or other liquid additions. The surface of this mixture was covered with paraffin-oil to prevent the access of oxygen.

From the foregoing we conclude that there is a stable and an instable pH-range. In a silage, which was not brought into the stable pH-region, the pH will rise to values of 5 till 5,5. The pH-value of a stable silage must be less than about 4,2, which is just the pH, we found to be the limiting pH for the activity of butyric-acid-bacteria (List of literature, 2).

The stable pH-region can be reached by adding inorganic acids, but lactic-acid too (table 4 and 5, fig. 2). The necessary quantity of lactic-acid can be produced by lactic-acid-bacteria, which are always present on the fresh fodder. The possibility of sufficient acidification depends on the composition of the fodder to be ensiled and especially on the concentration of sugar and buffer-substances. The quality of the obtained silages showed, that this composition varies widely from field to field (table 6) but on the same field also from day to day. (Table 7).

When it is necessary to improve the quality of a silage by addition of certain substances to the fodder during the filling of the silo, those substances should be chosen, which in the first place cause an increased acidity (inorganic acids, sugar). Added substances ought to be mixed thoroughly with the fodder in order to get a homogenous silage. In an inhomogenous silage with layers or spots, not containing the added substance, these spots behave as a silage of insufficient acidity, from which the neutralising action of the butyric-acid-fermentation may spread through the whole silage. We already mentioned this in a previous paper (2) but is it of extraordinary importance especially with silages, containing only lactic-acid.

If we ask to which factors an improvement of the silage-quality, caused by the addition of acid whey, is due, we may think of a favourable effect of the increase of moisture content, the addition of an acid substance, addition of sugar (lactose) and the inoculation with lactic-acid-bacteria of the whey.

As regards the importance of each of these factors, we can say:

1°. *Increase of moisture-content.*

When water or a watery liquid is added to the fodder, the air is driven out more rapidly. Consequently the action of aerobic bacteria, attacking sugar without formation of lactic-acid, is limited and more lactic-acid can be produced. The improvement, brought about by this factor alone, depends on the quantity of liquid used, and often is insufficient, as the quantity of produced lactic-acid may still be too small.

2°. *Addition of an acid substance.*

It might be expected that the fodder would die sooner and be pressed together more rapidly when acid is added. The quantity of acid in acid whey however is so small that this factor has no importance whatever (Table 9).

3°. *Sugar-content of the whey.*

As sugar is the source of the lactic-acid this factor may be of great importance. Indeed table 10 and 11 show an increase of lactic-acid-concentration and a lower pH as an effect of the addition of sugar. Lactose as well as dextrose and saccharose can be used. The quantity of added sugar is of great importance too (table 12). The improvement was also observed with experiments in which pasteurised whey was added (table 13). The whey was pasteurised to kill the lactic-acid-bacteria of the whey to be able to study the effect of the sugar of the whey only.

4°. *Inoculation with lactic-acid-bacteria.*

In general the inoculation with lactic-acid-bacteria is favourable to accelerate a lactic-acid-fermentation and it suppresses other bacterial fermentations. When using acid whey the fodder is inoculated with a large number of dairy streptococci. In a silage however these cocci are of little importance, because they produce small quantities of acid (table 15) and the grass-juice does not suit them as a nutritive medium. The high acidity in silages can only be reached by the action of lactobacilli, which produce much more acid than cocci (table 15). Acid whey also contains lactobacilli (table 17) (*Streptobacterium casei*), however only in small numbers. Consequently their action cannot be effectful among the lactobacilli of the grass itself. Experiments, in which silages with whey were made with and without dairy-lactic-acid-bacteria (*Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* and *Streptobacterium casei*) showed no difference in acid-development (table 19).

The favourable effect of whey and skimmilk in a silage is caused by the lactose, from which lactic-acid is produced, and its moisture, which makes the silage homogenous. The bacteria of the acid whey are of no importance. A good effect of the addition of whey cannot be expected in all cases for, even when as much as 20 % of whey is used, the increase of the sugar-content of the fodder is only about 1 %, which may be insufficient. The experiments show that a good effect can be obtained with cane-sugar, but that, with regard to the danger of inhomogeneity, a sugar-solution should be preferred to dry sugar.

The lactic-acid-fermentation in a silage, to which no whey has been added, must be ascribed to other bacteria than the lactic-acid-fermentation of milk

or whey. We distinguish streptococci and bacilli, which we shall call: grass cocci and grassrods, dairy cocci and dairy rods. In the group of grasscocci as well as in the group of grassrods there are species which produce much acid and species which form only small quantities of acid. The vigorously-fermenting rods produce a larger quantity of acid than the vigorously-fermenting cocci. In studying the bacterial flora of a silage without whey-addition we found during the first period of fermentation vigorous grasscocci; in the second period these had died and the souring was completed by the vigorous grassrods (*Streptobacterium plantarum*). This development of the flora is due to the fact that the rods develop more slowly but produce more acid than the cocci.

In silages with insufficient acid-production the second period was characterised by the presence of grassrods of a less good acid-production.

In old silages the vigorously acidifying grassrods have disappeared too. Old silages of good quality only contain a small number of lactic-acid-bacteria and in old silage of less good quality many grasscocci of a low acid-production are found. Grassrods of low acid-production may be found in all silages, but are especially numerous in the first fermentation-days.

When a large quantity of whey has been added to the ensiled fodder, the silage practically contains only dairy streptococci in the first period. They sour to a certain extent instead of the grasscocci, but an increase of the velocity of acid-production could not be observed. When the fodder was inoculated with a large quantity of a whey-culture of dairy-rods (*Streptobacterium casei*) these bacteria could be detected in all periods of the souring-process, but generally the vigorously-fermenting grassrods also were present in the second period. Thus the bacteriological examination also reveals the little value of the dairy-lactic-acid-bacteria for silage-purposes. They form some acid, but when they are added with the whey to a fodder, the souring is not better than with whey without these bacteria.

In chapter 7 the attention is drawn to some rare cases, in which no butyric-acid-formation was observed, though the acidity was so low that it certainly could be expected. In these silages (also ensiled in glass-jars) an abnormal great quantity of acetic-acid had been produced. From the analyses it could not be derived with certainty whether this excess of acetic-acid was the result of the decomposition of lactic-acid. As this phenomenon is very rarely observed an explanation of this cannot be given.