

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven markerer avslutningen på min tid som fulltidsstudent. Siden jeg aldri fikk rista av meg hesteinteressen tok jeg først valget om å studere hestefag i England.

Hesteinteressen er imidlertid del av en større interesse for dyr og miljø, og jeg startet derfor på disse to årene med husdyrvitenskap ved Universitet for Miljø- og Biovitenskap. Her har jeg hatt en helt super tid, med nye venner og mye moro!

Da muligheten bød seg for å være med på et grovfôrrelatert hesteprojekt var dette en utrolig interessant og spennende mulighet for meg. Jeg vil derfor først og fremst rette en stor takk til Cecilia Müller og Jessica Schenck, som lot meg få ta del i og bruke data fra prosjektet deres. Videre vil jeg si tusen takk til mine veiledere, hovedveileder Åshild Taksdal Randby og medveileder Astrid Johansen, for all god hjelp både med faglig innspill og når det oppstod problemer i prosessen. Dere har alltid tatt imot meg, vært behjelpelige og uvurderlig motiverende!

Takk til Bjørg Heringstad for hjelp med statistikk, og til Hans Kristian Jensen og Espen Aas for korrekturlesning!

En ekstra takk til jentene på lesesalen, Siril og Kine-Marita, for alle de koselige stundene og lunsjpausene. Det er i grunn ikke så verst å sitte og skrive når man har to blide nordlendinger i samme rom! Takk til mamma Siren og Pappa Ole Kristian for at dere alltid er der, og en veldig spesiell takk til en sær liten dame ved navn Dokka, for at du er den du er!☺

Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, UMB

Ås, august 2012

Ingeborg Bjørnstad Jensen

Innhold

Forord.....	1
Innhold	2
Sammendrag	4
Abstract	6
Forkortelser	8
1.0 Innledning.....	9
2.0 Litteratur.....	11
2.1 Ensilering	11
2.1.1 Faser i ensileringsprosessen	11
2.2 Hygienisk kvalitet i surfôr	14
2.2.1 Helseisiko knyttet til sopp.....	17
2.3 Mikrofloraen i gress og surfôr	20
2.3.1 Sopp.....	22
2.3.2 Mykotoksiner.....	26
2.4 Faktorer som kan påvirke soppvekst i surfôr	27
2.4.1 Plastbruk.....	27
2.4.2 Vær og klima.....	28
2.4.3 Fortørking og tørrstoffinnhold	29
2.4.4 Presseutstyr og stengelbehandling	30
2.4.5 Høstetidspunkt	31
2.4.6 Håndtering/lagring	31
3.0 Materiale og metode.....	33
3.1 Gårder, fôr og geografiske regioner	33
3.2 Prøvetaking av fôr	34
3.3 Spørreskjemaer til produsent.....	34
3.4 Analyser	35
3.4.1 Kjemiske analyser	35
3.4.2 Mikrobiologiske analyser.....	35
3.5 Databehandling og statistiske beregninger.....	35
4.0 Resultater	37
4.1 Respons på spørreskjema og inspeksjonsfunn ved prøvetaking.....	37
4.2 Tørrstoff, pH, fermenteringsprodukter og næringsverdi	40
4.3 Forekomst av soppvekst.....	41

4.4 Effekt av ulike produksjonsfaktorer på soppvekst	42
5.0 Diskusjon	46
5.1 Forekomst av soppvekst.....	46
5.2 Effekt av ulike produksjonsfaktorer på soppvekst	48
6.0 Konklusjon	52
Referanser	53
Vedlegg 1: Skjema for overflateinspeksjon (eksemplar for firkantballer)	57
Vedlegg 2: Protokoll for åpning og prøvetaking av baller	58
Vedlegg 3: Spørreskjema til produsenter av innplasta grovfôr til hest.....	60
Vedlegg 4: Arbeidsbeskrivelse kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av mugg	68

Sammendrag

Det kan være et større problem med soppvekst i surfôr som har høyere tørrstoffinnhold, slik som høyensilage, enn i våtere surfôr. Soppvekst er spesielt uønsket i hestefôr da det blant annet kan føre til alvorlige luftveisproblemer, et problem som ikke bare går utover dyrets velvære, men representerer et særskilt problem innenfor hestesport da det hindrer hestens atletiske prestasjoner. Soppfloraens sammensetning, samt hvilke produksjonsfaktorer som forårsaker soppvekst i høyensilage er et område med mangelfull kunnskap. Denne oppgaven består av to deler, en litteraturoversikt og en del med egne undersøkelser. Det overordnede målet var å undersøke temaet hygienisk kvalitet i høyensilage beregnet for hest. Mer spesifisert var målet å undersøke soppfloraen i høyensilage produsert i Norge, og å se på årsak/virkning forholdet mellom produksjonsfaktorer og utviklingen av mugg- og gjærsopp i denne typen fôr.

Det ble våren 2011 tatt ut prøver av høyensilage, hovedsakelig fra 25 norske hestestaller og/eller fôrprodusenter i Rogaland, Møre- og Romsdal, Trøndelags-fylkene, Nordland, Østfold, Akershus, Buskerud, Oppland og Hedmark. Detaljerte spørreskjemaer om produksjonsfaktorer ble utfylt for hvert sted ved intervju av produsent. Det ble gjort kjemiske og mikrobiologiske analyser av fôrprøvene og disse ble koblet sammen med informasjonen fra spørreskjemaene.

Arthrimum spp., *Penicillium roqueforti* og *Mucor circinelloides* var de soppene som forekom hyppigst i de analyserte prøvene. *Penicillium roqueforti* en velkjent mykotoksinprodusent i surfôr. Det ble påvist mugg i syv av 21 prøver (33 %), mens gjær ble påvist i alle prøvene. Muggtallene var generelt lave og innenfor det som ansees som akseptert hygienisk kvalitet på norsk høyensilage, med unntak av én prøve. Gjennomsnittsverdi for alle prøvene var log 1,2 cfu/g, og log 3,5 cfu for kun de syv prøvene med påvist mugg. Gjennomsnittlig gjærtall var log 5,3 cfu/g. Fuktig og mildt kystklima kan synes å øke risikoen for framvekst av sopp, sammenligna med det tørrere og kjøligere (vinter)klima i innlandet, idet det ble påvist mugg i 80 % av prøvene fra kystklima, men i bare 13 % av prøvene fra innlandet (p-verdi=0,005). Det ble også funnet mer gjærsopp i fôr fra førsteslått enn i fôr fra andreslått, henholdsvis log 5,6 og log 4,5 cfu/g (p-verdi=0,015). Det kunne ikke påvises at andre produksjonsfaktorer hadde innvirkning på den hygieniske kvaliteten med utgangspunkt i dette materialet. Undersøkelsen er basert på et svært begrenset utvalg med prøver. Det kan ikke trekkes

endelige konklusjoner før materialet blir holdt sammen med tilsvarende, og mer omfattende undersøkelser i Sverige.

Abstract

Fungal growth can be a more frequent problem in silage of higher dry-matter content, like haylage, than in silage of lower dry-matter content. Fungal growth is particularly unwanted in feed intended for horses as it can lead to severe airway problems, an issue in which not only affects the animal's wellbeing, but also represent a particular problem within equestrian sports as it affects the athletic performance of the animal. The composition of the fungal flora, along with which factors of production that causes fungal growth in haylage, is an area of deficient knowledge. This thesis consists of two parts, a literature study and a section of own studies. The overall goal was to investigate the subject of hygienic quality in haylage intended for horses. More specifically, the goals were to investigate the fungal flora of haylage produced in Norway, and to address the cause and effect relationship of production factors and the development of molds and yeasts in this type of feed.

In the spring of 2011, it was gathered 25 samples of haylage, mainly from horse stables and/or feed producers within the counties of Rogaland, Møre- and Romsdal, North and South Trøndelag, Nordland, Østfold, Akershus, Buskerud, Oppland and Hedmark. Detailed questionnaires concerning production factors were completed for each place by interview of the producer. It was performed both chemical and microbiological analysis, and these were combined with the information from the questionnaires.

Arthrimum spp., *Penicillium roqueforti* and *Mucor circinelloides* were the most frequently isolated fungi in the analyzed samples. *Penicillium roqueforti* is a well-known mycotoxin producer in silage. It was demonstrated mold growth in seven of the 21 samples (33 %), while yeast was detected in all samples. The mold numbers were generally low and within the values considered as acceptable for haylage in Norway, with the exception of one sample. The mean values for all the samples were log 1,2 cfu/g, and log 3,5 cfu/g for the seven samples with mold growth. The mean value for yeast was log 5,3 cfu/g. A moist and mildly coastal climate can seem to increase the risk of fungal growth, compared with the drier and colder (winter) climate of the inland, as it was detected mold growth on 80 % of the samples from coastal climate, but in only 13 % of the samples from inland areas (p -verdi=0,005). It was also found significantly more yeast fungi in samples of first cut haylage compared to second cut haylage, log 5,6 cfu/g and log 4,5 cfu/g respectively (p -verdi=0,015). Other factors of production did not show any effects on the hygienic quality

based on this material. This investigation is based on a very limited set of samples. It cannot be drawn definite conclusions before the material is compiled with corresponding, and more extensive investigations in Sweden.

Forkortelser

TS	Tørrstoff
BE	Bruttoenergi
FE	Fordøyelig energi
OE	Omsettelig energi
NE	Nettoenergi
FEh	Fôrenheter hest
FE _d	Fôrenheter drøvtyggere
OE _h	Omsettelig energi hest
OE _d	Omsettelig energi drøvtyggere
RP	Råprotein
e. ekstr.	Eterekstrakt
RT	Rårevler
NFE	Nitrogenfrieekstrakstoffer
NDF	Nøytralløselig fiber
VOS	Vomfordøyelig organisk stoff
FFA	Flyktige fettsyrer
A _w	Vannaktivitet
VLK	Vannløselige karbohydrater

1.0 Innledning

Hesten er fra naturens side en gresseter og grovfôr utgjør en stor del av den naturlige fôrrasjonen. For å opprettholde god helse og velferd, og for at hestene skal kunne prestere optimalt er det viktig at fôret er av god kvalitet. Ved siden av næringsinnholdet er det den hygieniske kvaliteten som er avgjørende for standarden på fôret. I Forskrift om Velferd for hest (FOR-2005-06-02-505) er det presisert at hester skal ha fôr som er av god hygienisk kvalitet. Det er i dag et voksende marked for hestefôr i Norge, mye på grunn av økningen i antallet hester, men også fordi etterspørselen etter fôr av god kvalitet tilpasset hest har økt (*Norges Bondelag* 2007). I dag importeres mye av hestefôret fra Sverige, noe som betyr at det er rom for økt produksjon av norsk hestefôr. Dette krever imidlertid kunnskap med tanke på fôr kvalitet og hestens behov.

Tradisjonelt har høy vært det vanligste hestefôret, men bruken av høyensilage til hest har fått økende popularitet de senere årene ettersom produksjon av storballer med surfôr har blitt en mer og mer dominerende produksjonsform her i landet. I en spørreundersøkelse blant 683 norske hesteeiere oppga 69 % av hesteeierne høy som hovedfôr, mens hele 56 % oppga at de benyttet høyensilage, enten alene eller sammen med andre typer grovfôr (Farstad & Vik 2012). Våtere surfôr ble brukt av 35 % av respondentene i denne undersøkelsen.

Høyensilage har mange fordeler sammenlignet med den mer tradisjonelle høyfôringen; kortere tørketid og dermed mindre væravhengighet, ikke behov for lagringsplass inne samt mindre mengder svært små støvpartikler (Seguin et al. 2010; Vandenput et al. 1997). Ved sammenligning med våtere surfôr er det, på grunn av det lavere vanninnholdet, mindre problemer med frost i høyensilage på vinteren, noe som letter den manuelle utfôringen som er vanlig i hestehold. Det kan imidlertid være et større problem med soppvekst, og da spesielt mugg, i surfôr med høyere tørrstoffinnhold enn i våtere surfôr (O'Brien et al. 2008; Seguin et al. 2010). Soppvekst er sterkt uønsket av flere årsaker. Mugg- og gjærsopp kan blant annet føre til næringstap, forstyrrelser i fordøyelsessystemet (Kamphues 1996), og muggsopp kan i tillegg gi alvorlige helseplager som luftveisproblemer (Robinson 2001). Dette er spesielt problematisk hos hester da de er unike blant husdyra i at deres produksjon ofte er atletiske prestasjoner som krever maksimal lungekapasitet. Enkelte muggsopper kan også produsere giftstoffer som kan føre til blant annet problemer med reproduksjon (Minervini et

al. 2010) og nedsatt immunforsvar (Scudamore & Livesey 1998) eller representere en risiko for forgiftninger i seg selv.

Soppfloraens sammensetning, samt hvilke produksjonsfaktorer som forårsaker soppvekst og mykotoksindannelse i høyensilage er et område med mangelfull kunnskap, og det finnes lite informasjon om hva som er normalt og skadelig innhold (i.e. referanseverdier) av mugg og gjær i slikt fôr. Den mykologiske sammensetningen og omfang av soppforekomst er bedre kartlagt både av surfôr i silo (Auerbach et al. 1998) og i våtere rundballer (O'Brien et al. 2005; O'Brien et al. 2008; Skaar 1996). Det er ikke automatisk slik at disse referansene kan overføres direkte til å gjelde for høyensilage, og det er lite data tilgjengelig på dette området når det gjelder norsk høyensilage.

Denne oppgaven består av to deler, en litteraturred og egne undersøkelser. Det overordnede målet med denne oppgaven er å undersøke temaet hygienisk kvalitet i høyensilage beregnet for hest. Det vil legges vekt på hygieniske kvalitet i form av soppvekst. Mer spesifisert er målet å undersøke soppfloraen i høyensilage produsert i Norge, og å se på årsak/virkning forholdet mellom produksjonsfaktorer og utviklingen av mugg- og gjærsopp i denne typen fôr.

2.0 Litteratur

2.1 Ensilering

Ensilering er en metode for å konservere vannrikt fôr, og konserveringen skjer ved hjelp av kontrollert (mikrobiell) gjæring under lufttette forhold (McDonald 1991). Gjæringen skjer ved at melkesyrebakterier (LAB) forbruker vannløselige karbohydrater i fôret og produserer organiske syrer, særlig melkesyre. Syreproduksjonen sørger for lav pH og sammen med anaerobe forhold gjør det at mange uønskede mikroorganismer, som smørsyreproduserende klostridier, ikke klarer å vokse. Denne prosessen bidrar til å gjøre fôret lagringsdyktig over lengre tid. Det er spesielt viktig å utestenge luft for å hindre varmgang og oppblomstring av mugg, gjær og uønskede bakterier. Betegnelsen surfôr, også kalt ensilage, beskriver fôr som har gjennomgått en slik ensileringsprosess og er et begrep som favner fôr med ulikt tørrstoffinnhold.

Surfôr i Norge er gjerne lite fortørka og ligger på et tørrstoffinnhold mellom 20 og 30 % og med en pH på ned mot 4,2. I denne oppgaven vil begrepet våtere surfôr bli brukt om dette surfôret. Høyensilage er en betegnelse som brukes på sterkt fortørka surfôr som vanligvis har et tørrstoffinnhold på rundt 50 % og over (Müller et al. 2011). I slikt fôr kan gjerne pH-verdien ligge over 5 uten at det fremmer vekst av uønskede mikroorganismer (Weissbach 1996). Vanlig pH i nyslått gress er til sammenligning rundt 6, eller litt over (Mo 2005). Siden melkesyreproduksjon er avhengig av et visst vanninnhold foregår det derfor begrenset gjæring i høyensilage og det er i hovedsak tørkingen og det anaerobe miljøet som bevarer fôret. Det anaerobe miljøet gir også en oppkonsentrering av CO₂, som produseres av gressmassens og mikroorganismenes ånding. Surfôr kan enten lagres i silobeholdere og kalles da gjerne silofôr, eller pakkes i baller, enten firkantede eller runde, med betegnelsen rund- eller firkantballer.

2.1.1 Faser i ensileringsprosessen

Ensileringsprosessen kan deles inn i fire prinsipielle faser.

Fase 1; Den aerobe fasen

Rett etter slått og pakking vil det fremdeles være igjen luft i gressmassen. Dette vil opprettholde respirasjonen hos plantene, og både fakultativt og strengt aerobe mikroorganismer er fremdeles aktive. Respirasjonen til plantene og mikroorganismene

genererer varme. Plantezymer er også enda aktive og proteaser starter nedbrytinga av proteiner til aminosyrer, mens karbohydraser sørger for at mengden vannløselige karbohydrater (VLK) som er tilgjengelig for gjæring øker (Pahlow et al. 2003). Etter hvert som gressmassen pakkes og tettes vil oksygeninnholdet i massen avta og mikrobefloraen vil forandre seg slik at de anaerobe og fakultativt anaerobe mikrobene, som for eksempel *Lactobacillus*, vil overta. For å unngå oppformering av uønskede mikroorganismer (e.g. klostridier, gjær, enterobakterier og bacilli), og for å hindre større næringstap, er det viktig og raskt oppnå et anaerobt og eventuelt surt miljø (avhengig av tørrstoffnivå). Dvs. at for rundballer bør pakking av rundballer skje raskt etter pressing, og at tetting av silo skjer raskt etter innlegging. I godt kuttet og pakket fôr, og ved rask pakking/innlegging, varer den aerobe fasen kun i noen få timer (McDonald 1991). Tilsetting av syre eller inokulanter vil øke hastigheten på pH senkningen.

Fase 2; Gjæringsfasen

Gjæringsfasen starter etter at oksygenet er brukt opp og varer i omtrent en uke, men kan holde på i over en måned avhengig av avlingas egenskaper og ensileringsforholdene (Pahlow et al. 2003). Melkesyrebakteriene utnytter de vannløselige karbohydratene i gresset til sin energiomsetning, og produktet deres er hovedsakelig melkesyre. Dette gjør at innholdet av vannløselige karbohydrater (VLK) går ned ved ensilering. Andre fakultativt og strengt anaerobe mikroorganismer som enterobakterier, klostridier og visse gjær vil imidlertid konkurrere med melkesyrebakteriene om substrat så fort anaerobe forhold er oppnådd. Hvis det er nok næring, dvs. VLK, vil forholdene ligge til rette for at melkesyrebakteriene skal kunne produsere melkesyre i så store mengder og senke pH så lavt at andre, mindre syretolerante mikroorganismer ikke lenger kan leve. Etersom pH synker vil plantecellene kollapse og frigi mer VLK, som igjen vil fremme melkesyregjæringen (Jonsson 1989).

Melkesyra er det mest ønskelige sluttproduktet ettersom dette er den sterkeste syra og best kan sørge for tilstrekkelig pH senkning til å hindre uønskede mikroorganismer. Den gir også minst energi- og tørrstofftap. Det finnes i hovedsak to grupper av melkesyrebakterier, homofermentative og heterofermentative. De heterofermentative danner i tillegg til melkesyre også eddiksyre, etanol og karbondioksid, mens de homofermentative hovedsakelig danner melkesyre og derfor er mest effektive og ønskelige (McDonald 1991). Sluttproduktet de to typene produserer er imidlertid avhengig av substratet som blir brukt.

Nok lettløselige karbohydrater og rask utestenging av luft er som nevnt avgjørende for å oppnå god gjæring. Mangel på lettløselige karbohydrater vil kunne føre til forstyrrelser i det ønskede gjæringsforløpet ved at de heterofermentative melkesyrebakteriene kan skifte til å produsere eddiksyre og etanol istedenfor den sterkere melkesyra og der den ønskede pH senkningen dermed ikke oppnås. For høy pH kan føre til en såkalt sekundær gjæring, hvor det resterende sukkeret i plantene, den produserte melkesyra og eddiksyra blir omdannet til smørsyre av sakkaryttske klostridier (Pahlow et al. 2003). Dette fører til en videre økning i pH fordi smørsyra er svakere enn melkesyra og gir grobunn for andre, mindre syretolerante mikroorganismer som proteolytiske klostridier og enterobakterier (Jonsson 1989; Lindgren et al. 1985). Videre vil aminosyrer kunne bli nedbrutt til aminer og NH_3 (Pahlow et al. 2003), noe som gir en dårligere proteinkvalitet på fôret.

Lufttilgang gir leveforhold for uønskede aerobe mikroorganismer og vil kunne føre til blant annet høye gjærtall (Pahlow et al. 2003).

Fase 3; Den stabile fasen

Etter hvert som gjæringshastigheten avtar og forutsatt at anaerobe forhold opprettholdes, går ensileringen inn i tredje fase, den stabile fasen. Antallet melkesyrebakterier reduseres og tilslutt vil pH bli så lav at veksten av melkesyrebakterier stopper opp fordi de blir hemmet av egen syreproduksjon (Pahlow et al. 2003). Resultatet blir et stabilt surfôr (McDonald 1991). Forutsatt at det opprettholdes lufttette forhold, vil fôret kunne forbli i denne fasen i lengre tid (flere måneder). Flere syretolerante gjærsopper kan overleve denne fasen ved anaerob metabolisme, samt at flere bacilli og clostridia kan overleve i sporeform.

Fase 4; Utføringsfasen

Når surfôret åpnes vil gresset igjen utsettes for luft og det startes en aerob nedbryting. Mikroorganismer som har vært tilstede, men uvirksomme under ensileringa vil begynne å vokse. Eksempler på disse er gjær og eddiksyrebakterier. Som følge av den aerobe nedbrytingen vil resterende VLK og gjæringsprodukter forbrukes, temperatur og pH stige og det skjer en varmgang i massen (Muck et al. 1991). Aerob stabilitet er en betegnelse som brukes på den tiden det tar fra åpning til en målbar forandring i temperatur eller pH kan påvises (Muck et al. 1991). Tempo og intensitet på den aerobe nedbrytingen er avhengig av mange faktorer bl.a temperatur på omgivelsene og denne det kan ta alt fra noen timer til flere uker før aerob nedbryting påvises (McDonald 1991). Prosessen går saktere på vinterstid

når temperaturen er lavere. Høye gjærtall og stor varmeproduksjon ved innlegging vil kunne gi mer varmgang og dårligere aerob stabilitet ved åpning og det er ofte gjær som initierer den aerobe nedbrytingen (Lindgren et al. 1985). Dette fordi gjærsopp har en mye raskere metabolisme ved tilgang på luft, og siden de kan overleve ensileringen med minimale mengder O₂, vil en stor populasjon ved innlegging kunne blomstre opp ved åpning. Er det i tillegg mye tilgjengelig substrat, som sukker, vil gjærsoppen kunne produsere mye etanol. Ved forsinket tetting under pakking/innlegging er det hovedsakelig plantenes respirasjon som forårsaker varmgang, mens det ved åpning vanligvis er aerobe mikroorganismer som står for temperaturstigningen. Ofte skyldes det en suksesjon, der gjærsopp starter opp varmgangen, etterfulgt av muggsopp, varmekjære *Bacillus*-bakterier, og tilslutt Enterobakteria (Lindgren et al. 1985; McDonald 1991).

2.2 Hygienisk kvalitet i surfôr

Foruten den ernæringsmessige kvaliteten, (energi, protein, vitamin- og mineralinnhold) og gjæringskvaliteten, (organiske syrer, sukker, ammoniakk og pH) er den hygieniske kvaliteten en viktig del av kvalitetsbedømmelsen. Med hygienisk kvalitet menes fôrets innhold av uønskede mikroorganismer som sopp og bakterier, muggsopp- og bakteriegifter. Generelt vil også støv, midd, jord, kadaver osv. påvirke den hygieniske kvaliteten negativt. Ettersom det foregår en begrenset melkesyregjæring og dermed en mindre senkning av pH i noe tørrere surfôr (Johansen et al. 2010) og høyensilage (Müller 2005) på grunn av det høye tørrstoffinnholdet, vil en bedømming av kvaliteten på bakgrunn av gjæringsprodukter være av mindre interesse og bedømmelsen av den hygieniske kvaliteten være desto viktigere i kvalitetsbedømmelsen av denne typen fôr (Müller et al. 2011). Ved analyse av soppinnhold oppgis det totale antall kolonidannende enheter (CFU), dvs. sporer.

Godt surfôr, uansett tørrstoffinnhold, skal lukte friskt og ikke ha synlige spor etter jord og mugg. I *Surfôrboka* av Mo (2005) er det gitt følgende karakteristikker for subjektiv bedømmelse av surfôr: "Godt surfôr har lys, gulaktig til gulgrønn farge og en svak syrlig lukt. Mørk, brunaktig farge kan tyde på at temperaturen har vært for høy under ensileringa, men også at det er et høyt innhold av protein i gresset. Sterkt syrlig lukt kan tyde på et høyt innhold av eddiksyre og dermed noe nedsatt næringsinnhold. Mislykket smørsyregjæring kjennetegnes ofte av en slimete konsistens på graset og en sterk og ubehagelig lukt som

sitter i lenge etter at en har tatt i fôret. Plantene skal også beholde strukturen og ikke smuldre opp og løsne fra stilken ved håndtering”. Fôret skal heller ikke støve. Dårlig hygienisk kvalitet kan bety økt mengde små støvpartikler (Seguin et al. 2010; Vandenput et al. 1997), og fôr som støver mye kan tyde på et høyt innhold av muggsopp. Gjærsopp, blir ansett som mindre farlig (Eurofins 2011c), da det ikke er kjent at de produserer mykotoksiner. Det kan imidlertid være vanskelig for et utrent øye å vite hva som er gjær og hva som er mugg og dermed potensielt farlig. Søtlig, alkohollignende lukt er imidlertid et tegn på gjær, og ikke mugg. Gjærsopp er allikevel uønsket i surfôr ettersom den kan medføre store næringstap. De konkurrerer med melkesyrebakteriene om substrat, og bidrar ikke til en pH senkning i fôrmassen ettersom sluttproduktet deres er etanol (McDonald 1991).

I tillegg til en subjektiv bedømmelse vil det være behov for kjemiske analyser for å vurdere kvaliteten på surfôr. Ved kjemisk analyse kan man tallfeste den hygieniske kvaliteten, og i begrepet god hygienisk kvalitet ligger det at fôret har lave sopptall. Med tanke på soppvekst anses den hygieniske kvaliteten på surfôr i Norge med tørrstoff > 40 % for å være dårlig/nedsatt om de totale muggtallene overstiger log 4.5 cfu/g Tabell 1.

Tabell 1: Grenseverdier for mugg- og gjærsopp i surfôr beregnet til hest, oppgitt i log cfu/g (Eurofins 2011b).

	Ts < 35 %		Ts > 40 %	
	Bra	Dårlig	Bra	Dårlig
Muggsopp	< 2,5	> 4,0	< 3,0	> 4,5
Gjærsopp	< 3,0	> 4,5	< 4,0	> 6,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<2,0	>2,0	<2,0	>2,0

Som det videre fremgår av Tabell 1, er tilsvarende grenseverdiene for våtere surfôr (<35 % ts) log >4 cfu/g. Kamphues (2005) foreslo at grovfôr med muggtall over log 5 cfu/g var suspekterte og at fôr med muggverdier på log 6 cfu/g skulle kastes. For gjær oppga han at fôr med verdier på log <4 cfu/g kunne brukes, mens fôr med gjærtall på log 5-6 cfu/g indikerte sterk aerob nedbryting og representerte en påfølgende risiko for gassproduksjon i fordøyelsessystemet som igjen kan føre til kolikk symptomer (Kamphues 2005). Surfôr med gjærtall over log 5 cfu/g er spesielt utsatt for aerob nedbryting (Jonsson 1989; McDonald

1991), men generelt aksepteres det noe høyere gjærtall enn muggtall siden det ikke regnes som like farlig for dyret med gjær. Grenseverdier for og høy er vist i Tabell 2.

Tabell 2: Grenseverdier for mugg- og gjærsopp i høy beregnet til hest (Eurofins 2011b).

	log cfu/g
Muggsopp total	< 5,5
Muggsopp - lagringsflora	< 5,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	< 2,0

I en undersøkelse av gjennomsnittlige muggtall i rundballesurfôr av normal kvalitet (med antatt lavt ts innhold) i Norge ble det funnet verdier på log 5,5 cfu/g (median log 2 cfu/g), mens verdiene i forringet surfôr var log 6,6 cfu/g (median log 4,7 cfu/g) (Skaar 1996). Begge disse verdiene overstiger de anbefalte grenseverdiene for surfôr tiltenkt hest i Norge (Eurofins 2011b). Tall for synlig muggkontaminert surfôr fra ulike regioner i Irland var også høye og lå i gjennomsnitt på log 5 cfu/g (O'Brien et al. 2008). I en undersøkelse av hygienisk kvalitet i grovfôr i sveitsiske staller ble det funnet muggtall med en median på log 2,9 cfu/g i høyensilage klassifisert som tilstrekkelig god, mens det i lett forringet høyensilage ble funnet en median på log 5,5 cfu/g (Wichert et al. 2008).

Müller et al. (2011) fant at gjennomsnittlige muggtall for prøver av høyensilage fra 18 svenske gårder generelt var lave, henholdsvis log 1,78 cfu/g og log 2,11 cfu/g for prøver tatt på vår- og høstparten. I en tidligere studie av samme forfatter (Müller et al. 2008), der det ble gjort sammenligninger av våtere surfôr, høyensilage og høy i Sverige, ble det i det våtere surfôret funnet muggtall på i gjennomsnitt log 2,0 cfu/g, i høyensilage log <1,7 cfu/g og log 2,8 cfu/g i høy. For gjær var tallene for våtere surfôr, høyensilage og høy henholdsvis log 3,4, 3,6 og <1,7 cfu/g i denne studien (Müller et al. 2008).

Samme forfatter gjorde i 2005 en studie der det ble sett på virkningen av ulike konserveringsmetoder på mikrobiell og kjemisk sammensetning i fôret, og her ble det ikke funnet mugg i det våte surfôret (33,9 % TS), mens muggtallet for høyensilage (49,6 % TS) var log 2,57 cfu/g (Müller 2005).

Ved bedømmelse av kolonidannende enheter i fôret bør man imidlertid ha med i betraktningen at soppselekter sporulerer ulikt og i ulike mengder slik at tall på sporer fra sopper innen ulike slekter vil nødvendigvis ikke gi definitive data på soppaktiviteten i test materialet (Jarvis et al. 1983) og tall på dette bør vurderes med forsiktighet og ikke som et endelig mål på kvaliteten men mer som en rettesnor. Det er også forskjell på hvor farlige de ulike soppartene er. Noen kan produsere giftstoffer, som for eksempel *Penicillium*, *Aspergillus* og *Fusarium*, mens andre ikke kan det, som for eksempel arter i *Mucor* slekten, og høyere antall av en mindre farlig sopp kan bety mindre risiko enn et lavt antall av en potent mykotoksinprodusent.

Vannaktivitet er et begrep som brukes på lagringsstabilitet og regnes ut som den relative fuktigheten som omgir fôret/100 (Pelhate 1977). Vannaktivitet er ikke det samme som vanninnhold, men et mål for hvor mye av vannet som er fritt og ubundet i et produkt (Nofima 2012). Lav vannaktivitet betyr mindre fritt vann, mens høy vannaktivitet betyr mye tilgjengelig vann for mikroorganismene. Lav vannaktivitet gjør forholdene vanskeligere for mikroorganismer som bakterier og mugg, og det er dette flere konserveringsmetoder baserer seg på. For eksempel så hindrer salting og sukring vekst av mikroorganismer ved å redusere mengden av fritt vann. Eurofins Norge har satt maksimal grense for akseptabel vannaktivitet i høy til hest til 0,75 (Eurofins 2011a). En grense for vannaktivitet på under 0,75 vil imidlertid ikke utelukke vekst av gjær- og muggsopp, siden flere kan vokse ved en vannaktivitet ned til 0,60 (Davenport 1980). De fleste muggsopper krever imidlertid en vannaktivitet på over 0,80 for å vokse, mens bakterier gjerne krever over 0,90 (Nofima 2012).

2.2.1 Helserisiko knyttet til sopp

Grovfôr utgjør en stor del av fôrrasjonen til hester og inntak av og kvalitet på grovfôret er derfor av stor betydning. Helserisiko knyttet til hygienisk kvalitet i surfôr skyldes i hovedsak infeksjon av uønskede mikroorganismer eller forgiftninger av toksiner de har produsert. Hest regnes også som mer følsomme for dårlig hygienisk kvalitet enn drøvtyggere. Faktorer som kan predisponere dyret for infeksjon er nedsatt immunforsvar, langtidsbruk av antibiotika eller immunhemmende midler som kortikosteroider, i tillegg til feilernæring og høy eksponering av kontaminantene, som for eksempel soppsporer (Quinn et al. 2002). Høye

muggtall (over log 5,5 cfu/g) blir sett på som farlig for dyrs helse pga. at det antas å representere en større sjanse for mykotoksinproduksjon ((Gedek 1974), sitert i (Keller et al. 1998)). De patogene mekanismene knyttet til soppsykdommer er i hovedsak hypersensitivitet og påfølgende utvikling av astma/allergier, skadelige virkninger knyttet direkte til soppen (mykoser) eller toksinproduksjon (mykotoksikoser) (Quinn et al. 2002).

Hester er atleter og optimal atletisk prestasjon krever maksimal lungekapasitet. Luftveissykdommer har blitt identifisert som en av hovedårsakene til trenings- og konkurranseavbrudd hos fullblodshester (Wilsher et al. 2006) og dårlige prestasjoner hos sportshester (Martin et al. 2000). En av årsakene satt i sammenheng med luftveissykdommer er soppvekst i fôr. Astma, eller Recurrent Airway Obstruction (RAO), er en kronisk betennelseslidelse som hemmer de nedre luftveiene (Robinson 2001), og er ganske vanlig hos hester som står oppstallet store deler av året og føres med høy. Sykdommen kjennetegnes av astmalignende symptomer som kronisk hoste, hurtig, anspent pust, nasal utflod og slimoppnopning samt anspent bukmuskulatur, såkalt "heaveline" (*The Merck Veterinary Manual* 2011). RAO antas å være en allergisk respons til inhalering av organisk støv med spesifikke antigener (antistoffgenererende molekyler), og det er spesielt varmekjære mugg og actinomyceteer som *Aspergillus fumigatus* og *Faenia rectivirgula* som forbindes med sykdommen (McGorum et al. 1993). Hovedkilden til organisk støv er grovfôr og boksstrø, og det er funnet at høy inneholder mer støv og aeroallergener enn høyensilage (Vandenput et al. 1997). Luftveissykdommer blir ofte mer gjeldende hos eldre hester og kan være en følge av lang tids utsetting for antigener i for eksempel støv. Noe av årsaken til at hest er mer plaget enn andre dyr kan derfor være at hester lever lengre enn andre produksjonsdyr og at det derfor blir mer synlig. Muggkontaminert fôr kan også føre til astma, kalt Farmer`s lung, hos mennesker som håndterer fôret (Roussel et al. 2005). Mye av behandlingen av denne typen lidelser baserer seg på optimering av miljøet til hesten, spesielt med tanke på luftkvalitet for eksempel ved å la hesten være ute så mye som mulig og benytte fôr og strø med minimal støvbelastning og høy hygienisk kvalitet, gjerne bytte til høyensilage eller våtere surfôr.

Mange sopper har blitt assosiert med systemiske og lokale infeksjoner (mykoser) (Wilkinson 1999) og disse kan kategoriseres etter stedet de affekterer (Quinn et al. 2002). Overfladiske mykoser vil gjelde overhud og slimhinner, underhudsinfeksjoner rammer lær- og

underhudsvev, mens systemiske infeksjoner kan ramme luftveiene, fordøyelseskanalen og andre organsystemer (Quinn et al. 2002). Guttural pouch mykose/aspergillose, er en infeksjon som rammer slimhinnene i luftveiene hos hester og forårsakes oftest av sopp, spesielt av arter i *Aspergillus*-slekten (Lepage et al. 2004). Det er imidlertid ikke så ofte man ser tilfeller av denne sykdommen. I en studie av 64 hester med hudproblemer der det var mistanke om soppinfeksjon, fant Figueredo et al. (2011) at 28 % av hestene testet positivt for *Geotrichum candidum* og konkluderte med at denne soppen, som er vanlig i surfôr (O'Brien et al. 2008; Skaar 1996), kan spille en rolle i utviklingen av hudinfeksjoner.

Mykotoksikoser er forgiftninger som skyldes mykotoksiner og kjente mykotoksiner som er forbundet med forgiftninger er blant annet zearaleone, aflatoksiner og deoxynivalenol (DON). Tilfeller der mykotoksiner har ført til abort hos gris er kjent (Gareis 1993), men i en studie av effekten av mykotoksiner på reproduksjon hos hopper ble det ikke funnet relevant østrogeneffekt av mykotoksinet zearaleone og det ble konkludert at hester kanskje ikke er like sensitive som griser (Aurich 2006). Det er derimot funnet at det samme toksinet har toksisk virkning på sperm hos hingster (Minervini et al. 2010). Giftigheten av mykotoksinene er konsentrasjonsavhengig, mykotoksiner i grovfôr kan ikke utvannes slik som er vanlig med korn. Problemer med at mykotoksiner kan overføres til produkter som melk og kjøtt er ikke av stor betydning hos hester ettersom hesten først og fremst er en atlet og ikke et produksjonsdyr.

Det er vanskelig å påvise en sammenheng mellom sykdom hos dyr og mykotoksinforgiftning, men flere tilfeller av for eksempel produksjonssvikt mistenkes å være fôrrelatert, og da mykotoksinforårsaket. Polyneuropati er en nervesykdom som kjennetegnes av muskelsvakhet og overkoding når den rammer hester. Årsaken til sykdommen er ikke kjent, men den settes i sammenheng med dårlig hygienisk kvalitet i fôr. Det har i den senere tiden blitt gjort en undersøkelse som beskriver 75 tilfeller i Norge av hester med svakheter i bakbeinenes strekkesener, noe som førte til at de "kodet over" og falt sammen i bakbeina (Hanche-Olsen et al. 2008). Det ble funnet høye muggtall i syv av ni grovfôrprøver (høy og surfôr) som de berørte hestene var blitt fôret med. Det ble konkludert med at den mest sannsynlige forklaringen var en doseavhengig toksisk påvirkning og at dette trolig var fôringsrelatert (Hanche-Olsen et al. 2008). Det ble ikke undersøkt om det var produsert mykotoksiner, så om skadene i så fall kunne være forårsaket av soppen i seg selv, eller

eventuelle mykotoksiner er uklart. Men de dominerende muggsoppene som ble funnet var i slektene *Aspergillus* og *Penicillium*, begge potente mykotoksinprodusenter. For eksempel kan *Penicillium roqueforti*, den mest vanlige mykotoksinproduserende muggsoppen i surfôr (Nout et al. 1993; O'Brien et al. 2008; Skaar 1996), produsere roquefortine C i surfôr (Auerbach et al. 1998), et mykotoksin med neurotoksiske (paralyserende) egenskaper.

Helserisiko knyttet til bakterier dreier seg i hovedsak om forurensing av fôret med skadelige bakterier som hører til slektene *Clostridium* spp., *Listeria* spp. og *Enterobakteria* spp. Disse kan komme inn i fôret via jordinnblanding og kadaverrester og- eller gjødselrester. Bakterier av denne typen kan skape forstyrrelser i fordøyelsen eller føre til forgiftninger. Det er hovedsakelig *C. botulinum*, som er av bekymring. Denne bakterien kan, under gitte forhold, produsere nervegiften botulin, som kan føre til dødsfall, selv i små mengder. De tørre forholdene og den lave vannaktiviteten som fins i høyensilage er imidlertid normalt ugunstige for oppblomstring av skadelige bakterier. Klostridier er derfor sjelden å finne i høyensilage (Müller et al. 2008).

Dårlig hygienisk kvalitet generelt kan generelt sett gi et fôr med lav smakelighet, noe som kan føre til et lavere fôropptak. Kyr har vist tegn på nedsatt appetitt når de har blitt fôret med korn som har vært kraftig infisert med *P. roquefortii* (Hägglom 1990). Nedsatt allmenntilstand, forstyrrelser i fordøyelsessystemet som nedsatt fiberfordøyelighet som følge av forandringer i mikrofloraen (Kamphues 1996), diare, nedsatt immunforsvar (Pier et al. 1980) samt lever og nyreproblemer (Scudamore & Livesey 1998), er andre mulige konsekvenser av soppinfestert fôr.

2.3 Mikrofloraen i gress og surfôr

Epifyttfloraen er mikroorganismene som finnes naturlig på stående gress/fôrvekster. Det totale antallet mikroorganismer på ferskt gras varierer mellom 10^6 og 10^9 per g fôr (Mo 2005), og består av både aerobe og fakultativt anaerobe mikroorganismer. Sammensetningen og antall av de ulike artene varierer med planteslag, årstid, værforhold, gjødsling osv. Den typiske sammensetningen og antall innen hver gruppe av bakterier og sopp på gress ved høsting er vist i Tabell 3. Som det fremgår av tabellen er ofte mikroorganismene tilstede i veldig varierende antall. Generelt vil antallet mikroorganismer på stående plantematerialet

øke ettersom alderen på materialet øker (Mo, 2005). Økningen har vist seg å være litt forskjellig for de ulike mikroorganismene, og i en studie av førsteslått høstet på tre ulike tidspunkt utført av Müller (2009), økte tallene for melkesyrebakterier, gjær, mugg og enterobakterier med økt utviklingstrinn, mens tallene for klostridier forble uforandret. I ferdig høyensilage av det samme plantematerialet gav senere høstetidspunkt kun høyere gjær og melkesyretall (Muller 2009).

Tabell 3: Typisk antall og sammensetning av bakterier og sopp på stående gress ved høsting (Pahlow et al. 2003).

Gruppe av mikroorganismer	Antall kolonidannende enheter pr. g gress
Totale aerobe bakterier	>10 000 000
Melkesyrebakterier	10 - 1 000 000
Enterobakterier	1000 - 1 000 000
Gjær og gjærlignende sopp	1000 - 100 000
Muggsopp	1000 - 10 000
Klostridier (sporer)	100 – 1000
Bacilli (sporer)	100 – 1000
Eddiksyrebakterier	100 – 1000
Propionsyrebakterier	10 – 100

Melkesyrebakterier er de mikroorganismene som er mest avgjørende for en vellykket gjæring. De kan være tilstede på det stående gresset i lave antall (Stirling & Whittenbury 1963), men det er funnet at antallet øker dramatisk etter slått (Lin et al. 1992). Den mikrobielle floraen i ferdig surfôr er veldig forskjellig fra den som finnes på stående materiale (Pahlow et al. 2003). Både artssammensetning og totalt antall mikroorganismer vil endres når lufttette forhold oppnås og anaerobe organismer vil overta for de aerobe.

Mikrofloraen i surfôr kan grovt sett deles inn i ønskede og uønskede mikroorganismer. De ønskede mikroorganismene er i hovedsak melkesyrebakterier, og de uønskede er sopp, klostridier, enterobakterier, bacilli, mugg, listeria og eddiksyrebakterier (McDonald 1991).

2.3.1 Sopp

Sopper er heterotrofe, eukaryote organismer, og vokser enten som encellede (gjær) eller flercellede kolonier (mugg). Soppriket er et eget rike på linje med dyr, planter og bakterier og kan deles inn i tre divisjoner; *Ascomycota*, *Basidomycota* og *Zygomycota*, og disse kan skilles fra hverandre ved hjelp av karakteristikk av deres kjønnslige livsstadie (Quinn et al. 2002). Teleomorfer brukes om et kjønnnet formerings stadie, og anamorfer brukes om et ukjønnnet (vegetativt) formerings stadie. Enkelte sopparter er dimorfe - det vil si at de ved kan opptre i både mugg og gjær form, avhengig av miljøforhold.

Sopp finnes i stor utstrekning i jord, plantemateriale og vann. Muggsopp er bygget opp av hyfer (celletråder), som danner et forgrenet nettverk, kalt mycel. Det er mycelet som er soppens egentlige kropp. Hyfene kan danne kolonier og disse kan være mikroskopiske eller utvikle seg til store flekker, såkalt "muggroser". Den reprodukerende delen av soppen, sporene, er mikroskopiske og vanligvis ukjønnede formeringsenheter som spres via luften. Gjærsoppen reprodukerer seg hovedsakelig ved knoppsskyting.

Næringsopptaket til sopp foregår ved ekstracellulær fordøyelse. Ved å skille ut ekstracellulære enzymer kan de bryte ned komplekse organiske molekyler og produktene tas så opp gjennom cellemembranen i hyfene. De fleste sopper er saprotrofe (dvs. bryter ned dødt og organisk materiale), og hovednæringskilden er dødt plantemateriale. De fleste sopper er planteetere. Agarmedier for sopp inneholder derfor ofte karbohydrater (sukker), i motsetning til agarmedier for bakterier som inneholder mye protein. Muggsopp kan, i tillegg til å bryte ned sukker og melkesyre, også bryte ned og metabolisere/utnytte cellulose og andre celleveggkomponenter (McDonald 1991). Gjærsopper har lav proteolytisk aktivitet.

Sopper er hovedsakelig aerobe organismer, dvs. de trenger luft for å leve. Med unntak av en del gjærsopper og noen ytterst få muggsopper vokser de derfor kun der det finnes oksygen. De anaerobe forholdene i ensilert fôr er derfor i utgangspunktet ugunstig for soppvekst, og vekst av muggsopp i surfôr regnes som et sikkert tegn på at luft har vært tilstede. Det er imidlertid varierende hvor høye konsentrasjoner av oksygen de ulike soppene trenger for vekst og hvor høy toleranse de har for karbondioksid. En av grunnene til at *P. roqueforti* forekommer så ofte i surfôr er dens evne til å vokse ved lave O₂ konsentrasjoner og høye

CO² konsentrasjoner (McDonald 1991). *Fusarium* arter er mer oksygenavhengige og er derfor sjeldnere å finne i surfôr. Gjærsoppen vokser saktere ved anaerobe forhold, men kan overleve ensileringsprosessen og blomstre opp igjen ved åpning. Under aerobe forhold, kan gjærsoppen utnytte en mengde substrat som sukker, melkesyre, eddiksyre, andre organiske syrer og ulike alkoholer, mens den under anaerobe forhold trenger sukkerarter til gjæringen (McDonald 1991). Gjæring av glukose gir blant annet etanol, CO₂ og butanediol.

De fleste muggsopper trives best ved en temperatur på rundt 20 til 25 °C (Moreau 1979), men mange arter har et bredt temperaturintervall for vekst og sporene deres kan overleve selv ved minusgrader eller høye temperaturer (McDonald 1991). Minimums- og maksimumstemperatur for vekst av *A. fumigatus*, basert på resultater av flere forsøk gjengitt i Moreau (1979), er for eksempel litt over 10 til 50 °C. De fleste gjærarter vokser godt mellom 0° og 37 °C, og få vegetative celler er tilpasset temperaturer over 45 °C (Davenport 1980).

De fleste sopper vokser godt ved pH rundt 3-8, med et optimum rundt 5 (McDonald 1991). Gjær er spesielt syretolerante og kan vokse under forhold med pH ned mot 2 (McDonald 1991) og de hemmes ikke av det sure miljøet i våtere surfôr. *Penicillium roquefortii* er et eksempel på en muggsopp som tåler forholdsvis høye syrekonsentrasjoner.

Fuktighet spiller en viktig rolle for veksten av muggsopp (Moreau 1979). Ulike sopper trives ved ulike nivåer av relativ fuktighet og det er forskjell for fuktighetskrav til spiring, vekst og spredning av sporer der det siste ofte skjer ved litt høyere relativ fuktighet. Økende tørrstoff kan favorisere vekst av gjærsopp (Jonsson et al. 1990) og de tåler tørrere forhold enn muggsopp (Davenport 1980), men i motsetning til muggsopp trenger gjær en vannfase eller en fuktig overflate å vokse på (Davenport 1980). De fleste gjærarter vokser ved en vannaktivitet på mellom 0,60 og 0,88, mens muggsopp har et intervall på ca. 0,65 - 0,80 (Davenport 1980). Sopp er ikke fotosyntetiske og trenger ikke sollys for å vokse.

Det finnes et stort antall muggsopper og de regnes, sammen med gjærsopp, og bakterier som hovedansvarlige for nedbrytingen av surfôr ved lufttilgang (Lindgren et al. 1985; McDonald 1991). Muggsopp i fôr deles gjerne inn i lagringsflora og feltflora.

Lagringsmuggsoppen vokser på dødt materiale under lagring av mat og fôr, mens feltmuggsoppen hovedsakelig vokser på levende plantemateriale under feltforhold

(Christensen & Skaar 2008). Lagringsflora er mindre avhengig av fuktighet enn feltflora. De mest kjente muggslektene i Norge er *Fusarium*, *Penicillium* og *Aspergillus* og av disse er *Fusarium* en feltmuggsopp, mens de to sistnevnte er lagringsmuggsopp (Christensen & Skaar 2008). Alle tre er toksigene, det vil si at de har evnen til å produsere giftstoffer (mykotoksiner) under gitte forhold, og de anses som de viktigste mykotoksinprodusentene i surfôr (Scudamore & Livesey 1998).

Det meste av undersøkelser gjort på mykologisk sammensetning i surfôr er gjort på våtere surfôr og ulike vekster, gjerne mais og sukkerroer, i tillegg til gress (Tabell 4).

Tabell 4: Oversikt over de vanligste soppsektene og artene identifisert i våtere surfôr av ulike vekster ((Pelhate 1977)Auerbach et al. 1998; Nout et al. 1993; O'Brien et al. 2008; Skaar 1996(O'Brien et al. 2005)).

Muggslekter/-arter
<i>Penicillium</i> spp. (e.g. <i>roquefortii</i> og <i>paneum</i>)
<i>Aspergillus</i> spp. (e.g. <i>fumigatus</i>)
<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Rhizopus</i> spp.
<i>Byssoclamys</i> (e.g. <i>nivea</i>)
<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Munascus</i> (e.g. <i>ruber</i>)
<i>Neurospora</i>
<i>Trichoderma</i>

Gjærslekter/-arter
<i>Geotricum</i> (e.g. <i>candidum</i>)
<i>Pica</i> (e.g. <i>fermentans</i> og <i>anomalia</i>)

Soppfloraen er stor og det har i enkelte studier blitt identifisert så mange som 70 ulike sopparter (Pelhate 1977). Flere studier har påvist *Penicillium roqueforti* som den dominerende arten. I en undersøkelse av mykoflora i fortørket surfôr av gress og mais i silo fant Auerbach et al. (1998) at *Penicillium roquefortii* var akkompagnert av arter i slektene *Aspergillus*, *Mucor*, *Monascus* og *Geotrichum* (gjærsopp). Lignende resultater ble påvist i en norsk studie der Skaar (1996) undersøkte omfang og identitet på muggsporer i våtere rundballer fra ulike regioner i Norge. De vanligste slektene var også her *Penicillium*, *Aspergillus* og *Mucor*. I tillegg ble også *Geotrichum* og *Byssoclamys* ofte påvist. De artene

som forekom oftest i denne studien var *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roquefortii*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor circinelloides*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus* og *Byssoschlamys nivea* (Skaar 1996). Av disse igjen var det *Penicillium* slekten som var representert med det høyeste antallet arter. *Penicillium roqueforti* var også den dominerende arten i undersøkelser av irske ensilageboller (O'Brien et al. 2008). Her var imidlertid sammensetningen av artene noe ulik det som ble funnet i Norge, og ofte identifiserte arter inkluderte *Schizophyllum commune* og *Penicillium paneum*. I en annen norsk studie, der det ble gjort undersøkelser av høy og surfôr i forbindelse med mistanke om polyneuropati hos hest, dominerte også lagersopper i slektene *Aspergillus* og *Penicillium* den mykologiske undersøkelsen (Hanche-Olsen et al. 2008). Vanlige gjærsopp funnet i våtere surfôr inkluderer *Geotrichum* spp., *Pica fermentans* og *Pichia anomalia* (O'Brien et al. 2008). Det må imidlertid tas med i betraktningen at de ulike artene trives på ulike medier og ved ulike temperaturer, derfor vil også resultatene påvirkes av de metodevalg man tar i undersøkelsene og de ulike studiers presisjon kan derfor variere.

Når det gjelder soppfloraen i høyensilage (Tabell 5), ble det i en nyere studie gjort i Sverige funnet at *Aspergillus* og *Penicillium* også her var de vanligste slektene, men at også *Phoma* og *Eurotium* forekom ofte (Müller et al. 2011). Av de ulike artene var *A. fumigatus* mest frekvent (Müller et al. 2011). Dette var også tilfelle i en studie av irsk og kanadisk høyensilage (Buckley et al. 2007). Lignende resultater ble funnet i en fransk studie av hygienisk kvalitet i hestefôr der *Aspergillus* og *Penicillium* dominerte i høyensilage (Seguin et al. 2010). *Eurotium amstelodami* og *P. roquefortii* var hovedartene i denne studien.

Tabell 5: Oversikt over soppfamilier og arter funnet i høyensilage av gress (Müller et al. 2011; Seguin et al. 2010; Buckley et al. 2007)).

Muggslekter/-arter
<i>Penicillium</i> (e. g. <i>roquefortii</i> , <i>piceum</i> , <i>islandicum</i> og <i>verrucosum</i>)
<i>Aspergillus</i> (e.g. <i>fumigatus</i> , <i>niger</i> , <i>flavus</i> , <i>caespitosus</i> , <i>versicolor</i>)
<i>Eurotium</i> spp.
<i>Phoma</i> spp.
<i>Mucor</i> spp. (e.g. <i>circinelloides</i>)
<i>Cladosporium</i>

2.3.2 Mykotoksiner

Mykotoksiner er giftige stoffskifteprodukter (sekundære metabolitter) (Auerbach et al. 1998) som kan produseres av ulike muggsopper (Tabell 6). Hva som gjør at muggsoppen produserer mykotoksiner og hvilke miljøbetingelser som er avgjørende for produksjon er ikke fullstendig klarlagt, men det antas å være påvirket av mange faktorer, blant annet temperatur, vannaktivitet og soppens tilgang på oksygen og næringsstoffer (Christensen & Skaar 2008). Det er imidlertid ikke nødvendigvis slik at mykotoksiner blir produsert selv om toksigene muggsopp er tilstede i fôret, samtidig kan det forekomme mykotoksinproduksjon selv om det ikke er registrert synlig mugg (Auerbach et al. 1998). Soppkoloniens utseende røper heller ikke om gift er produsert, men det antas at mer synlig mugg i fôret utgjør en større risiko for mykotoksinproduksjon. Når soppen har gode levevilkår har den ikke behov for å produsere mykotoksiner. Det er gjerne når den får mindre gode levevilkår, (som kulde, tørke osv.), og blir stresset at giftstoffene dannes (Scudamore & Livesey 1998). Muggsopper er varmekjære og i en undersøkelse av *Fusarium* og *Fusarium*-giftproduksjon i korn ble det funnet at produksjon av mykotoksinet DON, som er en vanlig *Fusarium*-gift, økte ved lavere temperaturer før høsting (Bernhoft et al. 2012).

Tabell 6: Oversikt over mykotoksiner produsert av vanlige muggsopparter i surfôr og stående vekster* (Moreau 1979; Samson et al. 2000; Scudamore & Livesey 1998).

Muggart	Mykotoksiner
<i>Penicillium roquefortii</i>	Roquefortine C, isofumigaclavine A & B, PR-toxin, mycophenolic acid
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Glitoksin, verrucologen, fumitremorgin A & B, fumitoxin, tryptoquivalin, fumagillin, hervolic acid
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksiner, aspergillic acid, cyclopiazonic acid, 3-nitropropionic acid, kojic acid
<i>Byssochlamys nivea</i>	Patulin, Byssochlamic acid, malforminer
<i>Fusarium</i>	Deoxynivalenol (DON), HT-2 toxin, T-2 toxin, trichothecener, zearaleone, fumonisiner, nivalenol
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Cyclic peptide

*Ikke nødvendigvis påvist at soppartene kan produsere mykotoksinene i surfôr selv om mykotoksinene er forbundet med arten.

Selv om muggsoppen ikke kan vokse uten lufttilgang, kan mykotoksiner som er produsert før lufttilgangen tok slutt og fôret ensilert, forbli i fôret under lagring. Noen mykotoksiner har blitt påvist å kunne overleve ensileringsprosessen. I en studie der maissurfôr ble infisert med *F. Culmorum* som inneholdt naturlig produsert Zearaleone og undersøkt over en 12 ukers periode, fantes det ved dag 11 ingen *F. Culmorum* i fôret, mens Zearaleone-nivåene forble uforandret hele forsøksperioden (Lepom et al. 1988).

2.4 Faktorer som kan påvirke soppvekst i surfôr

2.4.1 Plastbruk

Det er flere forhold ved plastbruken som er viktig for å oppnå best mulig lufttetting. Antall lag, klebeevne, motstandsdyktighet mot filmbrudd og lav gassgjennomtrengelighet er noen av faktorene som bestemmer kvaliteten på plasten og tettheten i ferdig pakkede baller. Ved å øke antall lag plast som benyttes, forventes det at tettheten i emballasjen forbedres og gassutvekslingen med omgivelsene reduseres. Normalt regnes emballasjetetthet, i form av gassgjennomtrengelighet, på under 100 sekunder som akseptabelt (Müller 2005). Høyere konsentrasjon av CO₂ i ballene indikerer en økt tetthet og i en studie av Müller (2005) ble det funnet høyere CO₂ konsentrasjon i baller som hadde blitt pakket med ti lag plast, enn i ballene pakket med seks til åtte lag plast. Det ble derimot ikke påvist sikre forskjeller i emballasjetetthet i denne studien, men dette er tidligere demonstrert av andre (Paillat & Gaillard 2001). Ved å øke tettheten i emballasjen vil muggsoppvekst hindres, og det er funnet en signifikant reduksjon i mugg- og gjærvekst når det ble brukt økende antall lag plast (Borreani & Tabacco 2008; Keller et al. 1998). Økende antall lag plast vil også gjøre emballasjen mer motstandsdyktig mot eventuelle hull. Synlige hull i plasten på ballene kan føre til høyere muggkontaminasjon sammenlignet med baller der plasten er intakt (O'Brien et al. 2008). Ved fôr med høyere tørrstoffinnhold vil det være ekstra viktig med økt bruk av plast (se kap. 2.4.3). Vanlig praksis i dag er å bruke 6-8 lag plast på fuktigere surfôr, mens de aller fleste grovfôrprodusenter velger å benytte flere lag ved produksjon av surfôr med høyere tørrstoffprosent.

Det finnes ulike bredder på plasten og i Norge er 500 og 750 mm mest vanlig. Større plastbredde regnes i utgangspunktet for å være tettere enn en smalere bredde på grunn av

færre overlappinger og dermed mindre muligheter for luftlekkasje (Müller 2002). Bredere plast er også lettere å pakke inn ballene med, da den legger seg bedre rundt hjørnene på ballene enn smalere plast og overlappingen dermed blir jevnere og bedre (Kjus et al. 1996). Før plasten legges på ballen strekkes den for at lagene skal lamineres mot hverandre slik at den sitter fast. Overlapping av foregående plastlag bør være på 50 % (Müller 2002). Plasten som brukes i dag er laget av polyetylen. Typisk tykkelse på denne er 25 µm (Müller 2002). Slik plast kan ha lav tetthet og derfor være relativt lettgjennomtrengelig for oksygen, CO₂ og andre gasser. Grad av permeabilitet er imidlertid avhengig av temperatur og permeabiliteten øker med stigende temperatur (Müller 2002). Dette er spesielt ugunstig når det gjelder førsteslått, fordi den må ligge gjennom en varm sommer og dette kan øke risikoen for muggvekst. Det kan derfor være lurt å ha mer plast på førsteslått enn på andreslått. Hvit plast reflekterer mer solenergi enn svart, og er derfor gunstig for å minimere plasttemperaturen og dermed permeabiliteten.

Det er i seinere år gjort forsøk med en ny type oksygenbarriere plastfilm (OB) som har 20 % lavere oksygengjennomtrengelighet enn konvensjonell polyetylenfilm (PE) (Borreani & Tabacco 2008). Dette ga resultater i form av at en lavere prosentandel av overflatearealet ble dekket med muggvekst ved bruk av OB plast, selv med færre antall lag enn ballene pakket med PE plast (Borreani & Tabacco 2008).

2.4.2 Vær og klima

Vær og klima er av stor betydning i fôrproduksjon. Fôr høstet i tørt vær har vist å gi mindre synlig muggvekst enn fôr høstet i vått vær (O'Brien et al. 2008). Når det kommer regn på gresset øker det både risikoen for sølevannsprut og jordinnblanding, men gir også fuktighet til gresset som igjen kan gi grunnlag for muggvekst. Det er også individuelt for de ulike soppartene hvilke forhold de trives under. *P. roqueforti* og *P. paneum* var for eksempel mer vanlig i baller høstet i tørt vær enn i baller høstet i vått vær (O'Brien et al. 2008).

Kystklima har generelt varmere vintre, og kan dermed gi bedre forhold for soppvekst (gjær eller mugg). Varmere vær vil gjøre at fôret er mindre stabilt ved åpning. Varme somre kan være negativt pga. åpnere porer i plasten som kan tillate mer oksygendiffusjon og dermed gi mer gunstige forhold for soppvekst i rundballene.

2.4.3 Fortørking og tørrstoffinnhold

Fortørking gir et fôr med høyere tørrstoffprosent. Økt tørrstoffprosent begrenser vekst av uønskede mikroorganismer som klostridier (McDonald 1991) og fremmer god gjæring. I tillegg får man baller med høyere tetthet og dette reduserer antall baller å transportere samt at plastbruken blir mindre. Fortørking gir også mer formstabile baller, noe som er ønskelig siden deformering av ballene kan gi økt luftlekkasje. Økt ts-innhold har imidlertid vist å øke muggveksten (Auerbach et al. 1998; O'Brien et al. 2008). O'Brien et al. (2008), som fant at det var en klar positiv korrelasjon mellom økende tørrstoffinnhold og hull på platen, forklarte dette med at stivere strå lettere punkterer platen. Økt tørrstoffinnhold gir også redusert tetthet i gressmassen og høyere porøsitet tilgjengelig for gassutveksling (McEniry et al. 2007) og dette gir større mulighet for den luftavhengige muggsoppen til å vokse og spre seg.

På grunn av det høye tørrstoffinnholdet i høyensilage ($\geq 50\%$) skjer det en begrenset gjæring og surgjøring (Müller 2005), og det er i hovedsak tørkingen og de anaerobe forholdene (med høye CO_2 konsentrasjoner) som konserverer fôret. Flyktige fettsyrer er kjent for å ha antimykotiske egenskaper (Auerbach et al. 1998), og udisosiert melke- og eddiksyre kan senke veksthastigheten på mugg og gjær betraktelig (Muck et al. 1991). På grunn av at høyensilage er assosiert med høyere pH og lavere syrekonsentrasjoner (Muck et al. 1991) kan det derfor være mer ustabil og mer utsatt for aerob nedbryting enn våtere surfôr. På grunn av den begrensede gjæringen inneholder høyensilage også mer vannløselige karbohydrater enn våtere surfôr (McDonald et al. 1968; Müller 2005). Dette kan gi uønsket mye næring til mikroorganismer som gjær og mugg ved åpning av fôret.

Når det gjelder metoder for fortørking har strenglegging vært mest vanlig. Flere har imidlertid demonstrert at breispredning øker hastigheten på opptørkinga av gresset (Spörndly et al. 2008; Synnes et al. 2010), og en med denne metoden blir mindre avhengig av lange perioder med tørt vær for å oppnå ønsket tørrstoffinnhold. Ikke minst får en også et jevnere tørrstoffinnhold i massen med breispredning. Det har derimot vært mistanke om at breispredning kan øke sjansen for dårligere hygienisk kvalitet på grunn av økt fare for jordinnblanding ettersom det kreves mer kjøring og håndtering av gresset. Forurensing med jord eller sølevann øker, ifølge Mo (2005), sjansen for *Bacillus* sporer i surfôret og i en norsk studie fra 2010 (Johansen et al. 2010) ble det funnet at surfôr fra breispredd gress hadde et

høyere gjennomsnittlig innhold av smørsyre enn surfôr fra strenglagt gress. Det var også i samme studie en tendens til flere prøver med *Clostridium*-sporer i fôret som hadde blitt breispredd kontra gresset som var lagt i streng. Begge disse funnene peker i retning av redusert hygienisk kvalitet ved breispredning, men det ble derimot ikke funnet signifikante forskjeller i antall prøver med mugg og gjær om gresset ble breispredd istedenfor strenglagt, selv om det nominelt var flere prøver med mugg- og gjærsopp ved breispredning enn strenglegging (Johansen et al. 2010).

I forhold til lengde på fortørkingstida kan dette også ha en innvirkning på sopptallene i fôret. Økt tid til fortørking kan blant annet gi høyere gjærtall (Jonsson 1989; McEniry et al. 2007). En mindre andel av ballenes overflate var kontaminert med sopp når gress ble fortørket i <1 dag sammenlignet med >3 dager (O'Brien et al. 2008). Dette er motsatt av hva som er funnet av andre. Skaar (1996) fant at soppkontaminering minket ved økende lengde på fortørkingen.

2.4.4 Presseutstyr og stengelbehandling

Hard pressing er viktig for å oppnå et godt resultat og det er ekstra viktig i sterkt fortørket gress siden den begrensede gjæringen gjør at det tar lengre tid å bruke opp lufta. Det finnes i hovedsak to typer rundballepresser, variabel- og fastkammerpresser, i tillegg til firkantpresser. Den viktigste ulempen med fastkammerpresser er at fôret blir løsere pakket mot midten av ballens og hardere i utkantene ettersom kammeret fylles opp mer. Dette kan gi mer luft tilgjengelig i ballens kjerne, noe som kan favorisere muggvekst. Løse baller kan få mugg lengre innover, mens i mer kompakte baller kan muggveksten dermed begrenses til overflaten om det blir hull i plasten. Med et variabelkammer vil gresset bli utsatt for konstant press hele veien og man oppnår en jevnere og tettere pakking av gressmaterialet. Baller pakket med variabelkammer har et 10-20 % større volumvekt i forhold enn baller pakket med fastkammerpresser (Mo 2005), men i nyere presser skal denne forskjellen være noe utjevnet. Pressemeknikken i firkantpresser sørger for at fôret presser jevnere hele veien. Det er generelt overflaten på ballene som er mest utsatt for lufttilgang og dermed soppvekst. Baller har generelt et mye større overflateareal i kontakt med plastfilm enn siloer, og dermed et større område utsatt for nedbryting. Med såkalte kombipresser blir

ballene presset og pakket i en og samme maskin. Fordelen med dette er at fôret blir pakket umiddelbart og dette kan bidra til å hindre varmgang i massen.

Stengelbehandling er vanlig metode for å øke opptørkingshastigheten på gresset samt å forbedre pakkingsgraden av fôrmassen. Knusing gir bedre pakking og lufttømming i materialet, og det er demonstrert at knust gress mugner mindre enn langt gress (Randby 1996b). Høyere stubbehøyde vil minske faren for jordinnblanding.

2.4.5 Høstetidspunkt

Stengelandelene på plantene øker med økt utviklingstrinn. Økt stengelandel betyr, i likhet med økende tørrstoffinnhold, stivere strå, det blir vanskeligere å pakke ballene hardt og det kan lettere gå hull på plasten. Baller som har fått hull på plasten gir høyere andel av synlig overflatemugg enn baller der plasten er intakt (O'Brien et al. 2008). Derfor bør i utgangspunktet gress som høstes på et seinere utviklingstrinn tørkes til lavere TS-nivå enn gress i tidlig utviklingstrinn, siden ungt gress tåler mer tørking uten å bli for stivt. Dette er imidlertid ikke vanlig praksis med hestefôr, dette blir gjerne slått seint og fortørket mye og problemer oppstår. Når det gjelder andreslått har denne normalt noe mer blad enn førsteslått. Det kan gjøre den lettere å pakke hardt enn førsteslått.

2.4.6 Håndtering/lagring

Når det gjelder håndtering av ferdig pakkeballer gjelder det som hovedregel at jo mindre håndtering jo bedre. All flytting øker risikoen for hull på plasten og bør gjøres så skånsomt som mulig. Randby og Fyri (2004) fant at transport av upakkeballer med påfølgende innpakking ved lagerplassen ga det beste resultatet i form av den tryggeste lagringen og minst mugg i ballene. Dette er i samsvar med O'Brien et al. (2008). Transport med ruller, eventuelt kombinert med lessing og transport på henger, var den mest skånsomme transportmetoden, mens transport med klype ga mer mugg (Randby & Fyri 2004). Flytting av ballene mens plasten står i spenn er ikke heldig, og flytting lenge etter pressing kan lettere ødelegge klebing mellom plastlagene. Temperatur under lagringsperioden har innvirkning på muggforekomst. Lagring inne ved 20 grader viste seg å gi mer mugg enn lagring inne ved 5 grader eller lagring ute (Randby 1996). Lagring på nordsiden av en bygning, eller i skyggen er

derfor å anbefale. I tillegg kan lagring på hard grunn kan være lurt, da man unngår at jordrotter kan komme opp i ballene nedenfra. For å beskytte mot fuglehakk og lignende på plasten, kan en plastpresenning eller oppspent nett være til hjelp. Selv om fuglehakkskader kan være små har det i forsøk vist å gi omtrent tre ganger så mye mugg på overflaten av rundballer som var skadet sammenlignet med uskadde baller (Randby 2010).

Andre lagringsfaktorer som kan ha en sammenheng med soppkontaminering er antall lag i høyden ballene er stablet i. Lagring i to høyder ga en lavere andel av overflatemugg enn lagring i tre lag eller mer, men også i forhold til lagring i kun et lag (O'Brien et al. 2008). Det ble ikke gitt en mulig forklaring på de motstridene resultatene i dette forsøket.

2.4.7 Tilsetningsmidler

I våtere surfôr er det både vanlig og nødvendig med tilsetning av ensileringsmidler for å oppnå god gjæring og unngå tørrstofftap (Mo 2005). Det er større sjanse for å få oppblomstring av smørsyrebakterier når tørrstoffinnholdet er lavt enn i surfôr av høyere tørrstoffinnhold (McDonald 1991) og derfor er det ikke vanlig å bruke ensileringsmidler i høyensilage. Det finnes i hovedsak to typer ensileringsmidler til surfôr: Gjæringshemmere (uorganiske syrer, organiske syrer, salter av disse og formaldehyd/formalinlignende stoffer) og gjæringsstimulatorer (inokulanter, enzymer og sukkertilsetning) (McDonald 1991).

Konserveringsmidler som kun er basert på maursyre har ingen betydning for muggforekomst. Propionsyre derimot, har en viss effekt når de tilsettes i tilstrekkelig dose (Mo 2005). Middelet må fordeles jevnt i materialet.

3.0 Materiale og metode

Undersøkelsene er en del av et større prosjekt,- finansiert over det svensk-norske forskningssamarbeidet for hest, der Sveriges Landbruksuniversitet er prosjektansvarlig og Bioforsk Kvithamar er ansvarlig for den norske delen. Tittelen på hovedprosjektet er: "Soppflora og forekomst av mykotoksiner i plastpakket grovfôr til hest" og prosjektet bruker data fra både Norge og Sverige. Prosjektet har dessuten som målsetting å finne raskere og enklere metoder for identifisering av muggsopper enn de som er vanlig å bruke i dag, samt og analysere fôrprøvene for mykotoksiner.

3.1 Gårder, fôr og geografiske regioner

Det ble tatt ut 25 prøver av høyensilage, hovedsakelig fra norske hestestaller og/eller fôrprodusenter (heretter kalt gårder) i Rogaland, Møre- og Romsdal, Trøndelags-fylkene, Nordland, Østfold, Akershus, Buskerud, Oppland og Hedmark. Stallene og fôrprodusentene, - ble valgt ut på bakgrunn av internettsøk (hestestaller, ridesenter, fôrprodusenter, salg/kjøp av fôr), lokalkunnskap (bekjentskap) og søk i Statens Landbruksforvaltning sin tilskudds-database for 2010. På grunn av at 2010 var et dårlig fôrår i deler av landet (Nord-Norge, fjelltraktene) og prøveinnsamlinga foregikk på våren, hadde mange på dette tidspunktet lite høyensilage igjen. En del områder det ellers hadde vært naturlig å ha med i måtte derfor utgå. Fire av de innsamla prøvene og tilhørende opplysninger om produksjon og bruk ble utelatt fra analysen. Èn på grunn av forsinket postgang til laboratoriet, de tre andre fordi det viste seg at tørrstoffinnholdet var for lavt til at fôret kunne kategoriseres som høyensilage. En prøve hadde et tørrstoffnivå på 460 g/kg og ble tatt med da dette ligger tett opptil 50 % tørrstoff. Videre ble en gård utelatt fra sammenligningen mellom mugg og type baller, på grunn av at dette var den eneste gården med små høyballer (30-40 kg). På èn gård var det ikke mulig med overflateinspeksjon (registrering av synlig soppvekst) og å ta ut prøve for kontroll av plastlag da eier hadde åpnet ballen 12 timer før prøvetaking og ikke ville åpne en til. Overlapping av plasten ble ikke registrert på to av gårdene.

Prøvetaking foregikk i april-juni 2011 og alle prøvene ble tatt av samme person. Fôret som ble undersøkt var fra sesongen 2010, og av enten første eller andreslått. Av de 21 gårdene som kunne brukes til videre analyse ble klimaet på seks gårder klassifisert som "varm-

temperert sone” (heretter kalt kystklima) og på de resterende 15 som ”kald-temperert sone” (heretter kalt innlandsklima) etter Köppens klimaklassifisering (*Meteorologisk Institutt* 2012).

3.2 Prøvetaking av fôr

Det ble valgt ut tre baller uten synlige skader på plasten eller unormal form fra hver av de 25 gårdene, totalt 75 baller. På en av de tre ballene ble det før åpning foretatt tetthetsmåling, med ventil, pumpe og manometer. Tiden (sekunder) det tok fra -20 til -15 vp (vanntrykk) ble notert, og dette er videre i oppgaven referert til som emballasjetetthet. Deretter ble plasten fjernet fra den samme ballen som så ble inspisert for overflatemugg. Funn ble registrert på eget skjema (Vedlegg 1) og prøver ble tatt, enten ved avstryk med aseptisk bomullspinne eller ved å ta ut små plantedeler med synlig mugg ved hjelp av pinsett. Plantedelene eller bomullspinnene ble deretter plassert og lukket i aseptisk plastrør. Endelig ble det tatt ut åtte borkjerner ved hjelp av siloborr med diameter 40 mm fra hver av de tre utvalgte ballene. Alle de 24 borkjernene slått sammen og blandet og prøver til mikrobiologiske (200-250 g) og kjemiske analyser (1000-1500 g) ble tatt ut fra samleprøven. For nærmere detaljer henvises til prøvetakingsprotokollen (Vedlegg 2).

Prøvene ble merket med gårdsnummer, pakket med kjøleelementer og sendt samme dag med post eller Jetpack til laboratoriet ved Kungsängen, Uppsala samme dag som de ble tatt ut. Prøvene skulle fortrinnsvis være fremme på laboratoriet og klare til videre bearbeiding innen ett døgn, men postgangen mellom Norge og Sverige tok i noen tilfeller lengre tid. Prøvene fra en av gårdene brukte så lang tid i posten (<3 dager) at man valgte og ikke gjøre mikrobiologiske analyser på denne.

3.3 Spørreskjemaer til produsent

Detaljerte spørreskjemaer (Vedlegg 3), om produksjonsfaktorer ble utfylt for hvert sted ved intervju av gårdbruker eller produsent. I tilfeller der det allerede forelå analyser av fôret ble disse innhentet. I tilfeller der prøver ble tatt på steder som ikke hadde produsert fôret selv, ble fôrprodusent kontaktet for besvarelse av spørreskjema. De færreste kunne angi nøyaktig dato for når fôret ble slått/pakket eller nøyaktige opplysninger om botanisk sammensetning av enga.

3.4 Analyser

3.4.1 Kjemiske analyser

Fôrprøvene ble analysert for tørrstoff, pH, organiske syrer (melkesyre, smørsyre, eddiksyre, propionsyre, maursyre), alkoholer (etanol, butanediol), energiverdi, aske, råprotein og nøytralløselig fiber (NDF). De kjemiske analysene ble utført ved Kungsängen forskingssentrum, SLU Sverige, som beskrevet av Müller (2005). Trevleanalyser til bruk i utregning av fôrenheterhest (FEh) ble utført etter AOAC (1990) på LabTek ved UMB. Her ble det også gjort nye tørrstoffbestemmelser som ble brukt til å beregne trevleinnhold per kg tørrstoff. Prøvene ble her tørket på 103 °C i minimum 4 timer (ISO6496). Tørrstoffkorrigerings ble gjort etter NorFor (NorFor & Volden 2011). Det ble ikke analysert for fett i dette forsøket, og det ble derfor satt inn en fettprosent på 3 % i bruttoenergiformelen basert på normale verdier funnet i fôrtabellen, siden fettinnholdet har lite variasjon i gress (Fôrtabellen 2008). Beregninger av energiinnhold i fôret ble gjort basert på omregninger av svenske verdier for omsettelig energi. Beregning av OEd ble gjort etter Lindgren (1979 (corr. 1983)), omregning av OEd til OEh ble gjort etter Planck et al. (2001), beregning av NEh ble gjort etter formel: $NEh, MJ / kg ts = -0,051 + (0,59 * OEh, MJ / kg ts) + (0,0121 * OEh, MJ / kg ts)^2$ (Dag Austbø, pers. kom.). Beregning av FEh ble gjort etter Martin-Rosset et al. (1994).

3.4.2 Mikrobiologiske analyser

Fôrprøvene ble analysert med mikrobiologisk dyrkning for kvantitativ bestemmelse av gjær- og muggsopp etter arbeidsmetode beskrevet i Vedlegg 4. Det ble brukt to vekstmedier; maltekstraktagar MEA (uten tilsetning av melkesyre) og Dichloran 18 % glycerol (DG18). Prøvene ble analysert ved to temperaturer; 25 °C og 37 °C. Kvalitativ bestemmelse av muggarter ble gjort ved direkteutlegg av fôr- og synlig muggprøver (Vedlegg 4) samt dyrkning av renkulturer og identifisering med PCR-sekvensiering etter Samson et al. (2000).

3.5 Databehandling og statistiske beregninger

Opplysningene fra spørreskjemaene ble lagt inn elektronisk i Microsoft Office Excel 2007, de fleste som kategoriske data (ja/nei). Det ferdige datasettet ble så overført til

statistikkprogrammet SAS (SAS 9.2 2010) hvor gjennomsnittsverdier og standardavvik ble funnet ved hjelp av Proc Means-prosedyren.

Siden det ble observert mugg på fôret bare på 7 av 21 gårder ble datamaterialet for muggtallene for lite til å kunne brukes i en Glm-analyse. Jeg valgte derfor å behandle muggobservasjonene som frekvenser (andel av gårdene hvor mugg ble observert) for de ulike faktorene jeg ønsket å undersøke. Det ble brukt Kji-kvadrat test og Fisher`s exact test for å undersøke om de ulike produksjonsfaktorene kunne regnes som sannsynlige forklaringer på forskjeller i muggvekst mellom gårdene. Flere av cellene i Kji kvadrat tabellen inneholdt mindre enn 5 observasjoner og asymptotisk test kunne derfor ikke regnes som gyldig. Det er derfor rapportert p-verdi for "Exact test" som er gyldig under slike forhold (SAS 9.2 2010).

Siden det ble observert vekst av gjær på fôr fra samtlige gårder, var det mulig å bruke General Linear Model (GLM) for å undersøke om de ulike produksjonsfaktorene hadde signifikant effekt på mengden gjær i høyensilage (Modell 1), og om antall plastlag hadde signifikant effekt på emballasjens tetthet (Modell 2). Resultatene ble regnet som signifikant ved p-verdi <0,05, og å indikere en tendens ved p-verdi < 0,1.

Modell 1:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = Gjennomsnittlig gjærtall for gård j (1 og 5-24) med nivå i av fast effekt.

μ = Total gjennomsnittlig gjærtall for alle gårdene

α = Fast effekt av nivå i for enten plast (1,2), vær (1,2,3), fortørkingsmetode (1,2,3), fortørkingslengde (1,2), type baller (1,2), type kammer/presse (1,2,3), klima (1,2), slåttenummer (1,2) eller synlig sopp (1,2).

e_{ij} = tilfeldig feil

Modell 2:

I modell 2 var Y_{ij} = Gjennomsnittlig tetthet for gård j (1-24) og α_i = fast effekt av plastmengde i (1, 2). Ellers var Modell 2 lik Modell 1.

4.0 Resultater

4.1 Respons på spørreskjema og inspeksjonsfunn ved prøvetaking

Respons på spørsmålene i spørreskjemaet er vist i Tabell 7. På 14 av de 21 gårdene i studien der prøvemateriale ble brukt til videre analyser produserte de sitt eget fôr, mens de resterende syv gårdene enten kjøpte ferdigprodusert fôr eller leide inn entreprenør. Det var åtte gårder som benyttet rundballer og 13 som benyttet firkantballer. Hoveddelen av fôret var av første slått (16 av 21 gårder).

Det tallet produsentene oppga som antall lag plast på ballene varierte en del fra det som ble registrert i kontrolltelling. Det var opptil seks lags forskjell på oppgitt plastmengde og det faktiske antall lag plast funnet ved kontrolltelling. Det ble både oppgitt for mye og for lite plastmengder. Basert på svarene fra produsent var det fem gårder som falt inn under kategorien som hadde brukt 6-10 lag plast, mens det var 16 som falt inn under kategorien som hadde brukt 12-18 lag plast. Etter kontrolltelling ble dette justert til henholdsvis seks og 15 og det er tall fra kontrolltelling som er brukt i de statistiske analysene. Faktorer som varierte lite mellom alle gårdene var; stengelbehandling, farge på plast, gjødsling, bruk av ensileringsmiddel, underlag på lagerplass og stubbehøyde, der flesteparten av produsentene oppga at de henholdsvis brukte crimper, hvit plast, gjødslet, ikke brukte ensileringsmiddel, lagret ballene på gress og stilte inn stubbehøyde på fem-ti cm.

Det ble registrert synlig soppvekst (mugg, gjær eller begge) på 12 av de 20 gårdene der det var mulig med overflateinspeksjon. I ni tilfeller dekket soppveksten under én prosent av overflatearealet på ni av gårdene, mens den dekket mellom 1,5-2 % av overflatearealet resterende tre gårdene. På åtte av gårdene ble det funnet én eller to soppkolonier, mens det på resterende fire gårdene ble funnet tre til seks kolonier.

Respons på spørsmålene i spørreskjemaet er vist i Tabell 7.

Tabell 7: Respons på spørreskjema fra gårdene der prøvene kunne brukes til videre analyse (N = 21 der ikke annet er oppgitt). Alle svar er oppgitt av produsent, ikke målt/bekreftet.

Karakteristikk	Respons	Antall	Karakteristikk	Respons	Antall
Egenprodusert fôr	Ja	14	Breispredning/ strenglegging	Breispredning	12
	Nei	7		Strenglegging	9
Fôret brukes til	Hest	16	Stubbehøyde (N = 19)	5-10 cm	16
	Hest og sau	1		>10 cm	3
	Hest og storfe	1	Fortørking	1 - 2 døgn	3
	Hest, sau, storfe	2		3 - 5 døgn	18
	Hest, sau, storfe og geit	1	Behandling ved fortørking	0 - 2x vend	5
Type baller	Rundballer	8		≥2x vend	16
	Firkantballer	13	Presseutstyr (N = 20)	Rundballe - fastkammer	4
Slåttenummer	1	16		Rundballe - variabelkammer	3
	2	5		Rundballe - ukjent	1
Slåttedato	1. slått: medio mai - medio juni	2	Firkantpresse	12	
	1. slått: medio juni - medio juli	13	Tid mellom pressing og pakking (N=20)	<1h	17
	1. slått: medio juli - medio aug.	1		Samme dag	3
	2. slått: medio juli - medio aug.	1	Ensileringsmiddel	Ja	1
	2. slått: medio aug. - medio sept.	4		Nei	20
Været etter slått (N = 20)	Sol	4	Antall lag plast oppgitt av produsent	8	4
	Regn	3		10	1
	Opphold/overskyet	13		12	4
Engalder	2	4	14	5	
	3	3	≥16	7	
	4	5	Kontrollert plast (N = 17)	Ja	7
	≥5	7		Nei	10
	Vet ikke	2	Farge på plast	Hvit	21
Gjødsling	Ja	20		Svart	0
	Nei	1	Plastbredde, mm (N =19)	500	4
Ugressbehandling (N = 19)	Ja	10		600	3
	Nei	9		750	12

Karakteristikk	Respons	Antall	Karakteristikk	Respons	Antall
Botanisk sammensetn.	Grasblanding u/kløver	9	Analyse av næringsinnhold	Ja	7
	Grasblanding m/kløver	9		Nei	14
	Kun timotei	3	Vedlagt	2	
	Slått + beite	2	Analyse av hygiene	Ja	2
Forekomst av ugras (N = 14)	Ja	11	Nei	19	
	Nei	3	Vedlagt	0	
Spor etter jordrotter (N = 19)	Ja	1	Hygienisk problem i partiet? (N = 19)	Ja	7
	Nei	18	Nei	12	
Ujevn mark (N = 20)	Ja	6	Lagring i høyden	Ett lag	4
	Nei	14	To lag	3	
Gammelt dødt gress (N = 19)	Ja	7	Tre lag	8	
	Nei	12	≥ fire lag	6	
Åpne områder u/ gress (N = 17)	Ja	0	Ballene lagres på (N = 17)	Gress	15
	Nei	17	Grus	2	
Bruk av enga året før	En slått	3	Ballene beskyttet m/ nett e.l	Ja	0
	To slåtter	13	Nei	21	
	3 slåtter eller 2 slåtter + beite	5	Ballene flyttet etter pakking?	Ja	10
Stengelbehandling (N = 18)	Ja	18	Nei	11	
	Nei	0			

4.2 Tørrstoff, pH, fermenteringsprodukter og næringsverdi

Tørrstoffinnholdet i fôrprøvene varierte fra 46 % til godt og vel 83 % (Tabell 8). Det var også betydelig variasjon i kjemisk sammensetning og næringsverdi. Propionsyre og maursyre ble ikke påvist i noen prøver, smørsyre bare i èn prøve. Innhold av butanediol (0,8-1,4 g/kg ts) ble funnet i seks prøver (resultat ikke vist).

Tabell 8: Tørrstoffinnhold, pH, fermenteringsprodukter og næringsverdi av norskproduert høyensilage. N =21.

Næringsstoff		Gj.snitt	Variasjonsbredde (min/max)
Tørrstoff (g/kg fôr):	Alle prøver	680	460 – 833
	Prøver fra kystklima	686	582 - 763
	Prøver fra innlandsklima	672	460 - 833
In vitro fordøyelighet (g/kg ts)		748	67,5 - 86,9
pH		5,5	4,5 - 6,0
Råprotein (g/kg ts)		103	7,2 – 14,0
Råtrevler (g/kg ts)		287	25,0 – 31,7
NDF (g/kg ts)		591	487,2 - 654,7
Aske (g/kg ts)		60,8	41,4 - 82,5
Melkesyre (g/kg ts)		1,11	0,4 - 3,1
Eddiksyre (g/kg ts)		0,28	0,1- 0,6
Etanol (g/kg ts)		0,46	0,1 - 1,1
MEh MJ/kg ts		9,50	8,4 - 11,3
FEh/kg ts		0,61	0,54 - 0,73

4.3 Forekomst av soppvekst

De vanligste slektene og artene som ble identifisert i denne studien var *Arthrinium* spp., *Penicillium roqueforti* og *Mucor circinelloides* (Tabell 9). Andre slekter og arter som ble identifisert var *Sordaria fimicola*, *Ascosphaera*, *Eurotium*, *Cladosporium cladosporioides*, *Ulocladium* og *Mucor hiemalis*.

Tabell 9: Soppfamilier og -arter isolert i de 21 høyensilageprøvene og antall prøver de ble isolert fra.

Slekt/art	Antall prøver
<i>Arthrinium</i> spp.	9
<i>Penicillium roqueforti</i>	7
<i>Mucor circinelloides</i>	5
<i>Sordaria fimicola</i>	4
<i>Ascosphaera</i>	3
<i>Eurotium</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2
<i>Ulocladium</i>	1
<i>Mucor hiemalis</i>	1

Resultater av kvantitative bestemmelser av mugg- og gjærforekomsten er vist i Tabell 10. Det ble påvist mugg i syv av 21 prøver (33 %), mens gjær ble påvist i alle prøvene.

Gjennomsnittlig muggtall for hele materialet (N=21, prøver uten påvist mugg satt til 0) og for kun de syv prøvene med påvist mugg var henholdsvis log 1,2 cfu/g og log 3,5 cfu/g. Det høyeste påviste muggtallet var log 4,6 cfu/g (resultat ikke vist). Gjennomsnittlig gjærtall var log 5,3 cfu/g.

Tabell 10: Mugg- og gjærtall i norskprodusert høyensilage. Gjennomsnitt samt standardavvik og prosentvis andel prøver med sopp for hele materialet (N=21) og for utelukkende prøver med påvist muggvekst (N=7).

Variabel	Alle prøver			Prøver med sopp			Andel prøver med sopp
	Antall	log cfu/g	St. av	Antall	log cfu/g	St. av	
Mugg	21	1,2	1,7	7	3,5	0,9	0,33
Gjær	21	5,3	1,2	21	5,3	1,2	1,00

4.4 Effekt av ulike produksjonsfaktorer på soppvekst

Effekt av de ulike produksjonsfaktorer på muggforekomst er vist i Tabell 11.

Av de undersøkte produksjonsfaktorene var det bare klima som ble funnet å ha en statistisk sikker effekt på muggtallet, idet det ble påvist mugg i 80 % av prøvene fra kystklima, men i bare 13 % av prøvene fra innlandet (p -verdi=0,005). Dette resulterte i gjennomsnittsverdier på log 2,9 cfu/g (kyst) versus log 0,5 cfu/g (innland). Videre ble det funnet høyere gjærtall i fôr fra førsteslått enn i fôr fra andreslått (Tabell 12). Det var også indikasjoner på at været under slått og i hvor mange høyder ballene hadde vært lagra (færre eller mer enn to lag) hadde hatt noen effekt på gjærtallet (p -verdier: respektive 0,063 og 0,096).

Med utgangspunkt i dette materialet kunne det altså ikke påvises signifikant effekt av hverken metode for strenglegging, tid til fortørking eller emballasjetetthet, til tross for at gjennomsnittstallene for mugg var omtrent dobbelt så høye ved breispredning vs. tradisjonell strenglegging, mer enn to dager fortørking vs. under to dager fortørking og med lav emballasjetetthet sammenlignet med høy tetthet.

Effekt av de ulike produksjonsfaktorer på muggforekomst er vist i Tabell 11.

Tabell 11: Effekt av ulike produksjonsfaktorer på muggvekst.

Produksjonsfaktorer	Alle gårder			Gårder med mugg			Andel gårder med muggvekst	χ^2	P-verdi ⁴
	Antall	log cfu/g	St. av	Antall	log cfu/g	St. av			
Antall plastlag¹									
6-10	6	1,7	2,0	3	3,3	1,3	0,50	1,05	0,613
12-18 ²	15	1,0	1,7	4	3,6	0,6	0,27		
Klima									
Kyst	6	2,9	1,7	5	3,5	1,0	0,80	9,45	0,005
Innlands	15	0,5	1,2	2	3,5	0,8	0,13		
Vær under fortørking									
Sol	4	1,2	2,3	1	4,6	.	0,25	0,66	0,823
Opphold	13	1,1	1,8	4	3,6	0,6	0,31		
Regn	4	1,3	1,6	2	2,6	0,9	0,50		
Fortørkingsmetode									
Strenglegging	9	0,7	1,5	2	3,1	1,5	0,22	0,88	0,640
Breispredning	12	1,5	1,9	5	3,6	0,7	0,42		
Lengde på fortørking									
1-2 døgn	3	0,7	1,2	1	2	.	0,33	0,00	1,000
3-5 døgn	18	1,2	1,8	6	3,7	0,6	0,33		
Presseutstyr³									
Rundballer	8	1,4	2	3	3,6	1,4	0,37	0,03	1,000
Firkantballer	12	1,1	1,7	4	3,4	0,5	0,33		
Presseutstyr (detaljert)³									
Fastkammer	5	1,8	2,4	2	4,4	0,3	0,40	0,07	1,000
Variabelkammer	3	0,7	1,2	1	2,0	.	0,33		
Firkantpresse	12	1,1	1,7	4	3,4	0,5	0,33		
Slåttenummer									
1.	15	1	1,8	4	3,7	1,2	0,27	1,05	0,613
2.	6	1,6	1,7	3	3,2	0,2	0,5		
Flytting etter pakking									
Ja	10	0,9	1,6	3	3,4	0,5	0,3	0,38	0,659
Nei	11	1,4	1,9	4	3,5	1,6	0,4		
Lagring i høyden									
1-2 lag	7	1,4	1,9	3	3,2	1,3	0,4	0,43	0,638
3-5 lag	14	1,1	1,7	4	3,7	0,5	0,3		

¹ Funnet ved kontrolltelling. ² En prøve inneholdt 11 lag, denne er inkludert i kategorien 12-18. ³ Flere av cellene inneholdt mindre enn 5 observasjoner og asymptotisk test kunne derfor ikke regnes som gyldig. Det er derfor rapportert p-verdi for "Exact test" som er gyldig under slike forhold. P<0,05 angir at den aktuelle produksjonsfaktoren er signifikant årsak til at det ble observert mugg på en ulik andel av gårdene.

Effekten av de ulike produksjonsfaktorer på gjærmengde i høyensilage er vist i Tabell 12. Det ble funnet signifikant mer gjær (log 5,6 cfu/g) på fôr fra 1. slått enn på fôr fra 2. slått (log 4,5 cfu/g) (p-verdi = 0,015). Det var en tendens til at været hadde hatt en effekt på gjærtallene i høyensilageprøvene (p=0,063), og det kan se ut som om sol og oppholdsvær under slått ga noe høyere gjærtall enn om det kom regn på gresset etter slått i denne studien (henholdsvis log 5,6 og 5,5 cfu/g for sol og oppholdsvær, mot log 4,2 cfu/g for regn). Det var også en antydning til tendens til mer gjær i baller lagret i 1-2 lag sammenlignet med baller lagret i 3-5 lag (p=0,096).

Tabell 12: Effekt av ulike produksjonsfaktorer på gjærmengde.

Produksjonsfaktor	Antall	log cfu/g	SE	P-verdi
Antall plastlag				
6-10	6	5,7	0,51	0,286
12-18 ²	15	5,1	0,36	
Klima				
Kyst	6	4,8	0,51	0,359
Innlands	15	5,4	0,36	
Vær under fortørking				
Sol	4	5,6	0,55	0,063
Opphold	13	5,5	0,33	
Regn	4	4,2	0,64	
Fortørkingsmetode				
Strenglegging	9	5,5	0,47	0,265
Breispredning	12	5,1	0,37	
Fortørkingslengde				
1-2 døgn	3	5,7	0,73	0,524
3-5 døgn	18	5,2	0,33	
Presseutstyr				
Rundballepresse	8	5,5	0,46	0,234
Firkantpresse	12	5,0	0,37	
Presseutstyr detalj.				
Fastkammer	5	5,7	0,61	0,308
Variabelkammer	3	5,1	0,71	
Firkantpresse	12	5,0	0,37	
Slåttenummer				
1.	15	5,6	0,30	0,015
2.	6	4,5	0,50	
Flytting etter pakking				
Ja	10	5,1	0,45	0,537
Nei	11	5,4	0,4	
Lagring i høyden				
1-2 lag	7	5,7	0,48	0,096
3-5 lag	14	5,0	0,34	

¹ Funnet ved kontrolltelling. ² En prøve inneholdt 11 lag, denne er inkludert i kategorien 12-18. ³

Gjennomsnittlig tetthet i ballenes plastemballasje ved ulike mengder plast, ulike plastbredde og overlapping er vist i Tabell 13. Det var en tendens til at ballene med 12-18 lag plast hadde en høyere tetthet enn ballene med 6-10 lag plast, henholdsvis 193,4 mot 80,5 sekunder ($p = 0,067$). Det var ingen signifikant effekt av plastbredde og overlapping på tettheten i ballene.

Tabell 13: Effekt av antall plastlag, plastbredde og overlapping på emballasjetetthet.

Variabel	N	Gj. snitt (sekunder)	Min. - Maks.	SE	p-verdi
Antall lag plast¹					
6-10	6	80,5	15 - 280	48,6	0,067
12-18 ²	13	193,4	50 - 494	31,8	
Plastbredde					
350 - 550 mm	9	167,1	40 - 494	43,5	0,817
550 - 650 mm	11	153,4	15 - 371	39,4	
Overlapping					
10 - 25 cm	10	173,2	40 - 494	41,3	0,387
25 - 40 cm	8	118,1	15 - 371	46,2	

¹v/kontrolltelling.

² En prøve hadde 11 lag, denne ble inkludert i kategorien 12-18 lag.

5.0 Diskusjon

Hovedmålet med oppgaven var å belyse temaet hygienisk kvalitet i høyensilage, gjennom å bidra til en kartlegging av soppfloraen i høyensilage produsert i Norge, samt å se på årsak/virkning forholdet mellom ulike produksjonsfaktorer, og soppvekst i denne typen fôr. På en del av spørsmålene i denne undersøkelsen, om alt fra værforhold til registrering av hygieniske problem i partiet, var det problemer med upresise svar. Intervjuene foregikk nesten et år etter produksjon og det var for mange vanskelig å huske detaljer fra fjoråret. Ved sammenstilling av svarene var det derfor nødvendig å gjøre en del subjektive vurderinger og det er i flere tilfeller slått sammen opprinnelige svarkategorier til videre kategorier for å få flere svar per kategori og slik kunne bruke svarene i statistisk analyse. Dette kan ha påvirket korrektheten i resultatene.

Generelt var det et lavt innhold av gjæringsprodukter i alle prøvene. Dette var som forventet siden fôr med høyere tørrstoffinnhold får en mer restriktiv gjæring (Müller 2005). Gjennomsnittlig pH var 5,5, noe som også er vanlig så tørt fôr (Müller 2005; Weissbach 1996). Gjennomsnittlig energiinnhold i fôrprøvene var 0,61 FEh/kg ts og flertallet av prøvene faller dermed inn under grovfôrklassifiseringens H1 kvalitet til hest (Eurofins 2010), som betyr at fôret har høyt innhold av energi. Variasjonen i tørrstoffinnholdet var ganske stor, fra 46 til over 83 % (Tabell 8).

5.1 Forekomst av soppvekst

De vanligste slektene og artene som ble identifisert i denne studien var *Arthrinium* spp., *Penicillium roqueforti* og *Mucor circinelloides*. Funnet av *Penicillium roquefortii* var som forventet, da denne muggsoppen ifølge litteraturen er den klart vanligste muggsoppen i surfôr av varierende tørrstoff (Auerbach et al. 1998; Nout et al. 1993; O'Brien et al. 2005; O'Brien et al. 2008; Seguin et al. 2010; Skaar 1996). Denne muggsoppen er en potent mykotoksinprodusent, og i en studie av synlig muggkontaminert surfôr viste 21 av 24 prøver forekomst av *Penicillium*-mykotoksinet roquefortine C (Auerbach et al. 1998), som er et kjent nervetoksin. Funnet av *Arthrinium* spp. er interessant, ettersom slike funn ikke er rapportert i noe av den litteraturen som er gjennomgått. Denne muggsoppslekta kan produsere mykotoksinene 3-nitropropionic acid (NPA) og terpestacin og kan forårsake infeksjon hos mennesker (Rai 1989). *Mucor circinelloides*, som også forkom i flere av prøvene i denne

studien, er en relativt vanlig muggslekt i surfôr (Auerbach et al. 1998; Müller et al. 2011; Nout et al. 1993). Den er imidlertid ikke en kjent mykotoksinprodusent. *Sordaria fimicola*, en annen av artene identifisert i denne studien, er heller ikke så vanlig i analyser av soppflora i surfôr, men den er nært beslektet med *Neurospora* spp., som er identifisert i våtere surfôr av sukkerbeter (Nout et al. 1993). Også (Müller et al. 2011) påviste *Sordaria* spp. i prøver av høyensilage samlet inn fra svenske gårder/staller. *Eurotium* ble isolert i tre av høyensilageprøvene i denne studien. Den er tidligere identifisert i ensilage (Müller et al. 2011; Seguin et al. 2010). Slekten *Cladosporium*, som er identifisert i prøver av surfôr av lucerne (Keller et al. 1998), og i prøver av høyensilage fra Sverige (Müller et al. 2011), ble isolert i to av de 21 prøvene i denne studien, her representert ved arten *C. cladosporioides*. Slektene *Ascosphaera* og *Ulocladium*, som ble identifisert i henholdsvis 3 og 1 prøve, ble heller ikke funnet i litteraturen som er gjennomgått og er således interessante funn.

Gjennomsnittlig innhold av muggsopp er under øvre grenseverdi for hva som regnes for akseptert hygienisk kvalitet på høyensilage til hest (Eurofins 2011a). Kun én enkeltprøve oversteg denne grensen (resultater ikke vist). Høyere muggtall enn log 5 cfu/g regnes som farlig for dyrs helse, på grunn av en antatt økt fare for mykotoksinproduksjon ((Gedek 1974), sitert i (Keller et al. 1998)). Overført til et større tallmateriale vil disse resultatene, ut ifra en slik vurdering opp mot grenseverdier, indikere at den hygieniske kvaliteten på norsk høyensilage er akseptabelt god. Resultatene i denne studien er imidlertid basert på et lite tallmateriale, og en større studie, som omfatter betydelig flere prøveuttak fra hele landet, og over flere sesonger, vil være nødvendig for å få et mer fullstendig bilde på muggforekomsten i høyensilage i Norge. Gjennomsnittlig gjærtall var log 5,3 cfu/g. Dette er noe høyt, og i grenseland for hva som ansees som akseptabel hygienisk kvalitet (Eurofins 2011a; Kamphues 2005). Fôr med såpass høye gjærverdier kan ha en lavere aerob stabilitet (Jonsson 1989), og dette er spesielt ugunstig når det gjelder hestefôr fordi det ofte er få hester på hvert sted og det kan ta lang tid å bruke opp en balle. Fôr med lang holdbarhet etter åpning er derfor ønskelig.

Denne studien bekrefter at flere av artene som blir identifisert i høyensilage i Norge, er potensielle mykotoksinprodusenter. På bakgrunn av dette er det viktig å finne frem til produksjonstiltak som minsker vekst av muggsopp i høyensilage og dermed unngå en eventuell produksjon av mykotoksiner. Det kan være lurt å ta en hygieneanalyse av fôret for

å vite mer om den hygieniske tilstanden før utfôring. Utfordringen med slike analyser er at det er vanskelig å ta ut representative prøver av grovfôr, og man må i tillegg åpne flere baller, noe som kan føre til mye kassering ettersom det kan gå varmgang i fôret før man rekker å bruke det opp. Det er også tidkrevende og dyrt å sende inn prøver som må dyrkes frem og identifiseres.

5.2 Effekt av ulike produksjonsfaktorer på soppvekst

Resultatene som viser effekten av de ulike produksjonsfaktorene på forekomsten av muggsopp er presentert i Effekt av de ulike produksjonsfaktorer på muggforekomst er vist i Tabell 11.

Tabell 11. Det er imidlertid kun presentert de faktorene det var mulig å undersøke statistisk ut i fra besvarelsene i spørreundersøkelsen. Datamaterialet i denne studien var i utgangspunktet lite. Dette kan være problematisk med tanke på å vise statistisk sikre forskjeller. I noen tilfeller var den numeriske forskjellen mellom to eller flere sammenligningsgrupper så stor at det er sannsynlig at tilsvarende forskjeller i et større materiale ville vært signifikant. Jeg har derfor valgt å kommentere noen av resultatene som ikke er signifikant forskjellige.

I undersøkelsen ble det påvist signifikant hyppigere forekomst av muggsopp i fôrprøver fra kystklima sammenlignet med innlandsklima (p -verdi = 0,005. Kystklima (varm-temperert sone) kjennetegnes generelt av mer nedbør/høyere luftfuktighet og varmere vintre enn innlandsklima (kald-temperert sone) (*Meteorologisk Institutt* 2012). Begge deler kan ha bidratt til fremvekst av muggsopp. (Randby 1996a) påviste f.eks. at lagring av surfôr ved 20 °C gav en signifikant økning i overflatemugg sammenlignet med lagring ved 5 °C, mens O'Brien et al. (2008) fant mindre synlig muggvekst på fôr som var høstet i tørt vær sammenlignet med fôr som var høstet i fuktig vær. I denne studien, var det av de gårdene som hadde fått regn på gresset under fortørking, 50 % som hadde muggvekst, mot 25 og 31 % av de gårdene som hadde henholdsvis sol og opphold under fortørking Tabell 11. Dette kunne tyde på at også denne studien viste at det var større sannsynlighet for å få mugg i fôret om man får regn på gresset etter slått. Når det regner øker det både risikoen for sølevannsprut og jordinnblanding, og gir også fuktighet til gresset som igjen kan gi grunnlag

for muggvekst. Det ble registrert en tendens til høyere gjærtall når man hadde sol og opphold under fortørkingen kontra regn ($p = 0,063$) (Tabell 12). Gjærsopp tåler tørrere forhold enn muggsopp (Davenport 1980) og kan således kanskje favoriseres av tørrere vær. Det var, på grunn av at så få prøver inneholdt muggsopp, ikke mulig å påvise forskjeller i muggtall ved de ulike produksjonsfaktorene, men dette kunne vært interessant å undersøke i et større datamateriale.

Det er tidligere vist at langtidslagring ved høye temperaturer øker forekomsten av mugg (Randby 1996a). Høye temperaturer gjør porene i plasten mer åpne og dermed mer utsatt for luftgjennomtrengelighet. Det kunne derfor forventes å finne en høyere muggforekomst i prøvene av førsteslåttten enn andreslåttten i og med at førsteslåttten må lagres gjennom en varm sommer. Dette kunne imidlertid ikke påvises i denne studien. Det ble derimot funnet høyere gjennomsnittlige gjærtall i 1. slåttten, $\log 5,6$ cfu/g, mot $\log 4,5$ cfu/g i 2. slåttten (Tabell 12). Dette er ikke så lett å forklare, men siden gjærtall kan øke med økt utviklingstrinn (Muller 2009) og høstetidspunktet innen de to slåtttekategoriene varierte veldig kan det tenkes at flere av prøvene i førsteslåttten var høstet på et senere utviklingstrinn enn prøvene i andreslåttten, og at dette muligens har hatt en innvirkning på gjærtallene. Slåttedatoene som ble oppgitt i spørreskjemaet var imidlertid så usikre og varierende at de ikke lot seg kategoriseres.

Tidligere er det funnet at lagring i 1-2 lag gir mindre overflatemugg enn lagring i 3 eller flere høyder (O'Brien et al. 2008), men heller ikke dette kunne bekreftes i denne studien. Det kan tenkes at når ballene får press fra flere sider, som de vil få når det legges flere lag over hverandre, vil dette bidra til å gi svakheter i klebeevnen til plasten på flere steder og at det derfor kan være lurt å ikke lagre ballene i unødvendig mange lag. På den annen side vil man, ved å lagre i høyden, minske faren for jordrotteangrep i bunnen på flere av ballene. Det er sannsynlig at TS-nivået på ballene er av stor betydning for om de tar skade av å stables i høyden. Er ballene tørre og kompakte vil de ikke påvirkes av tung vekt oppå, mens fuktige eller svakt pressa baller kan ødelegges fullstendig i formen ved stabling i høyden. Denne undersøkelsen omfattet tørre baller, mens studien til O'Brien (2008) omfattet rundballer med gjennomsnittlig tørrstoffinnhold på 321 g/kg, og dette kan således ha gitt større utslag.

Besvarelsene koblet sammen med de mikrobiologiske analysene, viste at 50 % av prøvene fra gårder som hadde brukt lite plast (6-10 lag) hadde mugg i fôret, mot 27 % av prøvene fra gårdene som hadde brukt mye plast (12-16 lag). Selv om dette datamaterialet var for lite til å påvise signifikante forskjeller, gir det indikasjoner på at det er større sannsynlighet for å få muggvekst ved bruk av lite plast. Dette understøttes også av litteraturen (Borreani & Tabacco 2008; Keller et al. 1998).

I motsetning til O'Brien et al. (2008) sin studie fra Irland, kunne det i denne studien ikke påvises effekt av lengden på fortørkingstida og forekomst av mugg. Dette kan skyldes at intervjuobjektene i denne studien ikke har gitt nøyaktige nok svar (de ble spurt nesten ett år etter at fôret var produsert), og at effekten av mugg ved økt lengde på fortørkingen avtar når fortørkingen er lengre enn 1 døgn. Skaar (1996) viste imidlertid at en fortørking over 48 timer ga lavere muggtall, men hun poengterer at det var et lite antall prøver i studien. Den samme forklaringen kan også gjelde gjærsopp, der det heller ikke kunne påvises en sammenheng med lengden på tiden gresset lå til fortørking. Jonsson (1989) og McEniry et al. (2007) har tidligere påvist en slik sammenheng. Økt lengde på fortørkingen kan være en sammenblanding av to effekter: (1) At det gir økt tørrstoffinnhold (som kan påvirke muggmengden) og (2) at det kan være en effekt av dårlig vær under fortørkingen slik at man må tørke fôret lengre. En bør derfor ha mer opplysninger, og splitte opp materialet, for å finne ut av dette, men mitt materiale var for lite til å undersøke dette nærmere.

Resultatene peker videre i retning av at risikoen for å få fremvekst av mugg i fôret er større når det benyttes breispredning enn tradisjonell strenglegging ved slått. Det er ikke registrert tilsvarende funn i litteraturen. I utgangspunktet er minst mulig kjøring oppi fôret å anbefale for dermed å minske jordinnblanding og slik unngå forurensing av plantematerialet. En annen mulig forklaring på effekten av breispredning, kan også være at fôret fra gårdene som benyttet breispredning hadde høyere tørrstoffinnhold enn fôret som var strenglagt, og at det dermed slik påvirket muggforekomsten. Fôr med høyere tørrstoffinnhold kan gi høyere muggforekomst (O'Brien et al. 2008; Seguin et al. 2010). Gjennomsnittlig tørrstoffinnhold i prøvene fra gårder som hadde benyttet strenglegging og breispredning var henholdsvis 638 g/kg ts (variasjon 460 – 759 g/kg ts) og 705 g/kg ts (variasjon 582 – 833) (resultater ikke vist), men disse ble ikke testet om var signifikant forskjellig på grunn av tidsmangel, og det var derfor ikke mulig å gjøre sikre antagelser her.

Det kunne forventes å finne en høyere forekomst av mugg i fôr som var produsert ved bruk av fastkammer ettersom disse ikke regnes for å pakke fôret like jevnt og tett som variabelkammerpresser (Mo 2005). Det vil være mer luft tilgjengelig i ballene og dermed ta lengre tid før lufta blir brukt opp (den aerobe fasen). Muggsopp kan dermed utvikles. Selv om resultatene pekte i den retningen var datamaterialet også her for lite til å trekke noen konklusjoner.

Gjennomsnittlig tetthet i ballenes plastemballasje ved bruk av ulike mengder plast er vist i Tabell 13. Det var en tendens til at ballene med 12-18 lag plast hadde en høyere tetthet enn ballene med 6-10 lag plast, henholdsvis 193,4 mot 80,5 sekunder ($p = 0,067$). En tetthet på 80,5 sekunder samsvarer med verdier for emballasjetetthet for 10 lag plast funnet av andre (Müller 2002). Det var generelt store variasjoner i tetthetsmålingene, og dette kan forklares med at det var noen vanskeligheter med utstyret under selve målearbeidet. Det ble funnet mugg i 56 % av prøvene der emballasjetettheten var under 100 sekunder, mens det ble funnet mugg i 18 % av prøvene der emballasjetettheten var målt til over 100 sekunder (Tabell 11). Resultatene kan tyde på at det blir hyppigere muggvekst i baller med lav emballasjetetthet, og det er et sannsynlig og forventa resultat, selv om forskjellen ikke var signifikant.

Det norske datamaterialet vil bli slått sammen med det svenske (som er betydelig større). Det vil (forhåpentligvis) gi flere sikre svar når det gjelder å påvise sammenhenger mellom produksjonsforhold og forekomst av sopp.

6.0 Konklusjon

- *Arthrinium* spp., *Penicillium roqueforti* og *Mucor circinelloides* var de hyppigst forekommende soppene i de analyserte prøvene av norsk høyensilasje.
- Det ble funnet *Ascosphaera* og *Ulocladium*, to slekter som ikke tidligere er kjent påvist i høyensilasje
- Toksinproduserende sopper var hyppig forekommende, og *Penicillium roqueforti* var den mest frekvente av disse
- Fuktig og mildt kystklima kan synes å øke risikoen for framvekst av sopp, sammenligna med tørrere og kjøligere (vinter)klima i innlandet, og det ble funnet mer gjærsopp i fôr fra førsteslått enn i fôr fra andreslått
- Det kunne ikke påvises at andre produksjonsfaktorer hadde innvirkning på den hygieniske kvaliteten med utgangspunkt i dette materialet.
- Muggtallene var generelt lave og innenfor det som ansees som akseptert hygienisk kvalitet på norsk høyensilage
- Undersøkelsen er basert på et svært begrenset utvalg med prøver. Det kan ikke trekkes endelige konklusjoner før materialet blir holdt sammen med tilsvarende, og mer omfattende undersøkelser i Sverige.

Det er imidlertid ikke alltid like vanlig eller lett i praksis å dokumentere mengder av sopp og hvilke arter som finnes i fôret. En bedømming av den hygieniske kvaliteten vil ofte i praksis til slutt bero på ens egen subjektive vurdering og generelt bør man kassere alt fôr med muggvekst.

Referanser

- AOAC. (1990). *Metode nr.: 962.09 Råtrevler In: Official Method of Analysis*. 15 utg., b. 15. Virginia: Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Auerbach, H., Oldenburg, E. & Weissbach, F. (1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (4): 565-572.
- Aurich, J. E. e. a. (2006). Effects of mycotoxins on reproductive function in mares. *Animal Reproduction Science*, 94 (1-4): 238-241.
- Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P. E., Loes, A. K. & Kristoffersen, A. B. (2012). Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food additives and contaminants part A-Chemistry analysis control exposure & Risk Assessment*, 29 (7): 1129-40.
- Borreani, G. & Tabacco, E. (2008). New Oxygen Barrier Stretch Film Enhances Quality og Alfalfa Wrapped Silage. *Agronomy Journal*, 100 (4): 942-948.
- Buckley, T., Creighton, A. & Fogarty, U. (2007). Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins. *Irish Veterinary Journal*, 60 (4): 231-236.
- Christensen, E. & Skaar, I. (2008). Sopp og sopptoksiner i halm og fôr - en helseisriko for dyr og mennesker. *Praksisnytt*, 13 (3): 52-55.
- Davenport, R. R. (red.). (1980). *An introduction to yeasts and yeast-like organisms*. Biology and activities of yeasts, The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 9. London: Academic Press. 1-27 s.
- Eurofins. (2010). *Analyse av næringsinnholdet i grovfôr til hest*. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/media/1873226/N%C3%A6ringsinnhold%20Grovf%C3%B4r.pdf> (lest 16.04.2012).
- Eurofins. (2011a). *Hygienisk kvalitet på grovfôr til hest*. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/media/1978320/Hygienisk%20Kvalitet%20grovf%C3%B4r.pdf> (lest 16.03.2012).
- Eurofins. (2011b). *Hygienisk kvalitet på grovfôr til hest*. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/media/1978320/Hygienisk%20Kvalitet%20grovf%C3%B4r.pdf> (lest 15.02.2012).
- Eurofins. (2011c). *Hygienisk kvalitet på grovfôr til hest*. Tilgjengelig fra: <http://www.eurofins.no/media/1978320/Hygienisk%20Kvalitet%20grovf%C3%B4r.pdf> (lest 04.04.2012).
- Farstad, M. & Vik, J. (2012). Hest, hestehold og fôring: Status for hesteholdet i Norge - kommentert frekvensrapport. *Rapport nr. 2/2012 Norsk senter for bygdeforskning*. Trondheim.
- Figueredo, L. A., Cafarchia, C. & Otranto, D. (2011). *Geotrichum candidum* as etiological agent of horse dermatomycosis. *Veterinary Microbiology*, 148 (2-4): 368-371.
- FOR-2005-06-02-505. (2005). *Forskrift om velferd for hest*. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdatab.no/for/sf/ld/ld-20050602-0505.html>.
- Fôrtabellen. (2008). Tilgjengelig fra: <http://statisk.umb.no/iha/fortabell/index.php> (lest 17.01.2012).
- Gareis, M. (1993). *Fusarium mycotoxins in animal feeds and effect on livestock*. I: Scudamore, K. A. (red.). *Proceedings of the UK workshop on Occurrence and Significance of Mycotoxins*. Berkshire. 7-15 s.
- Gedek, B. (1974). Possibilities and limitations of microbiological animal feed control. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, 81 (2): 37-40.
- Hanche-Olsen, S., Teige, J., Skaar, I. & Ihler, C. F. (2008). Polyneuropathy associated with forage sources in Norwegian horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22 (1): 178-184.
- Hägglom, P. (1990). Isolation of Roquefortine C from Feed Grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (9): 2924-2926.

- ISO6496. 6496; *Animal feeding stuffs - Determination of moisture and other volatile matter content.*
- Jarvis, B., Seiler, D. A. L., Ould, A. J. L. & Williams, A. P. (1983). Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. *Journal of Applied Bacteriology*, 55 (2): 325-336.
- Johansen, A., Synnes, O. M. & Bakken, A. K. (2010). Hygienisk kvalitet i fortørka surfôr fra breispredd versis strenglagt gras. *Bioforsk FOKUS*, 5 (2): 162-163.
- Jonsson, A. (1989). *The role of Yeasts and Clostridia in Silage Deterioration*. Report 42. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology.
- Jonsson, A., Lindberg, H., Sundås, S., Lingvall, P. & Lindgren, S. (1990). Effect of additives on the quality of big-bale silage. *Animal Feed Science and Technology*, 31 (1-2): 139-155.
- Kamphues, J. (1996). Risks of feedstuffs loaded by mites, moulds, bacteria and/or toxins in horses. *Pferdeheilkunde*, 12 (3): 326-332.
- Kamphues, J. (2005). A systematic approach to evaluate the hygienic quality of feedstuffs for horses. *Pferdeheilkunde*, 21: 15-18.
- Keller, T. H., Nonn, H. & Jeroch, H. (1998). The effect of sealing and additives on the fermentation characteristics and mold and yeast counts in stretch film wrapped big-bale lucerne silage. *Archives of Animal Nutrition*, 51: 63-75.
- Kjus, O., Mo, M. & Tuttoren, G. (1996). Ensilering av gras i storballer - ulike presser og innpakkingsmåter. *Rapport nr. 20*: Det Kgl. Selskap for Norges Vel.
- Lepage, O. M., Perron, M. F. & Cadore, J. L. (2004). The mystery of fungal infection in the guttural pouches. *The Veterinary Journal*, 168 (1): 60-64.
- Lepom, P., Baath, H. & Knabe, O. (1988). Occurrence of Fusarium species and their mycotoxins in maize. 3. The influence of silaging on the zearalenone content in CCM maize. *Archives of Animal Nutrition*, 38: 817-823.
- Lin, C., Bolsen, K. K., Brent, B. E., Hart, R. A., Dickerson, J. T., Feyerherm, A. M. & Aimutis, W. R. (1992). Epiphytic Microflora on Alfalfa and Whole-Plant Corn. *Journal of Dairy Science*, 75 (9): 2484-2493.
- Lindgren, E. (1979 (corr. 1983)). Vallfodrets näringsvärde bestämt in vivo och med olika laboriemetoder (Forage analysis-method descriptions for sampling and analysis). Report 45. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. Research Information Centre, Department of Animal Nutrition and Management.
- Lindgren, S., Pettersson, K., Kaspersson, A., Jonsson, A. & Lingvall, P. (1985). Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36 (9): 765-774.
- Martin-Rosset, W., Vermorel, M., Doreau, M., Tisserand, J. L. & Andrieu, J. (1994). The French horse feed evaluation systems and recommended allowances for energy and protein. *Livestock Production Science*, 40 (1): 37-56.
- Martin, B. B., Reef, V. B., Parente, E. J. & Sage, A. D. (2000). Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216 (4): 554-558.
- McDonald, P., Henderson, A. R. & MacGregor, A. W. (1968). Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19: 125-132.
- McDonald, P. (1991). *The biochemistry of silage*. 2. utg. Marlow: Chalcombe Publications.
- McEniry, J., O'Kiely, P., Clipson, N. J. W., Forristal, P. D. & Doyle, E. M. (2007). The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. *Grass and Forage Science*, 62 (4): 470-484.
- McGorum, B. C., Dixon, P. M. & Halliwell, R. E. W. (1993). Responses of horses affected with Chronic Obstructive Pulmonary-disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Veterinary Journal*, 25 (4): 261-267.
- The Merck Veterinary Manual*. (2011). Recurrent Airway Obstruction. Tilgjengelig fra: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/121310.htm> (lest 20.03.2012).

- Meteorologisk Institutt*. (2012). Metlex - Köppens klimaklassifisering. Tilgjengelig fra: [http://metlex.met.no/wiki/K%C3%B6ppens klimaklassifisering#Klimasoner](http://metlex.met.no/wiki/K%C3%B6ppens_klimaklassifisering#Klimasoner).
- Minervini, F., Lacalandra, G. M., Filannino, A., Nicassio, M., Visconti, A. & Dell'Aquila, M. E. (2010). Effects of in vitro exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73 (3): 392-403.
- Mo, M. (2005). *Surfôrboka*. Oslo: Landbruksforlaget.
- Moreau, C. (1979). *Molds, toxins and food*. 2nd ed. utg. Chichester: John Wiley and sons.
- Muck, R. E., Pitt, R. E. & Leibensperger, R. Y. (1991). A model of aerobic fungal growth in silage. 1. Microbial characteristics. *Grass and Forage Science*, 46 (3): 283-299.
- Muller, C. E. (2009). Influence of harvest date of primary growth on microbial flora of grass herbage and haylage, and on fermentation and aerobic stability of haylage conserved in laboratory silos. *Grass and Forage Science*, 64 (3): 328-338.
- Müller, C. (2002). Small bale silage for horses. *Rapport 254*. Uppsala: Sveriges Landbruksuniversitet. Institutionen för husdjurens utfodring og vård.
- Müller, C. E. (2005). Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as a feed for horses. *Grass and Forage Science*, 60 (2): 109-118.
- Müller, C. E., von Rosen, D. & Udén, P. (2008). Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. *Livestock Science*, 119 (1-3): 116-128.
- Müller, C. E., Hulten, C. & Gröndahl, G. (2011). Assessment of hygienic quality of haylage fed to healthy horses. *Grass and Forage Science*, 66 (4): 453-463.
- Nofima. (2012). *Måling av vannaktivitet*. Tilgjengelig fra: <http://www.nofima.no/filearchive/vannaktivitet.pdf> (lest 04.04.2012).
- NorFor, N. F. E. S. & Volden, H. (2011). *NorFor: the Nordic feed evaluation system*. EAAP publication, b. No. 130. Aas ; Wageningen: Wageningen Academic Publishers. 180 s.
- Norges Bondelag*. (2007). Innstilling fra hestepolitisk utvalg
- Tilgjengelig fra: <http://www.bondelaget.no/getfile.php/Dokumenter/N%C3%A6ringsutvikling/hesterapport/ele%5B1%5D.pdf> (lest 26.03.2012).
- Nout, M. J. R., Bouwmeester, H. M., Haaksma, J. & Vandijk, H. (1993). Fungal growth in silages of sugar-beet press pulp and maize. *Journal of Agricultural Science*, 121: 323-326.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P. D. & Fuller, H. T. (2005). Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *Fems Microbiology Letters*, 247 (2): 131-135.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P. D. & Fuller, H. T. (2008). Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: predominant mould and yeast species and features of bales and silage. *Grass and Forage Science*, 63 (1): 121-137.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H. & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of Ensiling. I: Buxton (red.) *Silage Science and Technology*, s. 31-93. Madison: The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America
- Paillat, J.-M. & Gaillard, F. (2001). Air-tightness of wrapped bales and resistance of polythene stretch film under tropical and temperate conditions. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 79: 15-22.
- Pelhate, J. (1977). Maize Silage: Incidence of moulds occurring during conservation. *Folia Vet. Latina*, 7 (1): 1-16.
- Pier, A. C., Richard, J. L. & Cysewski, S. J. (1980). Implications of mycotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Assoc*, 176 (8): 719-24.
- Planck, C., Lindberg, J. E., Rundgren, M., Ronèus, M., Lundström, B. A., Åhäll, P. G., Larsson, L. H. & Leander, B. (2001). *The Horse – Nutrient Need and Feedstuffs. Report 1, 4th edn*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Equine Studies.

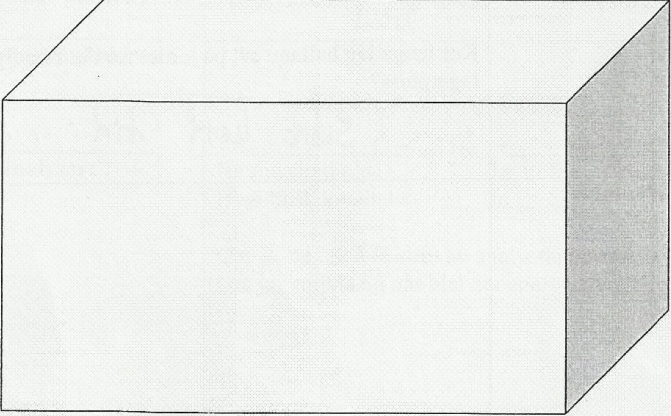
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Mikrobiology and Microbial disease; General features of fungi associated with disease in animals*. Oxford: Blackwell Science.
- Rai, M. K. (1989). Mycosis in Man Due to *Arthrrium phaeospermum* var. *indicum*. First Case Report: Mykose durch *Arthrrium phaeospermum* var. *indicum* beim Menschen. Erstbericht. *Mycoses*, 32 (9): 472-475.
- Randby, Å. T. (1996a). *Fermentation quality and moulding of round-bale silage*. Grassland Science in Europe Vol.1. 569-573 s.
- Randby, Å. T. (1996b). *Moulding and Aerobic stability of Round-bale Grass Silage Treated with Formic or Propionic acid*. 11th International Silage Conference, Aberystwyth, Wales.
- Randby, Å. T. & Fyri, T. (2004). Transport av plastpakkede rundballer. *Norges Vels rapport nr. 4*. Sjetten. 24 s.
- Randby, Å. T. (2010). Fuglehakk på rundballer – gir det listeriose hos småfe? *Buskap*, 5.
- Robinson, N. E. (2001). Recurrent Airway Obstruction (Heaves). I: Lekeux, P. (red.) *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J. C., Pernet, D., Laplante, J. J., Millon, L. & Piarroux, R. (2005). Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: A case-control study. *Mycopathologia*, 160 (4): 273-279.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O. & Frisvad, J. (2000). *Introduction to food- and airborne fungi*. 6 utg. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures.
- SAS 9.2. (2010). Statistical Analysis System. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Scudamore, K. A. & Livesey, C. T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (1): 1-17.
- Seguin, V., Lemauviel-Lavenant, S., Garon, D., Bouchart, V., Gallard, Y., Blanchet, B., Diquelou, S., Personeni, E., Gauduchon, P. & Ourry, A. (2010). An evaluation of the hygienic quality in single-species hays and commercial forages used in equine nutrition. *Grass and Forage Science*, 65 (3): 304-317.
- Skaar, I. (1996). *Mycological survey and characterisation of the mycobiota of big bale grass silage in Norway*. Thesis for the degree of Doctor Scientiarum. Oslo: Norwegian College of Veterinary Medicine.
- Spörndly, R., Knicky, M., Pauly, T. & Lingvall, P. (2008). *Quality and economics of pre-wilted silage made by wide-spreading or by swathing*. Biodiversity and animal Feed. Future Challenges for Grassland Production, Uppsala: European Grassland Federation.
- Stirling, A. C. & Whittenbury, R. (1963). Sources of lactic acid bacteria occurring in silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 26 (1): 86-90.
- Synnes, O. M., Bakken, A. K. & Johansen, A. (2010). Tørkefart i smal og brei streng. Konsekvensar for gjæringskvalitet og næringsverdi på surfôret. *Bioforsk FOKUS*, 5 (2): 160-161.
- Vandenput, S., Istasse, L., Nicks, B. & Lekeux, P. (1997). Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Veterinary Quarterly*, 19 (4): 154-158.
- Weissbach, F. (red.). (1996). *New developments in crop conservation*. Proceedings of the 11 th. International Silage Conference, UK, 8th-11th September 1996. Aberystwyth: IGER. 11-25 s.
- Wichert, B., Nater, S., Wittenbrink, M. M., Wolf, P., Meyer, K. & Wanner, M. (2008). Judgement of hygienic quality of roughage in horse stables in Switzerland. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92 (4): 432-437.
- Wilkinson, J. M. (1999). Silage and animal health. *Natural Toxins*, 7 (6): 221-232.
- Wilsher, S., Allen, W. R. & Wood, J. L. N. (2006). Factors associated with failure of Thoroughbred horses to train and race. *Equine Veterinary Journal*, 38 (2): 113-118.

Vedlegg 1: Skjema for overflateinspeksjon (eksemplar for firkantballer)

Mögelförekomst i hösilage C. Müller

Gårdens namn: Datum:
Täthet:
Plastbredd:
Överlappning:

Markera plastskador med kryss.
Markera synlig svamptillväxt så likt som möjligt, ange nummer (samma som på foto och provrör).



Botten: Gavelsida:

Baksida:

Vedlegg 2: Protokoll for åpning og prøvetaking av baller

Protokoll for balöppning och provtagning av balar på gårdar

1. Välj ut en bal från det parti som håller på att utfodras, välj en som ser hel ut och inte har mycket avvikande balform eller synliga skador.
2. Mät tätheten på balen med ventil, pump och manometer. Anteckna tiden det tar från -20 till -15 mm vp.
3. Mät bredden på några plastlager på balen, och dra försiktigt isär några lager så att du ser överlappningen. Mät överlappningen. Anteckna värdena i protokoll.
4. Skär ut en ruta ur plasten (medan den fortfarande är runt balen) på ca 10x10 cm från balens mantelyta, ej från gaveln. Lägg plastprovet i en märkt påse och knyt till. Detta används sedan för att räkna antalet plastlager.
5. Öppna balen och ta bort plasten helt. Inspektera plasten noga och leta efter skador, stickhål mm på insida och utsida. Markera i protokollet var ev. skador funnits.
6. Inspektera balen noga och markera i protokollet var ev. synlig svamptillväxt finns och hur stor yta. Numrera synlig svamptillväxt, och fotografera. Rör inte vid balen eller kolonierna ännu.
7. Ta prov från synlig svamptillväxt med steril bomullspinne som läggs i märkt provrör. Ta prov på alla synliga kolonier som ser olika ut. Märk alla provrör med samma nummer som kolonin märkts med vid fotograferingen.
8. Ta prov på balen och från två balar till av samma parti med hjälp av ensilageborr (flamberad och avkyld). Borra från 8 olika ställen på balens mantelyta, jämnt fördelade runt balen och i höjddled så att provet blir representativt för balen - det skall vara ett prov per gård märkt med gårdens namn.

Prov: 8 borrhärnor per bal från 3 balar (totalt 24 borrhärnor) blir förmodligen över 1.5 kg. Behåll ca 700 g i samma påse (resterande del tas och kasseras med steril tång som är flamberad och avkyld) skriv KEM på påsen. Från denna påse ta ut minst 150 g (upp till 200 g) till MIKRO med steril tång och lägg i liten påse med ziplås (detta material används till mikrobiologisk analys (50 g), molekylär analys - 454 sekvensering (50 g) och mykotoxinanalys (50 g?).

KEM
24 borrhärnor
från 3 balar
ca 500 g

MIKRO
150 g (upp
till 200 g)

9. Intervjua gårdens/balarnas ägare och fyll i frågeformuläret.

10. Alla prov förvaras i kylväska tills de skickas till Kungsängen. Förpacka

Paket Kem: Foderprov (över 500 g) i vadderat kuvert.

Paket Mikro: Lägg först i aluminiumfolie och därefter 3 kylklampar (alternativt 2 ifall det är trångt). Foderprov (150 g), synliga koloniprov och ifyllt frågeformulär från samma gård i en större påse och märk den mikro.

Skicka paketet innan klockan 18.00 till: Cecilia Müller/Laboratoriet, Kungsängens forskningscentrum, 75323 Uppsala. Paketet skall vara framme senast 09.00 dagen efter. Om det är plusgrader ute läggs även några kylklampar i paketet.

Om problem uppstår:

Cecilia 0706-609194 (018-672993)

Rolf 070-5672189 (018-671992)

Jessica 070-7755457

Täthetsmätning - ventiler, manometer, pump

Tumstock/måttband

Kniv, sax

Plastpåsar, mindre och större

Rutnät för uppskattning av ytmögel i % av balytan

Märkpenner

Kamera plus laddare

"Skyltar" för numrering av synlig svamptillväxt

Balöppningsprotokoll, frågeformulär

Sterila bomullspinnar i provrör

(Stomacherpåsar)

Buntband

DeWalt borrmaskin, batterier, batteriladdare

Borr, stöt, ställ för stöt

Etanol, tändare

Kylklampar

Kylväskor

Brev att skicka proverna i (porto förbetalt)

Våg

Baltejp

Rutnät – A4 papper = 1%

Sarstedtrör 50 ml – sterile

Handskar

Kundnummer hos posten: Nytt kundnummer: 20099422 Paket och Brev. (750 506 520 6)

Vedlegg 3: Spørreskjema til produsenter av innplasta grovfôr til hest

1. Kontaktinformasjon

Gård:	
Kontaktperson:	
Adresse:	
Telefon:	
E-post:	

Er fôret produsert på garden?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>
	Om nei, kor/av kven er fôret produsert?
	Namn: _____
	Adress: _____

	<hr/> Telefon: <hr/>
Er det andre dyreslag enn hest som blir fôra med det aktuelle fôret?	
Type ballar:	Rundballar, små <input type="checkbox"/> Rundballar, store <input type="checkbox"/> Firkantballar, små <input type="checkbox"/> Firkantballar, mellomstore <input type="checkbox"/> Firkantsballar, store <input type="checkbox"/> Anna form <input type="checkbox"/> Firkantball, dobbelball <input type="checkbox"/>
Slåttenummer Slåttdato?	1:e slått <input type="checkbox"/> 2:e slått <input type="checkbox"/> 3:e slått <input type="checkbox"/> Anna <input type="checkbox"/>
Korleis var været under slåtten?	

Engalder?	_____ år
Er enga gjødsla?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/> Om ja, med kva og når?
Er det brukt noen form for ugras/skadedyrbekjemping i enga?	(Ikkje så vanleg, men kan forekome)
Botanisk sammansetning i enga? Forekomst av ugras (vurdering av omfang og arter)	(T.d. ulike grasarter, belgvekstinnslag etc)
Anna informasjon om enga sin tilstand:	Synlige spor/merker etter vånd? Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/> Ujamn mark, ikkje utjamna sluttfårer? Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/> Gamalt, daudt gras Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/>

	<p>Opne område utan gras i enga? Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Anna informasjon:</p>
<p>Korleis blei enga behandla på hausten året før slått av det aktuelle partiet med fôr? (beite, slått, nysådd etc)?</p>	
<p>Kva type hausteutstyr/slåmaskin blei brukt?</p>	<p>(skiveslåmaskin med el uten crimper, slåmaskin med valsar, slåmaskin som legg ihop fleire strenger, etc)</p>
<p>Blir graset breispreidd eller lagt i tradisjonell, smal streng?</p> <p>Stubbehøgda?</p>	<p>Breispreidning <input type="checkbox"/> Streng <input type="checkbox"/></p> <p>Stubbehøgde ca _____ cm</p>
<p>Kor lenge blei fôret fortørka (tid frå slått til pressing)?</p>	

<p>Vart graset behandla medan det låg på bakken ?</p> <p>(mekanisk behandling)</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Om ja, kor, når og med kva slags utstyr/maskiner?</p>
<p>Kva type utstyr blei brukt for pressing og innplasting?</p>	<p>(fast- eller variabelkammer? kombinert presse og pakker, etc)</p>
<p>Kor lang tid gikk det mellom pressing og innplastning?</p>	
<p>Blei det brukt ensileringsmiddel ?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Om ja; kva middel vart brukt?</p> <p>Dosering?</p>
<p>Kor mange lag plast vart det brukt?</p>	

<p>Blei tal lag plast og strekkinga av plasten kontrollert?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Viss ja, blei det gjort justeringar (kva for justeringar?) og ny kontroll?</p>
<p>Kva farge har plasten?</p>	
<p>Kva for plastbreidde vart nytta?</p>	
<p>Er fôret analysert ?</p>	<p>Næringsinnhold: Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Hygienisk kvalitet: Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Om ja, be om å få kopi av analysrapportene.</p> <p>Om ja, korleis og når blei dei analyserte prøvene tatt ut?</p>

<p>Èr det registrert hygieniske problem i partiet ?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Om ja, kva har vore problemet/-a, og kor stort omfang har problemet?</p>
<p>Korleis blir ballane lagra (yta, himmelretning, mot vegg, hårdgjord yta, grusbädd, stallplan, på gräs/marken etc)?</p>	<p>Eitt lag <input type="checkbox"/> To lag <input type="checkbox"/> Tre lag <input type="checkbox"/></p> <p>Fire lag <input type="checkbox"/></p> <p>På gras? Grus? Asfalt? I lé /mot vegg, langs vei?</p> <p>Mot sør/aust/vest/nord?</p>
<p>Blir ballane beskytta med nett e.l.?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/></p> <p>Anna:</p>

Er ballane flytta etter innplasting?	Ja <input type="checkbox"/> Nei <input type="checkbox"/> Om ja; kor mange gonger? Kor lenge låg ballane evt på jordet før dei blei flytta til lagerplass?
Andre kommentarar:	

Vedlegg 4: Arbetsbeskrivelse kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av mugg



Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Department of Animal Nutrition and Management
Cecilia Müller
Edited by Jessica Schenck

2011-03-03

Arbetsrutin for mikrobiologisk analys av vallfoder i mögelprosjekt

Mögel i hösilage- analys av mögel kvantitativt og kvalitativt, med två, olika substrat og i två olika temperaturer.

Føljande medier tillreds enligt anvisning på burken:

- Maltextraktagar MEA (utan tillsats av mjølkssyra) anvendes for bestemmning av totalantal jæstsvampar og mægelsvampar. Tillsatt två antibiotika (chlorotetracycline, 50 µg/ml og chloramphenicol, 100 µg/ml). Endast chloramphenicol klarar av autoklivering utan att förlora aktivitet (Samson *et al.*, 2010). Chloramphenicol kan tillsättas före autoklivering.
- DG-18 agar med tillsats av 220 g glycerol per liter vatten (medium) anvendes for bestemmning av ffa mægelsvampar. Tillsatt ett antibiotika (chlorotetracycline, 50 µg/ml) efter autoklivering. Innehåller redan chloramphenicol.

Spädningsserie

Från varje gård kommer ett hösilageprov i separat påse. Från varje påse tas 50 g prov ut og blandas med 450 ml Ringerlösning med Tween 80 tillsatt (0,5 ml Tween 80 per liter Ringerlösning) tillsatt, får stå i 30 min og körs sedan i stomacher 2×60 s. Lösningen hålls därefter över i ett provrør og en spädningsserie görs (4 provrør, så att det blir 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} og 10^{-5} på plattan, se Tabell 1). Från varje spädning sätts en platta per substrat og temperatur (en platta for 25°C og en for 37°C for varje substrat).

Direktutlägg

Dessutom skall direktutlägg från varje prov göras på en platta per substrat og temperatur. Några strån från det orörda provet läggs direkt på en platta per substrat og temperatur. Använd t.ex. steril tång.

Synligt mögel

Bomullspinnar med prov från synliga kolonier kan också finnas med i provet från gården. Pinnarna trycks lätt mot 3 olika ställen på samma platta. Båda substraten og båda temperaturerna skall användas (som for direktutlägg).

Märk alla plattor noga med vad det är for ansättningsdatum, temperatur, gårdsnamn og provnummer. Plattor med spädningsserien vänds upp og ner efter rackling og sätts in i rätt temperatur i en plastpåse som är öppen (får ej tillslutas!). Märk plastpåsen med vilken analys det är (kvantitativ), ansättningsdatum, temperatur og vilka prov (gårdar og

HVC
P.O. Box 7024, Ultuna
S-750 07 UPPSALA, SWEDEN
Telephone +46 (0)18-67 10 00
Telefax +46 (0)18-67 29 95

☒ Kungsängens forskningscentrum
Kungsängen Research Centre
S-753 23 UPPSALA, SWEDEN
Telephone +46 (0)18-67 29 93
Telefax +46 (0)18-67 19 88
Mobile +46 (0)706 – 60 91 94
E-mail Cecilia.Muller@huv.slu.se

Funbo-Lövsta forskningscentrum
Funbo-Lövsta Research Centre
S-755 97 UPPSALA, SWEDEN
Telephone +46 (0)18-67 45 00
Telefax +46 (0)18-67 45 01

provnr) det är i påsen. Direktutläggen får ej vändas upp och ned men skall vara i plastpåse. Plattor med avtryck från bomullspinnar kan vändas upp och ner och skall vara i plastpåse.

Avläsning av plattor görs på de spädnings som ger 20-200 kolonier (ger säkrast resultat). Avläsning av jäst efter 2 dagar och av mögel efter 5 dagar och 10 dagar. Var noga med att inte kontaminera plattorna vid avläsning. Locken ska hela tiden vara på! Efter avläsning sätts plattorna i kylskåp där de kan förvaras i upp till en vecka innan om ympning av mögel till nya plattor.

Tabell 1: Plattspridning på MEA och DG-18:

Provrör	Utspädning	Spädning i röret	mängd på plattan	spädning på plattan
rör 1	10 ml från Stomacherpåsen	10^{-1}	0.1 ml	10^{-2}
rör 2	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 1	10^{-2}	0.1 ml	10^{-3}
rör 3	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 2	10^{-3}	0.1 ml	10^{-4}
rör 4	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 3	10^{-4}	0.1 ml	10^{-5}

Arbetsgång

1. Gjutning av MEA- och RCM-plattor

- Medium

Räkna ut hur mycket medium som behövs. Räkna med 14 ml medium per platta för MEA och DG18. Avrunda uppåt så blir det medium över till blankar också

- **MEA:** 36 agar till 750 ml medium. Tillsätt två antibiotika (chlorotetracycline, 50 µg/ml och chloramphenicol, 100 µg/ml). Endast chloramphenicol klarar av autoklivering utan att förlora aktivitet. Chloramphenicol kan därför tillsättas före autoklivering. Chlorotetracycline tillsätts efter autoklivering.

Exempel: Blanda 36 g MEA till 690 ml avjoniserat vatten. Total mängd = 750 efter tillsats av utspädd antibiotika (chlorotetracycline = 10 ml, chloramphenicol = 50 ml i 690+10+50 = 750).

- **DG-18 agar** med tillsats av 220 g glycerol per liter vatten (medium). Tillsätt ett antibiotika (chlorotetracycline, 50 µg/ml) efter autoklivering. DG-18 agar innehåller redan chloramphenicol (0.1g/l).

Exempel: 165 g glycerol, 23,7 g agar och 740 ml avjoniserat vatten (ytterligare 10 ml avjoniserat vatten vid tillsats av utspädd chlorotetracycline).

- Antibiotika

- **Chloramphenicol (100 µg/ml):** Blanda ut önskad mängd antibiotika med en liten mängd 96 % etanol i ett eppendorfrör (1.5 ml) eller annan typ av bägare. Håll lösningen i agarn före autoklivering.

Exempel: 0.075 g chloramphenicol till ett litet rör (1.5 ml) lös upp med etanol och tillsätt detta till 750 ml medium.

Det går även att lösa upp chloramphenicol i destillerat vatten och lagra i 4°C upp till en månad.

Exempel: Lös upp 0.75 g chloramphenicol i 500 ml destillerat vatten. Dela upp i 10 Falconrör (50 ml i varje rör). Ett rör på 50 ml räcker till 750 ml medium (total mängd).

Uträkning: 100 µg/ml till 750 ml -> $100 \times 750 = 75000 \text{ µg} = 0.075 \text{ g}$ antibiotika till 750 ml medium.

Tillsätt chloramphenicol före autoklivering av agarn.

- **Chlorotetracycline:** Finns i -20 frysen på mikrolab. Förbered en lösning av chlorotetracycline med destillerat vatten. Använd magnetomrörare för att lösa upp chlorotetracycline. Sterilisera chlorotetracycline med hjälp av en spruta till ett sterilt rör (gör detta helst i en LAF=laminar air flow cabinet, finns ej sådan på Kungsängen – endast på mykopat institutionenn). Använd små filter som finns till sprutor (10-20 ml). Efter autoklivering kyl ned agarn till 50-60°C (vattenbad) och tillsätt det lösta chlorotetracycline. Går att förbereda stora mängder och förvara i 4°C upp till en månad.

Exempel: Lös upp 0.375 g chlorotetracycline i 100 ml destillerat vatten. Dela upp i rör (10 ml i varje rör). Ett rör på 10 ml räcker till 750 ml medium (total mängd).

Uträkning: 50 µg/ml till 750 ml -> $50 \times 750 = 37500 \text{ µg} = 0.0375 \text{ g}$ antibiotika till 750 ml medium.

Börja med att ta fram E-kolvar och lägg i omrörarmagneter. Märk vilken kolva som skall ha vilket medium. Väg sedan upp mediet på plasttråg och håll mediet i E-kolven. Tillsätt rätt mängd avjoniserat vatten och rör om på magnetomrörare (ingen värme). Sätt på aluminiumfolielock och autokliveringstejp på E-kolvorna, var noga med att det sluter tätt runt kanten. Ta gärna dubbla aluminiumlock.

- Ringerlösning

- Räkna ut hur mycket Ringerlösning det går åt. För varje prov behövs 450 ml Ringerlösning med Tween 80 tillsatt (0,5 ml Tween 80 per liter Ringerlösning) för Stomacher-behandling. Till varje provrör behövs dessutom 9 ml. Ungefär 500 ml Ringer behövs då för fullständig mikrobiologisk analys av ett prov. Avrunda mängden upp till halvlitrar eftersom det går åt en tablett per halvliter vatten.
- Räkna med några extra rör om något blir fel samt 2-3 blankar.
- Stoppa tabletterna i stora glasflaskor med blå skruvkork (2 litersflaskor ryms precis i autoklaven). Skruva åt locket lite lagom. Ställ flaskorna med lite mellanrum så att värmen kan röra sig fritt i autoklaven. Stoppa autoklavens termometer i en av flaskorna med Ringerlösning.

- Autoklavera

Ställ in E-kolvorna med medium och Ringerlösning i autoklaven, använd aluminiumform i botten om något skulle läcka. Stäng luckan enligt anvisning. Kontrollera vattennivån i autoklaven och fyll på med avjoniserat vatten om det behövs. Välj rätt program, se anvisningar i autoklavens manual (ligger på bordet vid sidan om autoklaven).

- Plattgjutning

Gjut plattorna, håll i agarlösning så att det täcker nästan hela plattans botten men blir kvar en liten tom fläck, rör sedan lätt på plattorna så att hela ytan täcks med agar. Låt plattorna stelna innan de märks med spädning och nummer. Ställ plattorna på bänken tills kondensen försvunnit. Förvara därefter upp och ned i plastpåsar i kylskåp tills de skall användas. Max 1-2 veckor kan de förvaras, sedan torkar de ut.

Ansättning av prover

- Autoklivering av instrument/material (välj rätt program enligt anvisning – inga vätskor!)

- Ett rör per prov (MEA och DG18) och spädning. Lägg till blankar och några extra rör för säkerhets skull. Glöm inte korkar på alla rör (finns i lådor i arbetsbänk vid autoklaven).
- Pipettspetsar. Tejpa ihop locket med autokliveringstejp.
- Petriskål med lock i glas (för sprit).
- Racklor (minst 2 st) inlindade i aluminiumfolie och tejp.
- 2 E-kolvar (200 ml) för Ringerlösning som skall överföras till provrören. Sätt på lock av aluminiumfolie och tejp.
- 2 glaspipetter (10 ml) att använda till överföring av Ringerlösningen till provrören. Linda in i aluminiumfolie och tejp.
- Mätkolv som går att autoklivera. Finns i sterilskåpet och skall återföras dit efter användning. Lock av aluminiumfolie och autokliveringstejp.

- Spädningsserie

När autoklaven gått färdigt, öppna luckan och ställ in sakerna i sterilskåpet, låt mätkolven och provrören svalna lite (märk provrören). Tillsätt 450 ml Ringerlösning till 50 g prov i Stomacherpåse. Kör 2 x 60 s i Stomachern på ”Normal Speed”. Håll sedan upp vätska från påsen i provrör 1, lämna lite skvalputrymme i röret. Spara påsen tills ansättningen är klar.

Se till att provrören är märkta med provnummer och att de står i ordning för att göra en spädningsserie. Använd Acuboy-pipetten och autoklaverad glaspipett (tryck i pipetten långt upp i fästet) för att föra över 9 ml Ringerlösning till alla tomma provrör. Acuboy har två knappar, en för att fylla i och en för att tömma. Tryck inte in fyll-knappen för långt för då kommer vätskan upp i filtret inne i pipetten. Acuboy kan ej ställas in på att stoppa vid en viss volym.

Gör sedan spädningsserien. Använd pipett på 1 ml (blåa spetsar) och ta en 1ml från omskakad rör 1, för över till rör 2, bränn av rör 1:s mynning och sätt tillbaka det. Skaka rör 2, ta en ny pipettspets och för över 1 ml från rör 2 till rör 3, bränn av mynningen på rör 2 och sätt tillbaka, skaka rör 3 osv.....Kom ihåg att byta pipett för varje steg och att bränna av mynningen när ett rör är klart. När överföring från rör till platta sker kan samma pipettspets användas inom samma prov om man börjar med den högsta spädningen. Gäller även rackla vid spridning.

- Ansättning på plattor och inkubation

MEA och DG18 –jäst och mögel

Använd Tipmasterpipett 0.1 ml (blåa spetsar), ta upp vätska i spetsen och tryck ut den första delen i vask/papperskorg, det är inte säkert att den är 0.1 ml. Tryck sedan ut 0.1 ml på varje platta, ta tre plattor i taget och rackla ut. Får plattorna stå för länge med vätskan utan att racklas avdunstar vätskan och det går då inte att rackla. Inkubera i 25-30°C upp och ned i plastpåse (men tänk på att det skall vara aerob miljö).

- Avläsning och förvaring

Läs av jäst efter 2-3 dygn, mögel efter 5 och 10 dygn. Jästen kan ha olika färger (vit, gul, orange, rosa) men är ej filamentösa.

Förvara plattorna upprättvända i kylskåp (4°C) med parafilm runt för att förhindra kontaminering. Inom en vecka i kylskåp ska mögel ympas över på nya MEA plattor (med antibiotika) och renodlas för att studera de morfologiska karaktärerna.

Identifiering kan ske med hjälp av stereolupp och mikroskop samt boken "An introduction to Food and Air-borne fungi" av Samson *et al.* (finns hos C. Müller eller på mikrobiologilab). Bomullsblått kan tillsättas för att lättare se strukturerna i mikroskop. Bomullsblått och paraffinolja finns på hyllan ovanför mikroskopet.

Avläsning av plattor görs på de spädningar som ger 20-200 kolonier (ger säkrast resultat). Räkning enligt Pahlow eller Niemelä

Tabell 2. *celling* MEA, DG-18,
Plattspridning

Provrör	Utspädning	Spädning i röret	mängd på plattan	spädning på plattan
rör 1	10 ml från Stomacherpåsen	10 ⁻¹	0.1 ml	10 ⁻²
rör 2	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 1	10 ⁻²	0.1 ml	10 ⁻³
rör 3	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 2	10 ⁻³	0.1 ml	10 ⁻⁴
rör 4	9 ml steril Ringerlösning + 1 ml från rör 3	10 ⁻⁴	0.1 ml	10 ⁻⁵

Dessa används rutinmässigt

Referenser

Carlile, F.S., 1984. Techniques for the isolation and identification of lactic acid bacteria and clostridia in silage. In: Gordon, F.J., Unsworth, E.F. (Eds.), *Seventh Silage Conference, The Queen's University, Belfast, UK*, 67-68.

Hartog, B.J. 1981. The detection and quantification of fungi in food. In: R.A. Samson, E.S. Hoekstra and C.A.N. van Oorschot, *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Baarn, The Netherlands. pp. 206-211.

Heron S.J.E., Wilkinson J.F. and Duffus C.M. (1993) Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 13-17.

Seale D.R., Pahlow G., Spoelstra S.F., Lindgren S., Dellaglio F., Lowe J.F., 1986. Methods for the microbiological analysis of silage. In: Lindgren, S., Pettersson, K.L. (Eds.) *Proceedings of the Eurobac Conference, Uppsala, Sweden*. Swedish University of Agricultural Sciences, *Grass and Forage Reports* 3, special issue, pp. 147-164.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and van Oorschot, C.A.N. 1981. *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Baarn, The Netherlands.

Samson, R.A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C. 2000. Methods for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: Samson, R.A., Hoekstra, E. S., Filtenborg, O. and Frisvad, J.C. (Eds.) *Introduction to food-and airborne fungi*. 6th ed. Centraalbureau voor schimmelcultures-Utrecht, The Netherlands. pp. 283-297.

Samson R.A., Houraken J., Thrane U., Frisvad J.C. and Andersen B. 2010. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands.