

# Clostridien

## Einfluss auf die Gärqualität von Grassilagen

Ing. Reinhard Resch  
HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Fütterungsreferententagung, 22. September 2020





*Lactobacillus  
plantarum*

*Lactobacillus  
buchneri*

*Acetobacter*

*C. tyrobutyricum*

*Hefen*

# Clostridien

84 Clostridien-Spezies (Cato et al. 1986)

**davon 8 Spezies in Silagen**

# Wissenswertes über Clostridien

- **Eigenschaften der Clostridien**

- grampositive, stäbchenförmige Bakterien
- wachsen mehr oder weniger streng anaerob (unter Sauerstoffabschluss)
- betreiben fermentativen Energiestoffwechsel
- können hitzefeste Endosporen bilden
- mit Ausnahme von *C. perfringens* mit Hilfe einer Geißel beweglich
- kommen überall (ubiquitär) vor - in Böden und im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren.

- **Proteolytische Clostridien**

Spaltung von Eiweißen und/oder paarweise Umsetzung von Aminosäuren

- **Saccharolytische Clostridien**

Vergärung von Kohlenhydraten (Zucker, Zellulose, Stärke)

- **Hauptgärungsprodukte** sind Buttersäure, Aceton und Butanol, manche Spezies produzieren auch gefährliche Toxine (Botulinum → Botulismus, Tetanustoxin → Wundstarrkrampf, Lecithinase → Gasbrand, u.a.)

- **Sporen**

werden bei ungünstigen Lebensbedingungen ausgebildet und sind als Dauerform bis etwa 130° C überlebensfähig

# Lebensgrundlage von Mikroorganismen

(nach Thöni 1988)

Mikroorganismen	Sauerstoffbedarf			pH Wert					Temperaturoptimum			
	ja	fakul- tativ	nein	pH 3	4	5	6	7	10	20	30	40 °C
Milchsäurebakterien			○		—					—	—	
<b>Buttersäurebakterien</b>			○			—						—
Essigsäurebildner		○				—	—				—	
Hefen		○		—	—						—	—
Fäulnisbakterien	○						—	—			—	—
Schimmelpilze	○			—	—	—	—	—			—	—

# Clostridien in Silagen und Wirtschaftsdünger

Table 2–8. Species of *Clostridium* isolated from silage (S) and manure (M) environments.

Reference:	1†	1	2	2	3	4
Environment:	S	M	S	M	S	S
<i>C. sporogenes</i>	8‡	46	5	23	+	+
<i>C. tyrobutyricum</i>	4	3	47	25	+	+
<i>C. butyricum</i>	4	2	8	6	+	+
<i>C. bifermentans</i>	7	5	7			+
<i>C. acetobutyricum</i>	9					
<i>C. perfringens</i>		1			+	
<i>C. scatologenes</i>					+	
<i>C. paraputrificum</i>			5	2		+
Other <i>C. species</i>	3	2			+	
Total	26	68	72	56		

† 1. Ali-Yrkkö et al. (1978), 2. Bühler (1985), 3. Rosenberger (1956), 4. Kutzner (1963).

‡ Number of isolates.

Quelle:

Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Elferink, S. und Spoelstra, S.F. (2003): Microbiology of ensiling: Silage Science and technology, Agronomy 42, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 31-94.

# Charakteristik von Clostridien in Silagen

Characteristic	Proteolytic group†	<i>C. butyricum</i> group	<i>C. tyrobutyricum</i>
Substrates fermented:			
Carbohydrates	+	+	+
Proteins	+	-	-
Monosaccharides	variable	many	few
Lactate	weak	-	+
pH range‡	>5	>4.5	>4.2
Fermentation products:§			
Butyric acid	+	+	+
Acetic acid	+	+	+¶
Ethanol	+	-	-
BCFA#	+	-	-
NH <sub>3</sub>	+	-	-
Amines	+	-	-

† Refers to clostridia in silage that combine proteolytic and saccharolytic properties, including *C. sporogenes*, *C. sphenoides*, and *C. bifermentans*. *Clostridium sporogenes*, the predominant species of this group in silage, can ferment only a limited number of sugars.

‡ Minimum pH allowing growth. Lower  $a_w$  (Wieringa, 1958) and elevated levels of fermentation acids (Jonsson & Lindgren, 1989) increase the minimum pH allowing growth.

§ Holdeman et al. (1977).

¶ Requires acetic acid; dependent on culture conditions a net production occurs.

# BCFA, branched chain fatty acids: isobutyric, isovaleric acids.

Quelle:

Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Elferink, S. und Spoelstra, S.F. (2003): Microbiology of ensiling: Silage Science and technology, Agronomy 42, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 31-94.

# Clostridien als Ursache für Enterotoxämien

(Wagner 2016)

- **Erreger**
  - *C. perfringens* (Gasbranderreger; Typen A-D mit 12 Toxinen)
    - Typ A zerstört Darmepithelmembranen (Durchfall)
    - Typ C führt zu nekrotischer Darmentzündung (Kälber, Schafe, Ziegen)
    - Typ D löst Breinierenerkrankung aus (Schafe/Ziegen)
  - *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*
- **Krankheitsbild**
  - Milchkuh – plötzlicher Rückgang von Futteraufnahme und der Milchleistung; Kolik; kein Kotabsetzen; Festliegen; schnelle Verschlechterung Allgemeinzustand → Tod
  - Kalb – wird meist tot aufgefunden; selten Koliken bzw. blutige Durchfälle; Festliegen, tiefliegende Augen
- **Sektion**
  - Darm mit Entzündungen, Blutungen, veränderte Schleimhäute, Gasansammlungen
- **Behandlungen** mit Infusionen bzw. Antibiotika kommen meist zu spät

# Clostridien als Ursache für Botulismus

## Ursachen



Fehlgärung  
XP hoch → Typ B  
pH > 4,5  
Hühnermist



Tierkadaver → Typ C

*Clostridium botulinum* bildet extrem starke Botulinumtoxine.  
9 verschiedene Toxintypen werden unterschieden  
30 pg Botulinumtoxin/kg = Letaldosis für Menschen  
400 g reines Botulinumtoxin tötet Weltbevölkerung



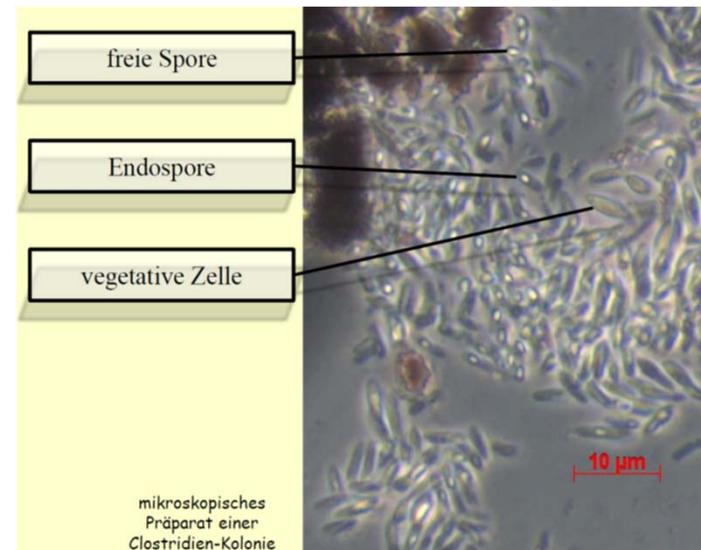
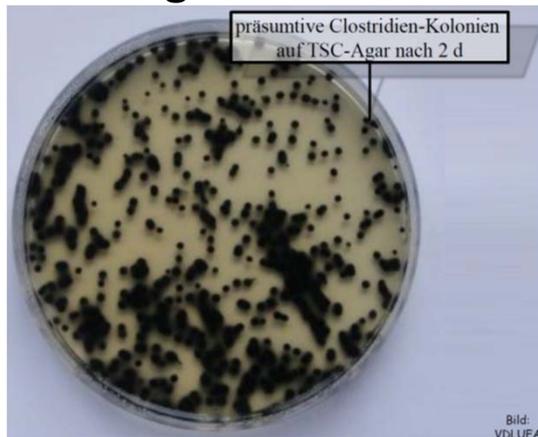
Bei Rindern hauptsächlich Vergiftung durch Typ B  
Krankheitsverlauf von akut bis chronisch (Morbus Kerner, Clostridiose)

# Nachweis von Clostridien

- **Plattengußverfahren mit TSC-Agar (VDLUFA MB III 28.3.2)**

- Anaerobe Bebrütung für 2 Tage bei 37°C
- Ohne Antibiotikum Cycloserin
  - Streng anaerobe Flora (Bazillen, Clostridien, Milchsäurebakterien)
- **Mit Cycloserin (LK-Silageprojekt 2020)**
  - Präsumtive Keimzahl an Clostridien und geringem Anteil an Begleitflora
  - Vegetative Clostridien und Clostridien sporen der Spezies *C. sporogenes*, *C. perfringens*
- Mit Cycloserin + Hochtemperaturbehandlung (ca. 100 °C)
  - Nur Clostridien sporen von *C. sporogenes* bzw. *C. perfringens*, **keine Buttersäurebildner!**

- **Zählung schwarzer Kolonien**



# Nachweis von Clostridien

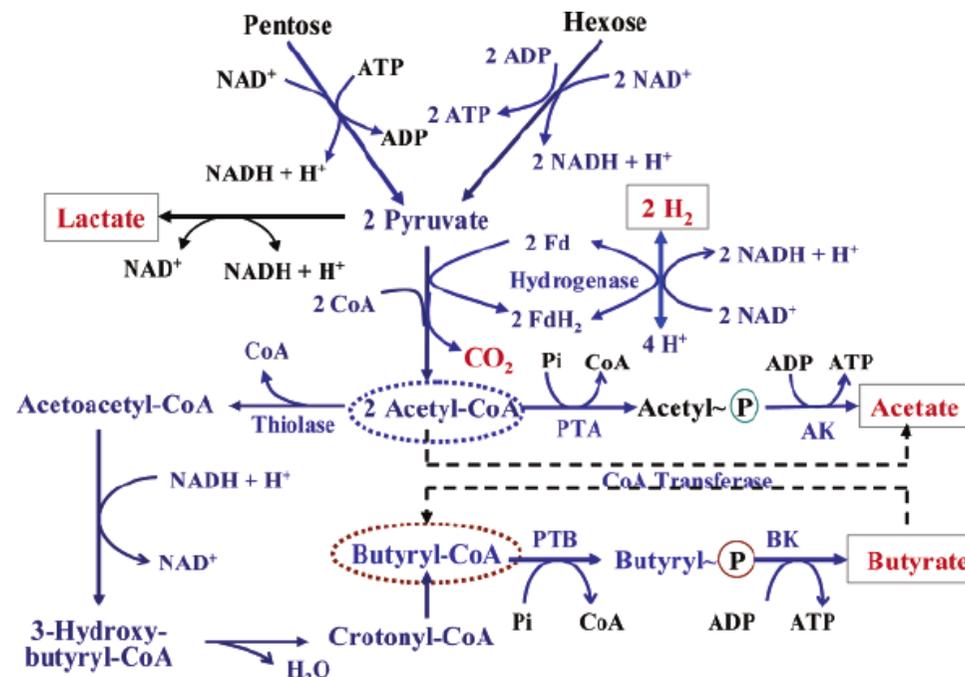
- **Artdifferenzierung durch biochemischen Ansatz (bunte Reihe)**
  - Anaerobe Bebrütung für 1-2 Tage bei 37°C



- **DNA-Sequenzierung und Datenbankabgleich**
- **Spezifische PCR-Analyse für einzelne Arten**
  - Keine Unterscheidung zwischen vegetativen (lebenden) und Dauerformen (Sporen)
  - **Mit dieser Methode können auch die Buttersäurebildner *C. butyricum* und *C. tyrobutyricum* erfasst werden!**

# Stoffwechselweg von *Clostridium tyrobutyricum*

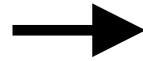
2 Mol Milchsäure → 1 Mol Buttersäure + 2H<sub>2</sub> + 2CO<sub>2</sub>



Quelle:

Liu, M., Zhu, Y., Shang-Tian, Y. (2006). Construction and Characterization of a Deleted Mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for Enhanced Butyric Acid and Hydrogen Production. *Biotechnology progress*. 22. 1265-75. 10.1021/bp060082g.

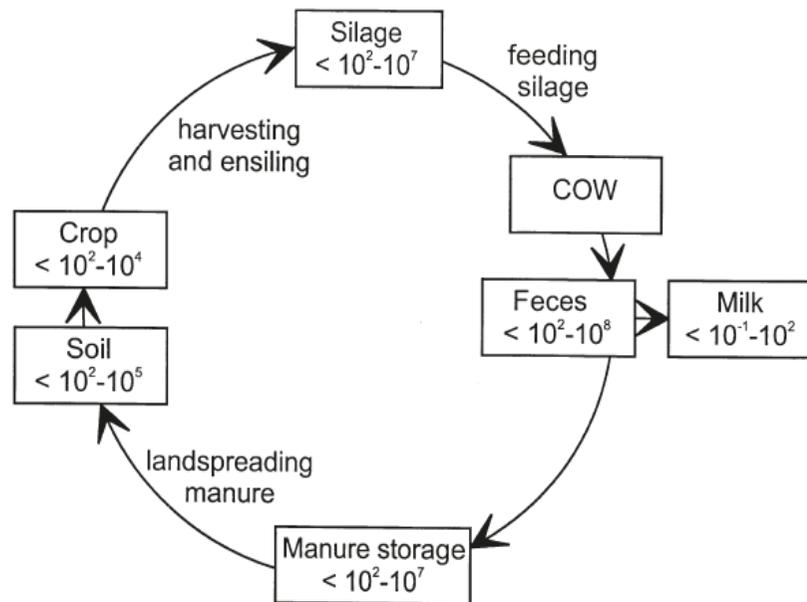
# Einfluß von Clostridien auf die Qualität von Hartkäse



- *Clostridium tyrobutyricum* führt bei Emmentaler und Bergkäse zu Spätblähungen. Der Käse wird dadurch qualitativ stark geschädigt bis zerstört und ist in Folge nur mehr als Schmelzkäse verwertbar.
- In den Produktionsgebieten von Hartkäse wird den Betrieben deswegen vielfach die Fütterung von Silage untersagt. Früher Silagesperrgebiete, heute ÖPUL-Maßnahme Silageverzicht.

# Clostridien im landwirtschaftlichen Kreislauf

## The Spore Cycle



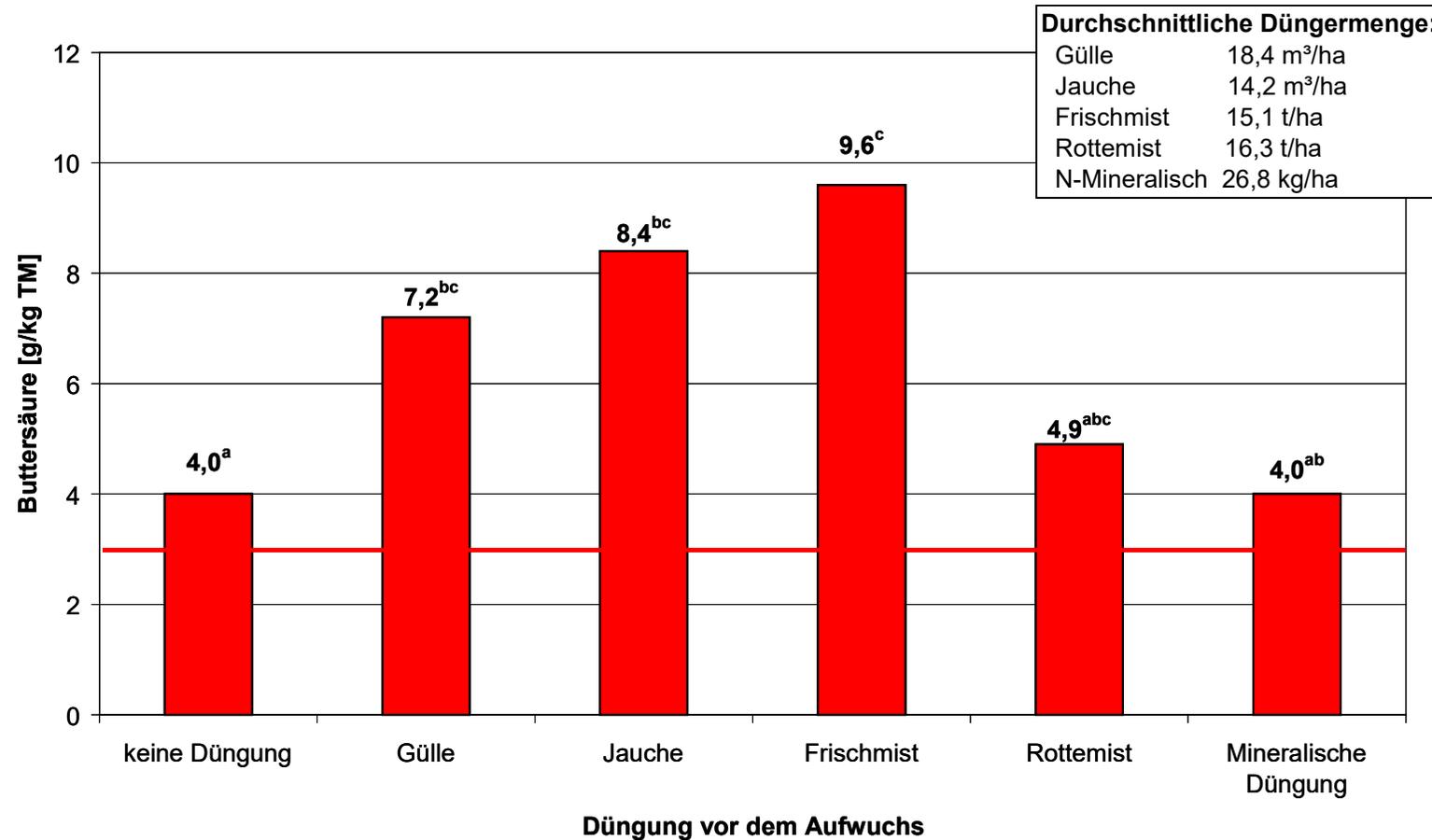
Quelle:  
 Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Elferink, S. und Spoelstra, S.F. (2003): Microbiology of ensiling: Silage Science and technology, Agronomy 42, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 31-94.



Quelle:  
 Buchgraber, K., Gindl, G. (2004): Zeitgemäße Grünlandbewirtschaftung. Stocker Verlag, 192 S.

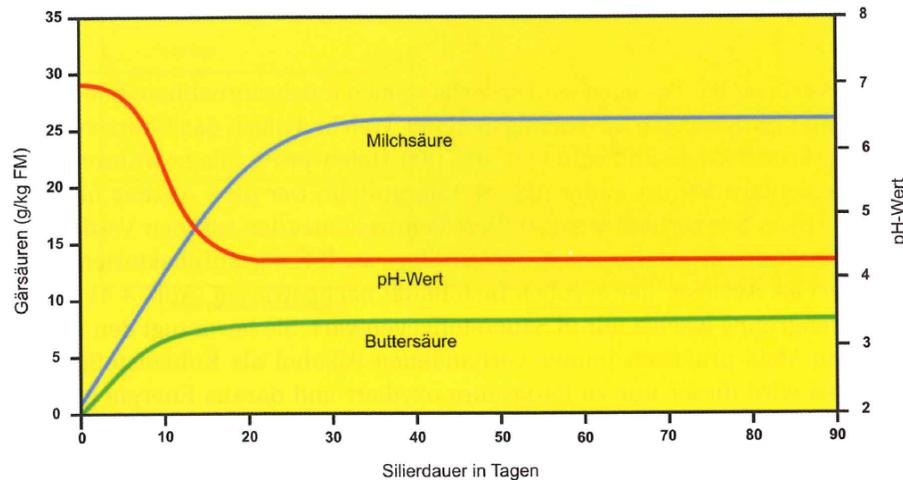
# Zusammenhang Buttersäure und Düngung

## (LK-Silageprojekt 2009)



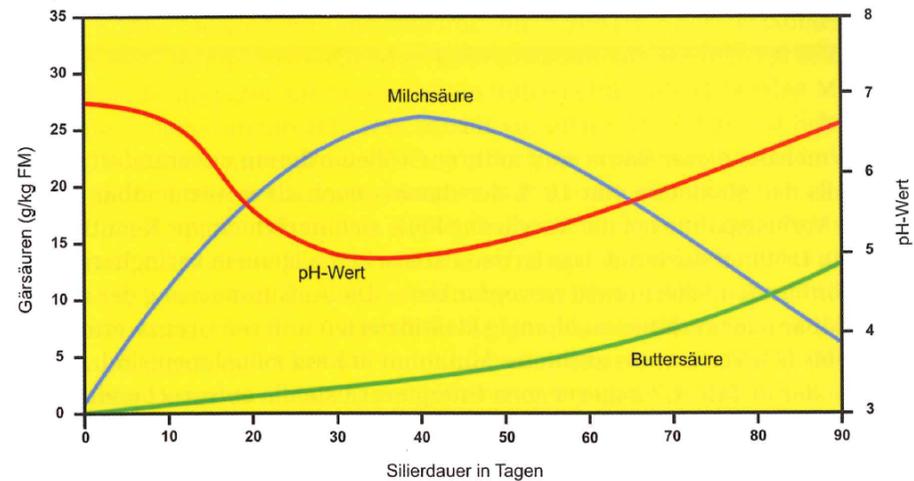
# Fehlgärungen mit Buttersäurebildung

(DLG-Praxisbuch Futter u. Substratkonservierung, 8. Auflage 2011)



Buttersäuregärung  
in nitratarmen Anwelksilagen  
Dauerwiesenfutter in Österreich

Buttersäuregärung  
in zucker- und TM-armen  
(nassen) Silagen  
Effekt des „Umkippens“

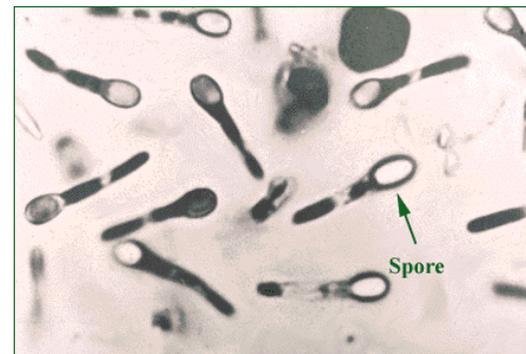
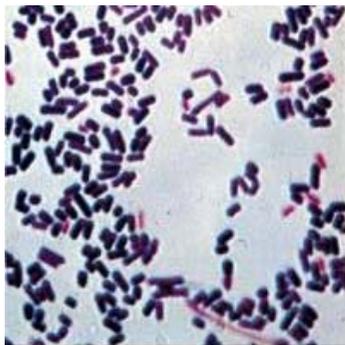


# Buttersäuregehalt und Clostridiensporen in der Grassilage bei unterschiedlichen Anwelkgraden

(Silageprojekt Steirisches Ennstal 1988-1990)

Anwelkgrad	Buttersäure je g/kg TM	Clostridien <sup>1)</sup> je g FM	N
Naß- bis leichte Anwelksilage < 28 % TM	29,1	132.000	31
Anwelksilage 30 – 40 % TM	19,4	66.000	92
Gärheu > 40 (50 – 60) % TM	10,6	30.000	54

1) Die mikrobiologische Untersuchung wurde von Dr. Adler, AGES in Linz, durchgeführt.



# Einfluß des Schnittzeitpunktes auf den Clostridiengehalt in Grassilagen

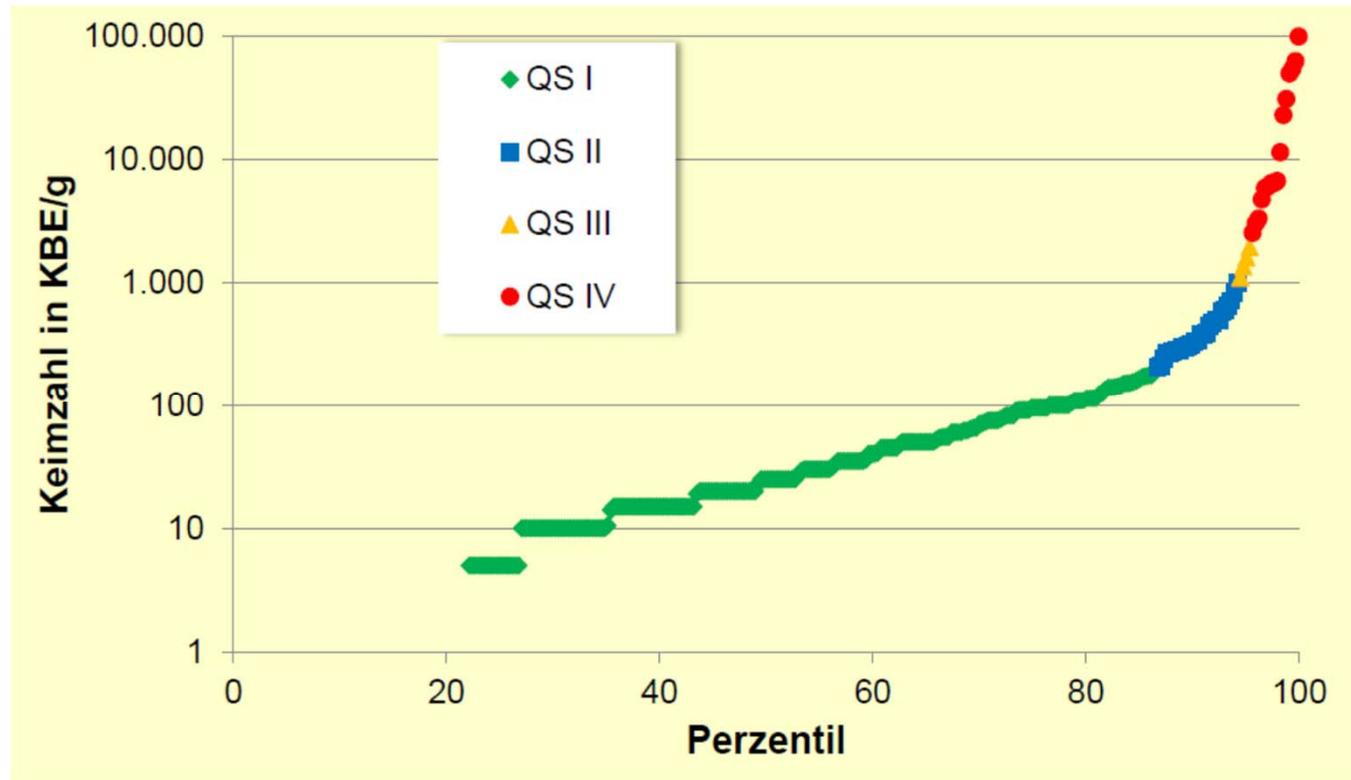
(Silageprojekt Steirisches Ennstal 1988-1990)

Schnittzeitpunkt	Rohfasergehalt in g/kg TM	Buttersäuregehalt in g/kg TM	Clostridien <sup>1)</sup> in g FM	N
früh	218	11,6	6.000	26
rechtzeitig	254	15,5	60.000	53
etwas zu spät	286	20,7	75.000	68
zu spät	310	23,7	90.000	25
überständig	344	31,7	270.000	4

<sup>1)</sup> Die mikrobiologische Untersuchung wurde von Dr. Adler, AGES in Linz, durchgeführt.

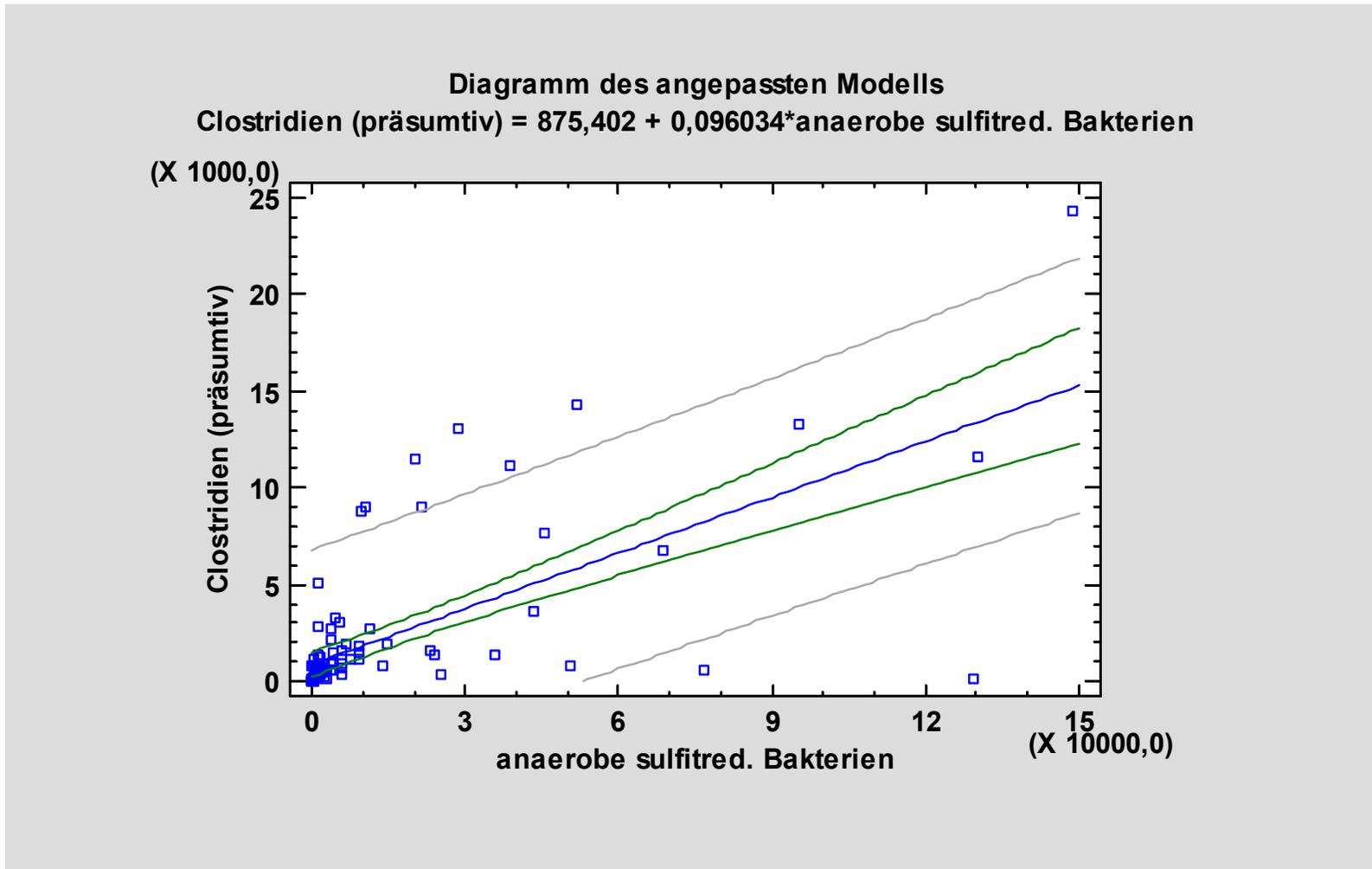
# Clostridien in Grassilagen

(Wagner 2016; n = 347)



- Datensammlung VDLUFA 2010-2016
- Keimzahlen von n.n. bis 100.000 KBE/g FM
- Vorläufiger Orientierungswert 200 KBE/g (präsumtive Clostridien in GS)

# Clostridien-Keimzahlen im LK-Silageprojekt

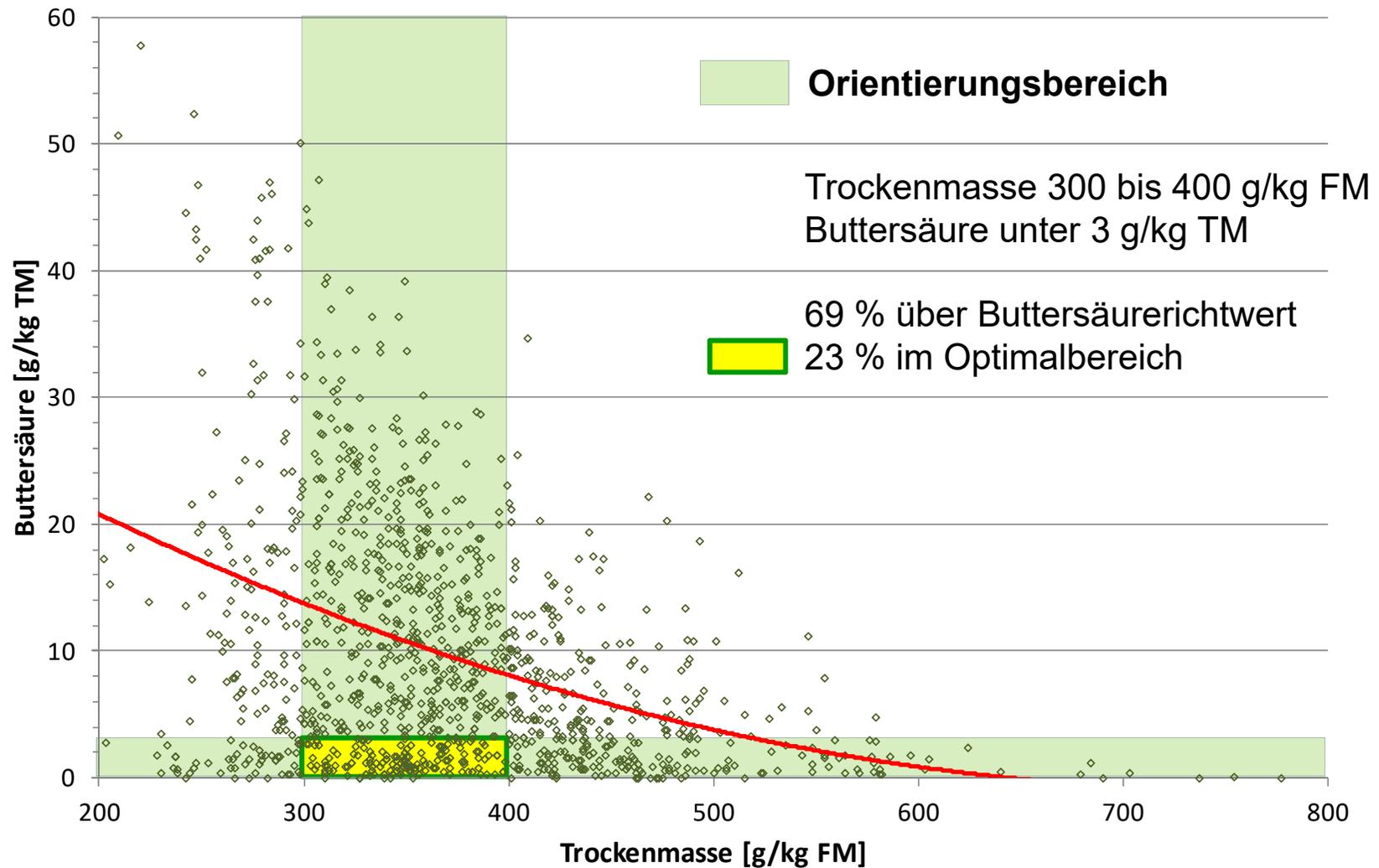




# Qualitätssilage IST-Situation

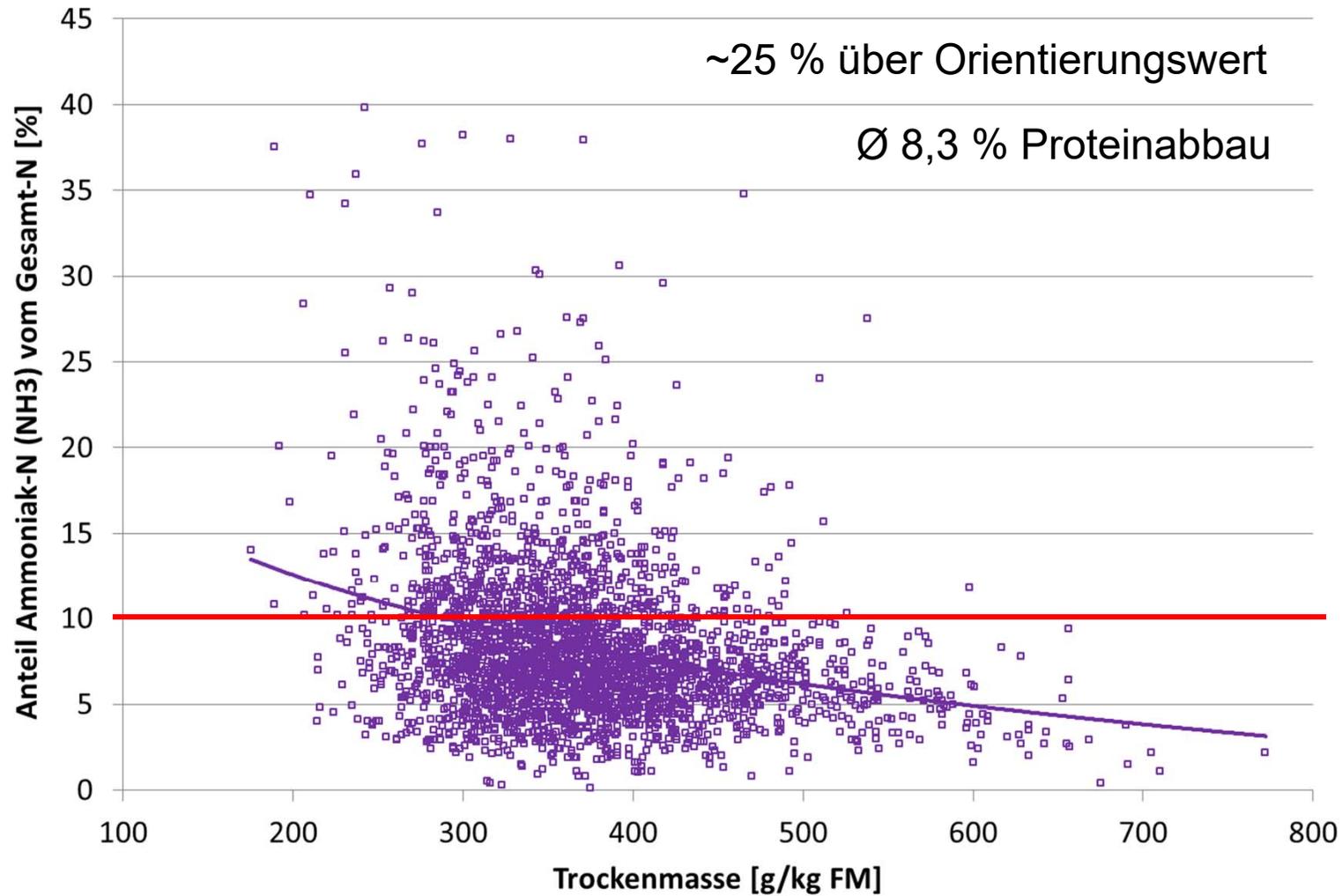
# Buttersäure in österreichischen Grassilagen

(Daten: LK-Silageprojekt 2016)



# Proteinabbau in Grassilagen

(Daten: LK-Silageprojekt 2003/05/07/09)



# Effekt von Erdverschmutzung auf Inhaltsstoffe und Buttersäure im Futter

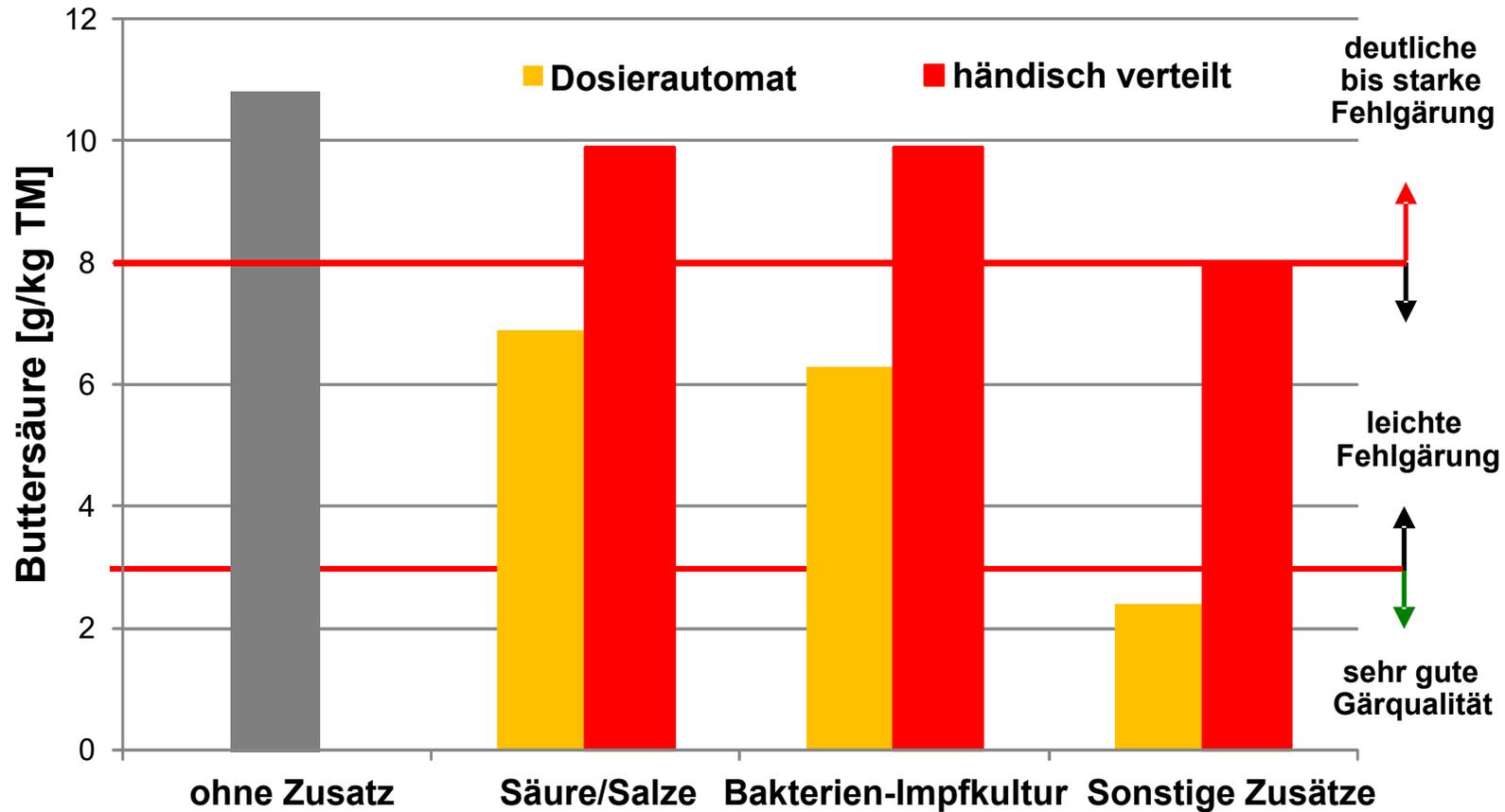
(Daten: MaB 6/21, 1997-2001)

Verschmutzungsanzeiger			Futterinhaltsstoffe			Energie	Gärung	
Rohasche	Sand	Eisen (Fe)	Organische Masse	Rohprotein	Rohfaser	Rohfett	NEL	Buttersäure
[g/kg TM]	[g/kg TM]	[mg/kg TM]		[g/kg TM]			[MJ/kg TM]	[g/kg TM]
90	13	400	910	160	248	31	6,17	7,1
110	17	700	890	156	244	30	6,00	7,8
140	27	1300	860	151	235	29	5,73	9,2
180	45	2500	820	144	227	28	5,36	12,0
220	69	4100	780	137	219	27	5,00	15,8

**Erde im Futter ist ein Qualitäts- und Energieräuber**

# Einfluss der Siliermittelanwendung auf den Buttersäuregehalt in Grassilage

(Daten: LK-Silageprojekt 2016)



14 % wendeten Siliermittel an, davon 79 % mit Dosierer



# DLG-Gütezeichen von Silierhilfsmitteln

## Einteilung nach Wirkungsrichtungen

(DLG, Stand 10. August 2020, 53 Produkte)

- **Gruppe 1: Mittel zur Verbesserung des Gärverlaufes**
  - a – schwer silierbares Futter (6 Produkte)
  - b – mittelschwer silierbares Futter TM < 35 % (24 Produkte)
  - c – mittelschwer silierbares Futter TM > 35 % (12 Produkte)
- **Gruppe 2: Mittel zur Verbesserung der aeroben Stabilität**  
Anwelkgut > 35 % TM, Silomais oder GPS (29 Produkte)
- **Gruppe 4: Mittel zur Verbesserung von Futterwert und Leistung**
  - a – Verbesserung der Futterraufnahme (15 Produkte)
  - b – Verbesserung der Verdaulichkeit (18 Produkte)
  - c – Verbesserung der Leistung beim Rind (16 Milch; 5 Mast)
- **Gruppe 5: Verhinderung der Vermehrung von Clostridien**  
4 Produkte, davon 3 mit chemischen Verbindungen und 1 mit Milchsäurebakterien

# Zusammenfassung und Ausblick



# Empfehlungen zur Reduktion von Clostridien

- **Unterbrechung des Clostridienkreislaufes**
  - Pflanzenbestand mit bester Narbendichte fördern (Nach-/Übersaat)
  - Standortangepasste Düngung (Dünge-VO), Nutzung und Pflege
    - Kein Hühnermist
    - Flüssigdünger verdünnen, Stallmiste nicht frisch sondern gut verrottet ausbringen
    - Dünger im Frühjahr nicht zu spät geben (Höhe Pflanzenbestand < 10 cm)
    - Möglichst rasch nach der Futterernte düngen
  - Wühlmausbekämpfung
  - Vermeidung Futterschmutzung
    - Geräteeinstellung optimieren (Mähhöhe > 5 cm)
    - Boden sollte bei der Mahd noch leicht feucht und nicht staubtrocken sein
- **Ernte-/Siliertechnik optimieren**
  - Mähaufbereiter verwenden
  - Wildschonende Mahdtechnik (von innen nach außen)
  - Anwelkung auf 30 bis 40 % TM (Siloballen bis 50 %)
  - Erntegut häckseln oder kurz schneiden (< 5 cm)
  - Erwärmung des Ernteguts durch rasches Arbeiten vermeiden
- **Silierhilfsmittel gezielt einsetzen**
  - Produkte mit Wirkung gegenüber Clostridien einsetzen
  - Richtige Verteilung und Dosierung über Dosierautomaten gewährleisten
- **Qualitätskontrolle** (Beobachtung und Analyse)

# Ausblick zum Thema Clostridien

- **LK-Silageprojekt 2020**
  - Praxisuntersuchungen von Grassilagen auf Clostridien
  - Datenauswertung
    - Managementeffekte (Wirtschaftsdünger, Futterschmutzung, ...)
    - Zusammenhang mit Parametern der Silagequalität
  - Fachveranstaltung am 6. März 2021 in Ried/Innkreis
    - Diskussion
  - Evaluierung der bisherigen Empfehlungen
    - Wirtschaftsdüngermanagement
    - Futtermittelkonservierung
- **Informationstransfer in die Praxis**
  - Fachartikel
  - Beratung
  - Lehre (Ausbildung Facharbeiter, Meister, ...)

# Danke für die Aufmerksamkeit!



Ing. Reinhard Resch  
HBLFA Raumberg-Gumpenstein  
Referat Futterkonservierung und Futterbewertung  
+43 (0)3682 22451-320  
[reinhard.resch@raumberg-gumpenstein.at](mailto:reinhard.resch@raumberg-gumpenstein.at)