

BIOLOOGILISE LISANDI MÕJU PUNASE RISTIKU-TIMUTI SILO FERMENTATSIOONILE JA TOITEVÄÄRTUSELE

H. Kaldmäe¹, A. Olt¹, M. Ots¹, O. Kärt¹, E. Songisepp²

¹ Eesti Maaülikool, ² Tervisliku Piima Biotehnoloogiarenduskeskus

Sissejuhatus

Viimastel aastatel on Euroopas püsinud huvi liblikõieliste kasvatamise ja nendest silo tootmise ning piimakarjale söötmise vastu. Liblikõielised heintaimed on aga raskesti sileeruvad oma kõrge puhverduvõime, vähese kuivaine- ja suhkruisalduse tõttu (McDonald *et al.*, 1991). Kuid teiselt poolt, arvestades liblikõieliste kuivaine saaki ja kasvatamisele tehtavaid kulutusi, on nad kõrrelistest odavamad kultuurid. Seda näitasid nelja riigi teadlaste uurimused. Kõige odavam silo saadi punasest ristikust. Madalaks osutus ka liblikõieliste-kõrreliste segust silo omahind (Doyle, Topp, 2002).

Silo kvaliteet ei sõltu ainult heintaimede keemilisest koostisest ja silotootmise korraldamisest, vaid ka fermentatsioonist, eriti piimhappebakterite tegevusest. Kuid piimhappebakterite tegevus mitmetel põhjustel varieerub, olenedes tüvede spetsiifilistest omadustest. Et sileerimisel kasutada suunatud piimhappelise käärimise, lisatakse silomaterjalile väljavalitud starterbaktereid sisaldavat juuretist. Teatud mikrobioloogiline lisand sobivates tingimustes parandab rohu sileeruvust ja lõpuks suurendab loomade produktiivsust (Harman *et al.*, 1999; Jatkauskas *et al.*, 2002). Juuretiste kasutamisel on vähenenud ka silo kaod ja paranenud toiteväärtus (Ruser, Rutherford, 1999; Muck, Shinnars, 2001).

Uurimistöö eesmärgiks oli välja selgitada sobivaim bioloogiline juuretis punase ristiku-timuti segu sileerimiseks. Selgitati silo fermentatsioonil tekkivaid kuivaine kadusid, orgaanilise aine seeduvust ja fermentatsiooni kvaliteeti.

Võtmesõnad: bioloogiline lisand, silo, punane ristik, fermentatsiooni kvaliteet.

Materjal ja meetodika

Uurimiseks kasutati punase ristiku (*Trifolium pratense* L. sort 'Jõgeva 433') ja timuti (*Phleum pratense* L. sort 'Tika') segu (1:1). Materjal hekseldati 2 cm pikkusteks tükikesteks, segati ja valmistati katsesilod kolmeliitrilistesse purkidesse kolmes korduses. Silo kindlustuslisanditeks kasutati keemilist konservanti AIV 2000 ja nelja erinevat bioloogilist juuretist, mis olid kombineeritud kolmest erinevast *Lactobacillus sp.* tüvest järgmiselt:

J-1 – *L. plantarum* MTD/1

J-2 – *L. plantarum* MTD/1 + *L. fermentum* KOK5

J-3 – *L. plantarum* 68-4 + *L. fermentum* KOK5

J-4 – *L. plantarum* 68-4

Nii keemilist kui bioloogilist lisandit arvestati 5 liitrit tonni materjali kohta. Piimhappebakterite kontsentratsioon bioloogilises lisandis oli 8×10^9 cfu/g.

Katsesilodega pargid avati 90 päeva möödudes ning analüüsiti.

Kuivaine kadude leidmiseks määrati kuivaine kontsentratsioon enne ja pärast sileerimist.

Lenduvate rasvhapete, etanooli-, ammoniaaklämmastikusisalduse ja pH määramiseks valmistati siloproovist vesilahus. Selleks kaaluti 50 g silo, millele lisati 100 ml destilleeritud vett ja 15 tunni pärast filtreeriti läbi paberfiltri.

Silo pH määrati pH-meetriga (MP 120 Mettler Toledo). Ammoniaaklämmastiku määramiseks kasutati selleks kohandatud Kjeldec Auto 1030 Tecatori analüsaatorit. Etanooli-, piimhappe- ja lenduvate rasvhapete sisaldus määrati kromatograafiliselt Perkin Elmer 900 gaaskromatograafiga, kasutades kolonni täidisega 80/120 Carbowax B-DA/4% carbowax 20 M (Faithfull, 2002).

Eelnevalt 20 tundi 60 °C juures kuivatatud ja kuni 1 mm jämeduseks jahvatatud proovidest määrati kuivaine-, toorproteiini-, toortuha-, toorrasva- ja toorkiisisaldus (AOAC, 1990). Toortuha kontsentratsioon määrati tuhastamisega muhvelahjus 550 °C juures 6 tunni vältel. Toorproteiin määrati Kjeldahli meetodiga, kasutades Kjeldec Auto 1030 analüsaatorit (FOSS Tecator, Höganäs, Sweden). Orgaanilise aine seeduvus *in vitro* (IVOMD) määrati filterkoti meetodiga, kasutades DAISY II inkubaatorit, kiuanalüsaatorit (ANKOM Technology, Fairport, NY) ja muhvelahjus tuhastamist. NDF ja ADF kontsentratsioon määrati proovidest ANKOM 200 kiuanalüsaatoriga (Van Soest *et al.*, 1991).

Fermentatsiooni koefitsient (FC) arvutati vastavalt Pahlow' ja Weissbachi (1999) järgi:

$$FC = DM [\%] + 8 \text{ WSC/BC},$$

kus summeeritakse kuivainesisaldus (DM), suhkruisaldus (WSC) ja puhverduisvõime (BC).

Vees lahustuvad süsivesikud (WSC) määrati Bertrani meetodil (Thomas, 1977) ja puhverduisvõime piimhappe tiitrimisel pH 4,0 juures.

Statistiline analüüs

Andmed analüüsiti, kasutades statistikatarkvara SAS protseduuri GLM. Töötlemisviisi ja kindlustuslisandi mõju väljaselgitamiseks kasutati ortogonaalseid kontraste. Nullilisi väärtusi sisaldavate tunnuste analüüsil kasutati väärtuste astakuid ning ülejäänud tunnused logaritmiti. Kontrastid leiti järgmisest mudelist:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + E_{ijk},$$

kus Y_{ijk} on uuritav tunnus, μ – keskmine, T_i – töötlemise viis, K_j – kindlustuslisandi mõju, ja E_{ijk} – juhuslik viga.

Tulemused ja arutelu

Sileerimiseks kasutati punase ristiku-timuti segu (1:1), mille kuivainesisaldus oli 185 g/kg. Silomaterjal sisaldas toorproteiini 147 g/kg, toortuhka 82 g/kg, toorrasva 32 g/kg, toorkiudu 201 g/kg, NDF-i 432 g/kg, ADF-i 245 g/kg, N-ta ekstraktiivaineid 537 g/kg, vees lahustuvaid süsivesikud 101 g/kg kuivaines. Materjali puhverduisvõime oli 90 g piimhapet 1 kg KA kohta ja fermentatsiooni koefitsient 27,5. Pahlow' ja Weissbachi (1999) andmetel oli närvutamata liblikõieliste keskmine FC 27, mis näitas, et neid on keeruline sileerida. Hästi sileerub materjal, mille fermentatsioonikoefitsient on üle 45 (Pahlow *et al.*, 2002). Uuritud silomaterjal tuleb lugeda raskesti sileeruvaks ning sileeruvuse parandamiseks kasutati erinevaid lisandeid.

Katsesilode keemiline koostis on toodud tabelis 1. Samast materjalist valmistatud erinevate lisanditega katsesilode kuivainesisaldus varieerus 140 g/kg ja 171 g/kg vahel. Jalalt lõigatud ristiku-timuti silo vähest kuivainesisaldust näitavad ka Hetta (1999) katseandmed, vastavalt kontrollil 126 g/kg ja bioloogilise lisandiga silol 130–166 g/kg.

Tabel 1. Bioloogilise ja keemilise lisandi mõju silo keemilisele koostisele (g/kg KA-s)

Katsesilo	Kuivaine	Toorproteiin	Toortuhk	Toorkiud	N-ta ekstraktiivaineid
Kontroll	140	153	109	274	421
J-1	169	167	90	217	476
J-2	163	173	92	213	470
J-3	171	161	86	220	481
J-4	168	162	90	224	473
AIV	162	172	91	222	471
Erinevuse olulisus, P					
Kontroll vs. J-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. AIV	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
J-1 vs. J-2	0,0121	0,0073	0,2087	0,5022	0,1063
J-1 vs. J-3	0,4819	0,0008	0,0042	0,1726	0,1322
J-1 vs. J-4	0,5541	0,0040	0,5424	0,0238	0,3331
J-1 vs. AIV	0,0027	0,0432	0,8188	0,0604	0,1316
J-2 vs. J-3	0,0022	<0,0001	0,0002	0,0477	0,0035
J-2 vs. J-4	0,0452	<0,0001	0,0682	0,0049	0,4966
J-2 vs. AIV	0,5378	0,5288	0,2996	0,0139	0,8454
J-3 vs. J-4	0,2012	0,5263	0,0179	0,3236	0,0177
J-3 vs. AIV	0,0005	<0,0001	0,0024	0,5771	0,0056
J-4 vs. AIV	0,0115	<0,0001	0,4039	0,6621	0,6263

Nii bioloogiliste kui keemiliste lisanditega silo oli suurema kuivaine-, toorproteiini- ja lämmastikuta ekstraktiivainete sisaldusega ning väiksema kiusisaldusega kui kontrollsilol ($P < 0,0001$). Oluliselt suurem toorproteiinisaldus oli bioloogilise lisandi J-2 ja AIV kasutamisel, vastavalt 173 g/kg ja 172 g/kg ($P < 0,0001$).

Silo fermentatsiooni käigus kasutavad mikroorganismid oma elutegevuseks osa orgaanilist ainet, eriti süsivesikuid, mille tõttu toimuvad muutused silo keemilises koostises (McDonald *et al.*, 1991).

Silo seeduvust, kuivaine kadusid ja fermentatsiooni iseloomustavad näitajad on toodud tabelites 2 ja 3. Kuivaine kaod olid suhteliselt suured, kontrollsilol puhul isegi 24,1%. Petterssoni (1988) andmetel ongi vähesel kuivainesisaldusega silo kuivainekaod suured, keskmiselt 19,4% (olenevalt materjalist 0,8–71,1%). Kõik kasutatud lisandid vähendasid silo fermentatsioonil tekkivaid kuivaine kadusid. Eriti väikesed kuivaine kaod olid juuretise J-3 kasutamisel, ainult 7,7%, mis on 3,1 korda vähem kui lisandita silol. Kõik starterbakterid parandasid silo fermentatsiooni, mille tõttu kuivaine kaod vähenesid. Seda märgivad punasest ristikust või selle segust bioloogilise lisandiga tehtud silo uurimise tulemustes Gallo *et al.* (2002) ja Jatkauskas, Vrotniakiene (2005).

Silo orgaanilise aine seeduvus paranes tunduvalt kindlustuslisandite kasutamisel ($P < 0,0001$). Kontrollsilol ligi 10% madalamat seeduvust võrreldes kindlustuslisanditega siloga võisid põhjustada ka riknemise tunnused (pH 5,9), mis vähendavad seeduvust (Muck, Pitt, 1993). Kuid Jatkauskase ja Vrotniakiene (2005) andmetel oli punase ristiku ja timuti segust bioloogilise konservandiga silo orgaanilise aine seeduvus 76%, lisandita aga 74,8%.

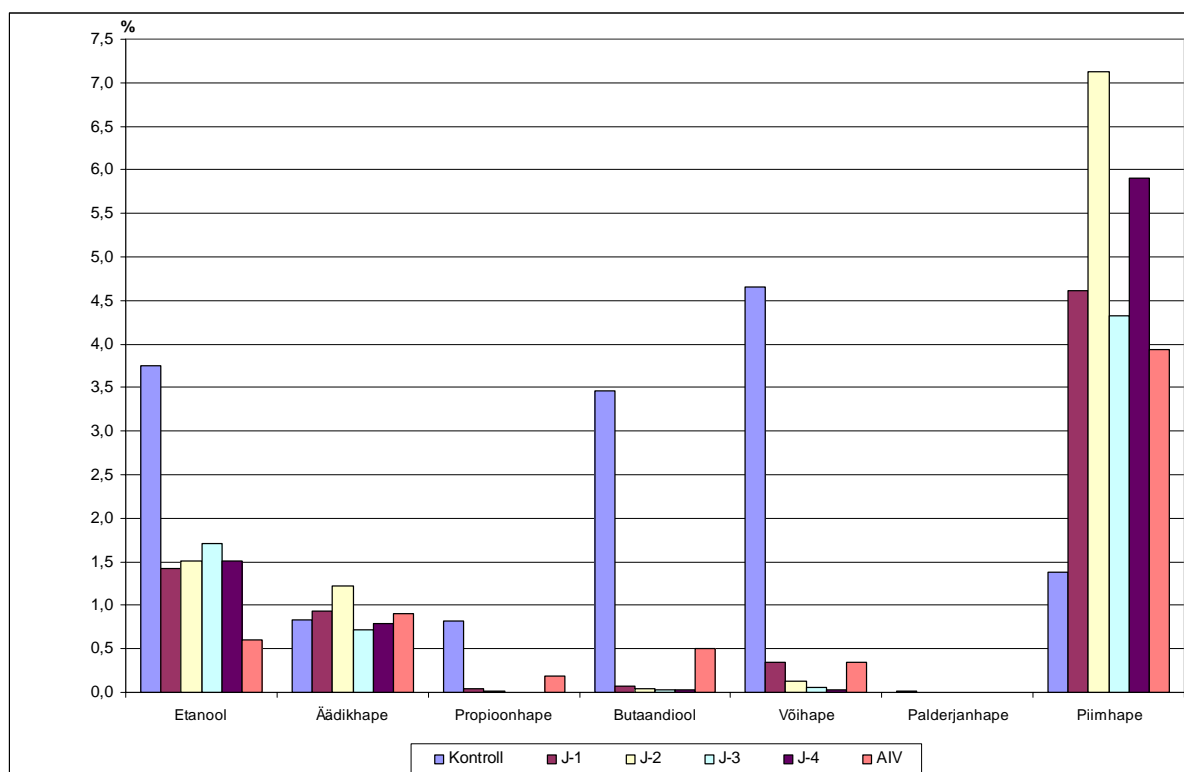
Tabel 2. Bioloogilise ja keemilise lisandi mõju silo pH-le, amoniaaklämmastikusisaldusele, kuivaine kontsentratsioonile ja OA seeduvusele

Katsesilo	pH	NH ₃ -N üld-N %	Kuivaine kaod %	OAS <i>in vitro</i> %
Kontroll	5,9	18,7	24,1	66,0
J-1	4,1	1,1	8,6	76,2
J-2	4,1	2,0	11,7	75,7
J-3	4,0	1,1	7,7	76,0
J-4	4,1	1,3	9,0	74,6
AIV	4,5	5,8	11,7	73,4
Erinevuse olulisus, P				
Kontroll vs. J-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. J-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Kontroll vs. AIV 2000	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
J-1 vs. J-2	0,4082	0,0027	0,0154	0,4983
J-1 vs. J-3	0,0161	0,6863	0,3607	0,8528
J-1 vs. J-4	1,0000	0,4934	0,7062	0,0332
J-1 vs. AIV	<0,0001	<0,0001	0,0050	0,0006
J-2 vs. J-3	0,0022	0,0010	0,0017	0,6216
J-2 vs. J-4	0,4082	0,0142	0,0355	0,1290
J-2 vs. AIV	<0,0001	<0,0001	0,6328	0,0033
J-3 vs. J-4	0,0161	0,2804	0,2015	0,0491
J-3 vs. AIV	<0,0001	<0,0001	0,0005	0,0010
J-4 vs. AIV	<0,0001	<0,0001	0,0122	0,1047

Analüüsidest fermentatsiooni kvaliteeti iseloomustavaid näitajaid, selgub, et materjal sileerus ilma kindlustuslisandita halvasti. Seda näitavad kõrge pH, suur võihappe- ja väike piimhappesisaldus ning suur ammoniaaklämmastiku osa üldlämmastikus (tabelid 2 ja 3). Hästi fermenteerunud ja kvaliteetse silo pH peaks olema 200 g/kg kuivaine juures 4,2 või madalam (Weissbach, 2003). Bioloogilise lisandiga silo madalama pH võrreldes keemilise lisandiga valmistatud siloga ($P < 0,0001$) põhjustas kasutatud juuretise suhteliselt suur piimhappebakterite kontsentratsioon (8×10^9 cfu/g). Ammoniaaklämmastiku osa üldlämmastikus näitab proteiini lagunemise intensiivsust. Proteolüüsi vähenemist bioloogilise (*L. plantarum*) lisandiga silodes märgivad Winters *et al.* (2002) ja Rajčáková *et al.* (2005) oma uurimustes. Nii bioloogilised lisandid kui AIV soodustasid fermentatsioonil piimhappelise käärimist ning seega suurendasid piimhappesisaldust ($P < 0,0001$ ja $P < 0,001$) ja vähendasid alkoholi-, võihappe- ja butaandioolisisaldust võrreldes kontrolliga (joonis 1). Keemiline lisand vähendas alkoholi taset silos tunduvalt rohkem kui bioloogiline ($P < 0,0001$). Bioloogilise lisandi positiivset efekti vähesel kuivainesisaldusega punase ristiku sileerimisel on näidanud mitmete teadlaste varasemad uurimustulemused (Gallo, *et al.* 2002, 2003, 2006; Speijers *et al.*, 2002; Rajčáková *et al.*, 2005), milles väidetakse, et bioloogiline lisand parandab fermentatsiooni kvaliteeti.

Tabel 3. Bioloogilise ja keemilise lisandi mõju etanooli-, piimhappe-, äädikhappe- ja võihappesisaldusele (g/kg KA-s)

Katsesilo	Etanool	Piimhape	Äädikhape	Võihape
Kontroll	37	14	8	47
J-1	14	46	9	3
J-2	15	71	12	1
J-3	17	43	7	1
J-4	15	59	8	0
AIV	6	39	9	2
Erinevuse olulisus, P				
Kontroll vs. J-1	<0,0001	<0,0001	0,4098	<0,0001
Kontroll vs. J-2	<0,0001	<0,0001	0,0034	<0,0001
Kontroll vs. J-3	<0,0001	0,0001	0,1798	<0,0001
Kontroll vs. J-4	<0,0001	<0,0001	0,6290	<0,0001
Kontroll vs. AIV	<0,0001	0,0003	0,5620	<0,0001
J-1 vs. J-2	0,5789	0,1500	0,0238	0,0109
J-1 vs. J-3	0,1640	0,9197	0,0361	<0,0001
J-1 vs. J-4	0,5713	0,2732	0,1966	<0,0001
J-1 vs. AIV	<0,0001	0,6863	0,8041	0,9435
J-2 vs. J-3	0,3912	0,1251	0,0001	0,0434
J-2 vs. J-4	0,9910	0,7177	0,0010	0,0003
J-2 vs. AIV	<0,0001	0,0701	0,0136	0,0129
J-3 vs. J-4	0,3973	0,2331	0,3811	0,0411
J-3 vs. AIV	<0,0001	0,7616	0,0605	<0,0001
J-4 vs. AIV	<0,0001	0,1390	0,2920	<0,0001

**Joonis 1.** Katsesilode etanooli-, butaandiooli-, piimhappe- ja teiste lenduvate rasvhapete sisaldus

Kokkuvõte

Punase ristiku-timuti segu on madala fermentatsiooni koefitsiendiga (27,5) ja seetõttu on vaja kvaliteetse silo saamiseks kasutada kindlustuslisandeid. Nii bioloogiline kui keemiline lisand vähendasid silo kuivaine kadusid 2,1 kuni 3,1 korda. Kõige väiksemad kuivaine kaod (7,7%) olid lisandi J-3 kasutamisel.

Bioloogilise lisandi kasutamisel piimhappebakterite kontsentratsiooniga 8×10^9 cfu/g paranes tunduvalt ristiku-timuti silo fermentatsiooni kvaliteet: pH 4,0–4,1; ammoniaaklämmastiku osa üldlämmastikus 1,1–2,0%, piimhappesisaldus 43–71 g/kg ja vöihappesisaldus 0–3 g/kg kuivaines.

Orgaanilise aine seeduvus paranes kuni 10% võrra võrreldes lisandita siloga ($P < 0,0001$).

Kõik uuritud bioloogilised lisandid parandasid vähese kuivainesisaldusega ristiku-timuti segu sileeruvust. Selle materjali sileerimisel tuleks eelistada bioloogilist lisandit J-3.

Kasutatud kirjandus

- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA, p. 68–88.
- Doyle, C. J., Topp, F. E. 2002. An economic assessment of the potential for increasing the use of forage legumes in north European livestock systems. – Legumes silages for animal production: LEGSIL. Eds. R. J. Wilkins, C. Paul. Braunschweig, Germany, p. 75–85.
- Faithfull, N. T. 2002. Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook. – CABI Publishing, UK, 266 pp.
- Gallo, M., Jambor, V., Mlynár, R., Rajčáková, L. 2002. Effect of the application of different silage preparations upon the fermentation process in red clover. – Proceedings of the XIIIth International Silage Conference, Auchincruive, Scotland, p. 110–111.
- Gallo, M., Rajčáková, L., Mlynár, R. 2003. The effect of application biological additive on fermentation quality of red clover silage. – Proceedings of the 11th International Scientific Symposium of Forage Conservation, Nitra, Slovak Republic, p. 96–97.
- Gallo, M., Rajčáková, L., Mlynár, R. 2006. Effect of application biological additives on fermentation quality of red clover silage. – Proceedings of the 12th International Scientific Symposium of Forage Conservation, Brno, Czech Republic, p. 214–216.
- Harman, E., Kleinmans, J., Riser, B., Rutherford, W. 1999. Distribution and activity of microbial inoculants applied at reduced volumes with the Pioneer Appli-Pro™ Application Systems. – Proceedings XIIth International Silage Conference. Uppsala, Sweden, p. 92–93.
- Hetta, M. 1999. Ensiling during difficult conditions of two direct cut forages, with different botanical composition. – Proceedings XIIth International Silage Conference. Uppsala, Sweden, p. 94–95.
- Jatkauskas, J., Vrotniakienė, V. 2005. Performance of lactating dairy cows fed rations with inoculated red clover-grass mixture silage. – Integrating efficient grassland farming and biodiversity. Eds. R. Lillak, R. Viiralt, A. Linke, V. Geherman. Greif printhouse, Tartu, p. 494–497.
- Jatkauskas, J., Vrotniakienė, V., Miettinen, H. 2002. Comparison of fermentation quality and nutritive value of inoculated and non-treated legume-grass silages. – Proceedings of the International Conference of Animal Nutrition, Tartu, p. 64–70.
- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. The biochemistry of Silage. Chalcombe publications, Bucks, UK. 340 pp.
- Muck, R. E., Pitt, R. E. 1993. Ensiling and its effect on crop quality. – Proceedings of National Silage Production Conference, Syracuse, New York, p. 55–66.
- Muck, R. E., Shinnors, K. Y. 2001. Conserved forage (silage and hay): progress and priorities. – Proceedings of the XIX International Congress. Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil, p. 753–762.
- Pahlow, G., Weissbach, F. 1999. New aspects of evaluation and application of silage additives. – Landbauforschung Voelkenrode SH 206, p. 141–158.
- Pahlow, G., Rammer, C., Slottner, D., Touri, M. 2002. Ensiling of legumes. – Legumes silages for animal production: LEGSIL. Eds. R. J. Wilkins, C. Paul. Braunschweig, Germany, p. 27–31.
- Pettersson, K. 1988. Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality. – Dissertation, Uppsala, 75 pp.
- Rajčáková, L., Mlynár, R., Gallo, M. 2005. The influence of the application of a biological additive on the fermentation process of red clover silage. – Silage production and utilization. – Proceedings of the XIVth International Silage Conference, July 2005, Belfast, Wageningen Academic Publishers, p. 203.
- Ruser, B., Rutherford, W. M. 1999. Silage quality is affected by lactic acid bacteria strain combinations and dosage. – Proceedings XIIth International Silage Conference. Uppsala, Sweden, p. 113–114.
- Speijers, M. H. M., Fraser, M. D., Fychan, R., Theobald, V. J., Winters, A. 2002. Evaluation of different silage additives for ensiling lucerne and red clover. – Proceedings of the XIIIth International Silage Conference, Auchincruive, Scotland, p. 112–113.

- Thomas, T. A. 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. – J. Sci. Food Agric. 28, p. 639–642.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. – J. Dairy Sci., vol. 74, p. 3583–3597.
- Weissbach, F. 2003. Theory and practice of ensuring good quality of silages from grass and legumes. – Proceedings of the 11th International Scientific Symposium of Forage Conservation, Nitra, Slovak Republic, p. 31–36.
- Winters, A., Lloyd, J., Leemans, D., Lowes, K., Merry, R. 2002. Effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* on protein degradation during ensilage of red clover. – Proceedings of the XIIIth International Silage Conference, Auchincruive, Scotland, p. 108–109.