

# Bioforsk Rapport

Bioforsk Report

Vol. 8 Nr. 22/ 2013

## Sporedannende bakterier

### Utfordringer for mjølke kvalitet, fôr kvalitet og dyrehelse

Astrid Johansen<sup>1</sup>, Maria Stokstad<sup>2</sup>, Åshild T. Randby<sup>3</sup>, Toril Lindbäck<sup>4</sup> og Kari-Marie Njaastad<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bioforsk Midt-Norge Kvithamar

<sup>2</sup>Norges Veterinærhøgskole, Institutt produksjonsdyrmedisin

<sup>3</sup>Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, Institutt for Husdyr- og Akvakulturvitenskap

<sup>4</sup>Norges Veterinærhøgskole, Institutt for Mattrygghet og infeksjonsbiologi

<sup>5</sup>TINE SA

[www.bioforsk.no](http://www.bioforsk.no)





*Tittel/Title:*

Sporedannende bakterier. Utfordringer for mjølkekvalitet, fôr kvalitet og dyrehelse.  
 Sporeforming bacteria of relevance for milk and feed quality and animal health. A review.

*Forfatter(e)/Author(s):*

Astrid Johansen, Maria Stokstad, Åshild T. Randby, Toril Lindbäck og Kari-Marie Njaastad

<i>Dato/Date:</i> 08.02.2013	<i>Tilgjengelighet/Availability:</i> Åpen	<i>Prosjekt nr./Project No.:</i> ES486629/217400	<i>Saksnr./Archive No.:</i> Arkivnr
<i>Rapport nr./Report No.:</i> 8(22)/2013	<i>ISBN-nr./ISBN-no:</i> 978-82-17-01057-9	<i>Antall sider/Number of pages:</i> 82	<i>Antall vedlegg/Number of appendices:</i> Ingen

<i>Oppdragsgiver/Employer:</i> Regionalt Forskningsfond Midt og TINE SA	<i>Kontaktperson/Contact person:</i> Astrid Johansen astrid.johansen@bioforsk.no
--	---

<i>Stikkord/Keywords:</i> Clostridium, Bacillus, sporer, mjølk, fôr, sjukdom, kontaminering, analyser Clostridium, Bacillus, spores, milk, feeds, health, contamination, analyses	<i>Fagområde/Field of work:</i> Fôrproduksjon, matsikkerhet, produktkvalitet, dyrehelse Animal health, product quality, food security, forage production
---	--

<i>Sammendrag:</i> Rapporten gir en kunnskapsstatus om sporedannende bakterier som har betydning for fôr- og mjølkekvalitet og dyrehelse, kontamineringskilder, årsaker til framvekst i ensilasje, diagnostikk og analysemetoder.
--

<i>Summary:</i> This report is reviewing recent knowlegde on sporeforming bacteria of major importance for milk quality and animal health in Norway, contamination sources and pathways, growth and development in silage, diagnostics and analytical methods.
---

<i>Land/Country:</i> Norge/Norway	
<i>Fylke/County:</i>	
<i>Kommune/Municipality:</i> Stjørdal/Oslo/Ås	
<i>Sted/Lokalitet:</i>	

Godkjent / Approved

Prosjektleder / Project leader

Erik Revdal

Astrid Johansen



# 1. Forord

---

Denne rapporten er det endelige produktet av forprosjektet «Sporedannende bakterier. Utfordringer for mjølke kvalitet, fôrkvalitet og dyrehelse». Prosjektet har vært et samarbeid mellom Bioforsk (prosjektledelse), Institutt for Husdyr- og Akvakulturvitenskap ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap, Institutt produksjonsdyrmedisin og Institutt for Mattrygghet og infeksjonsbiologi ved Norges Veterinærhøgskole, samt TINE SA. Regionalt forskningsfond Midt og TINE SA har stått for finansieringa.

Prosjektets overordna mål var å: «Framskaffe ny kunnskap om sporedannende bakterier som årsak til sjukdom hos dyr og kvalitetsfeil på fôr og mjølk, samt vurdere behovet for ny forskning på området».

Rapporten er i hovedsak resultat av litteraturstudium. I tillegg har Toril Lindbäck gjennomført en metodeutprøving for direkte bestemmelse av sporer ved hjelp av PCR ved Norges veterinærhøgskole. Som en del av Tine's egeninnstats i prosjektet har Ingunn Schei gjort statistiske beregninger på et datamateriale som var samla inn med tanke på å studere sammenhenger mellom kjemiske analyser og hygieneanalyser i fôr, mens Kari Marie Njaastad var på studiebesøk hos Eurofins' Laboratorium i Linkjeping.

Stjørdal/Oslo/Ås 7. februar 2013.

Astrid Johansen (prosjektleder)

Maria Stokstad

Åshild Randby

Toril Lindbäck

Kari Marie Njaastad



## 2. Innholdsliste

---

### Innhold

1.	Forord .....	1
2.	Innholdsliste.....	3
3.	Oppsummering.....	5
4.	Bakgrunn.....	8
4.1	Kvalitetsforringelse av mjølk.....	8
4.2	Sjukdomsrisiko/utbredelse .....	10
5.	Sporedannere med betydning for mjølke kvalitet, fôrkvalitet og dyrehelse .....	12
5.1	Hva er en spore og hvordan oppstår den? .....	12
5.1.1	Sporulering .....	13
5.1.2	Germinering .....	14
5.2	Faktorer som påvirker vekst hos noen sporedannere .....	15
5.3	Anaerobe sporedannere .....	16
5.3.1	Sjukdomsframkallende/patogene, anaerobe sporedannere .....	16
5.3.2	Anaerobe sporer som forårsaker kvalitetsproblemer i fôr og mjølk.....	28
5.4	Aerobe sporedannere .....	30
6.	Diagnostikk og analysemetoder.....	34
6.1	«Tradisjonelle» metoder .....	34
6.1.1	Platespredning .....	34
6.1.2	Most Probable Number (MPN) .....	35
6.1.3	Toksinpåvising.....	41
6.1.4	Andre metoder .....	42
6.2	DNA-baserte metoder.....	42
6.2.1	PCR (polymerase chain reaction) .....	42
6.2.2	Real time PCR (RT-PCR) .....	43
6.2.3	PCR på sporer .....	43
6.3	Sammenheng mellom sporeinnhold og fermenteringskvalitet i fôr ?.....	45
7.	Kontaminering av mjølk og fôr .....	47
7.1	Kontaminering av mjølk.....	47
7.1.1	Spesielle utfordringer i fjøs med mjølkerobot .....	49
7.2	Kontaminering av planter og surfôr .....	50
7.2.1	Sporer og sporedannere på stående planter.....	50
7.2.2	Sporer og sporedannere i jord .....	51
7.2.3	Sporer og sporedannere i husdyrgjødsel .....	53
7.2.4	Spredning av husdyrgjødsel på eng.....	54
7.2.5	Husdyrgjødsel på beite .....	58
7.2.6	Slått, fortørking og innhøsting .....	58
7.3	Sporeinnhold i andre fôrslag enn gras og surfôr .....	59
8.	Risikofaktorer for oppformering av sporedannende bakterier under ensilering, lagring og utfôring.....	60
8.1	Årsaker i ensileringsarbeidet til at sporer oppformerer i surfôr .....	60
8.1.1	Tempo i silolegginga (kapasitet på høsteredskapen i forhold til silostørrelse).....	60
8.1.2	Komprimering av grasmassen .....	60
8.1.3	Plastkvalitet og plastmengde for tetting av surfôrsiloer og -baller .....	62
8.1.4	Bruk av ensileringsmidler .....	62
8.2	Årsaker til oppformering av sporer i surfôr under uttak og ved fôring .....	64
8.2.1	Varmgang ved åpning (surfôrets aerobe stabilitet) .....	64
8.2.2	Kvalitet på plastdekket og aerob stabilitet.....	65
8.2.3	Uttakshastighet og aerob stabilitet .....	66
8.2.4	Effekt av ensileringsmidler på aerob stabilitet .....	66

8.2.5	Oppformering av sporer i forbindelse med fôring .....	67
9.	Kunnskapsmangler - framtidige forskningsoppgaver .....	68
9.1	Dyrehelse .....	68
9.2	Analyser og prøvebehandling .....	68
9.3	Kontaminering og framvekst av sporer i fôr .....	69
10.	Litteraturliste .....	71



### 3. Oppsummering

---

Rapportens innhold oppsummeres i henhold til sju formulerte delmål i prosjektsøknaden:

1. Kartlegge forekomst av sporedannende bakterier og skadepotensiale både med hensyn til storfehelse og kvalitetsfeil på fôr og mjølk.

- Miltbrannemfysem forårsaka av *C. chauvoei* er i dag den mest tapsbringende klostridiesjukdommen på storfe i Norge. Sjukdommen øker både i antall utbrudd og geografisk utbredelse. For perioden 1998-2010 var det 278 registrerte tilfeller i kukontrollen og over 4500 dyr ble vaksinert mot sjukdommen. Rasktvoksende dyr mellom ½ og 2 år blir oftest ramma. Sjukdommen er som regel dødelig.
- Miltbrann, forårsaka av *B. anthracis* er den sjukdommen som betyr mest i et globalt perspektiv og som har potensial til å gi mest negativ effekt for landbruksnæringa og samfunnet for øvrig ettersom sjukdommen, som er dødelig, er en zoonose. Det siste kjente tilfellet i Norge var i 1993, mens Sverige hadde utbrudd så seint som i 2011. Forekomsten av tilfeller bakover i tid og hvor dyrekadaver fra smitta dyr er gravlagt er ikke systematisk kartlagt i Norge.
- Smørsyreproduserende klostridier representerer det største skadepotensialet både med hensyn til fôrkvalitet og mjølkekvalitet. *C. tyrobutyricum* er den arten som forekommer i størst antall både i fôr og mjølk (ca 70 %) og som dermed forårsaker størst skade. Det er indikasjoner på at problemene med høye sporetall i Norge er større i økologiske besetninger enn i konvensjonelle, og mer utbredt i besetninger med mjølkerobot enn i besetninger med tradisjonelle mjølkingsystemer.
- Surfôr synes å være den viktigste kontamineringskilden for *C. tyrobutyricum* til mjølk. Surfôr med > 5 log<sub>10</sub> CFU/g bør ikke brukes i mjølkekubesetninger, og det kreves ekstraordinære tiltak i fjøset for å unngå sporer i mjølka dersom surføret inneholder 3-5 log<sub>10</sub> CFU/g. Det er indikasjoner på at om lag ¼ av surføret fra norske mjølkekubesetninger inneholder > 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g sporer av denne bakterien.
- *B. cereus* kan forårsake søtkeagulering av alle konsummjølkprodukter. Kildene er rester av jord på jur og spener (spesielt ved beitedrift) og fôr.
- Det finnes ingen dokumentasjon på hvor vidt *C. chauvoei* forefinnes og eventuelt er i stand til å germinere og vokse i surfôr, strø og/eller talle.

2. Beskrive bakterienes genetikk og økologi, samt faktorer som påvirker sporulering, germinering, formering og resporulering under ulike forhold

- Med noen få unntak er det forskjellige arter som forårsaker henholdsvis sjukdom på dyr og kvalitetsfeil på fôr og mjølk.
- Sporer er ekstremt resistente mot UV-stråling, uttørking, høye og lav temperaturer og kjemiske desinfeksjonsmidler. Til tross for mange likhetstrekk, er det betydelige forskjeller mellom artene m.h.t. hvilke faktorer som initierer sporulering, germinering og vekst. Nesten alle studier av disse prosessene er gjort i laboratoriemidier.
- Jord har vært regna som det naturlige habitatet for både klostridier og baciller, men nye studier gir indikasjoner på at fordøyelseskanalen hos dyr og insekter kan være bacillenes naturlige habitat og at jorda fungerer som et reservoar.
- 

3. Evaluerer ulike analysemetoder for diagnostikk, inkludert kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av sporedannende bakterier i prøver fra dyr, fôr, gjødsel og mjølk

- *C.chauvoei* kan diagnostiseres gjennom påvisning av toksiner ved hjelp av PCR (Polymerase Chain Reaction).
- Utsæd på agarskåler etter oppvarming, germinering og fjerning av vegetative bakterier er den mest nøyaktige metoden for kvantifisering av alle typer sporer. Artene kan deretter artsbestemmes, om nødvendig ved hjelp av DNA-basert metoder eller f.eks. påvisning av artsspesifikke enzymer.
- S.k. MPN-metoder gir mulighet til mer eller mindre nøyaktig kvantifisering av sporer fra *C.tyrobutyricum* i både mjølk, fôr og gjødsel. Metoden er basert på påvisning av gassproduksjon og eventuelt fargeomslag i et varierende antall rør. Valg av medium i røra synes å kunne ha vesentlig innflytelse på presisjonsnivået som også kan økes gjennom å øke antallet rør. Potensielle feilkilder knytta til metoden kan være større ved analyser av fôr enn mjølk.
- Korrelasjonen mellom innholdet av sporer og fermenteringsprodukter i surfôr er svak.

#### 4. Klarlegge årsakene til at fôr kontamineres med bakteriesporer

- Jord er den viktigste kontamineringskilden for sporer (både aerobe og anaerobe) i surfôret. Kontamineringa skjer mens plantene vokser, eller i forbindelse med innhøstinga. Dokumentasjonen på hvor vidt ulike jordtyper, jordegenskaper og/eller plantearter har betydning for kontamineringsrisikoen er mangelfull og/eller fraværende.
- Kvantifisering av sporeinnholdet i jord synes ikke å være egna som grunnlag for risikovurdering m.h.t. mjølke kvalitet, men er aktuelt og etterspurt som grunnlag for risikovurdering i forhold til både miltbrannemfysem og miltbrann.
- Husdyrgjødsel og dødt plantemateriale er andre kontamineringskilder. Risikoen ved å spre husdyrgjødsel på eng varierer. Torrjødsel gir stor risiko, men brukes i lite omfang på eng i Norge. Risikoen ved spredning av blautjødsel varierer tilsynelatende med gjødseltype, mengde og spredemetode. Ved bruk av moderate mengder med vanninnblanda gjødsel som spres i god tid før høsting synes risikoen å være liten. Med bruk av nedfellingsutstyr framstår risikoen som minimal.
- Ekstra nedbør/kunstig vanning og/eller høy stubbehøgde har i vitenskapelige undersøkelser ikke gitt målbar reduksjon i surfôrets innhold av sporer. Dette til tross for at det i andre sammenhenger er påvist høyere sporetall nederst på plantene enn lenger opp.
- Det er indikasjoner på at bruk av vende- og samlerive i forbindelse med fortørking av gras kan øke risikoen for at jord og dødt plantemateriale blir med inn i siloen.

#### 5. Identifisere risikofaktorer for at sporer i avlingen oppformerer under ensilering, lagring og utfôring.

- Fortørking og bruk av syrepreparat ved konservering av gras reduserer sterkt risikoen for at sporer germinerer og oppformerer i surfôret under den anaerobe surfôrgjæringa.
- Ujamn komprimering av grasmassen i plansiloer er vanlig og utgjør et alvorlig problem for surfôr kvaliteten. Dette skyldes oppformering av anaerobe og aerobe sporedannende bakterier i forbindelse med lufttilgang og varmgang ved åpning av store plansiloer med dårlig komprimerte partier.
- Produksjon av fullfôr er et omfattende hygienisk problem. Dette skyldes at fôr med ulik hygienisk kvalitet blandes under tilgang på luft, og at fullfôrmiksen deretter ofte lagres noen tid i fôrsentral og på fôrbrett. Problemet forverres betydelig ved at rester av gammelt fullfôr i blanderen ofte infiserer neste batch. Problemer knyttet til fullfôr kan ha relevans også sett i forhold til økende forekomst av sykdommer forårsaka av sporedannende bakterier.
-

6. Implementere ny kunnskap i praktisk rådgiving

- Vil iverksettes av TINE etter at rapporten fra prosjektet nå er ferdigstilt.

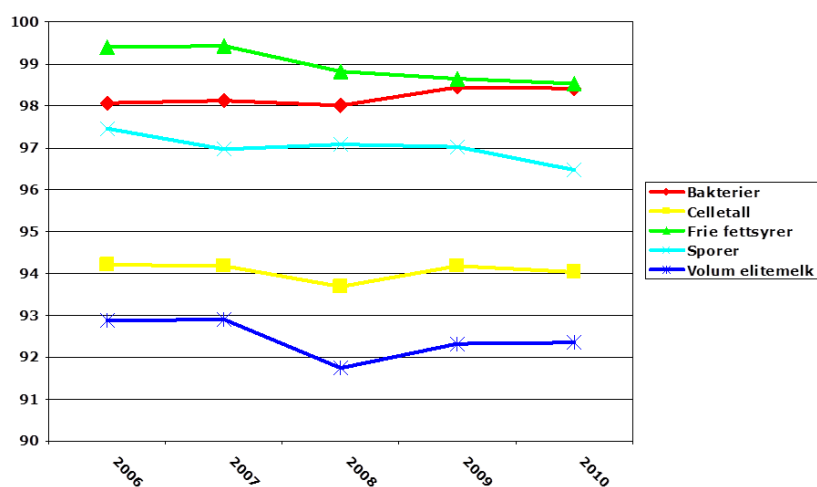
7. Konkretisere behov for ny kunnskap som vil kreve forskningsinnsats

- Det er store kunnskapsmangler knytta til hele epidemiologien for miltbrannemfysem. Økt kompetanse på *C.chauvoei* er nødvendig for å kunne gi gode praktiske råd for forebyggende tiltak. Metodeutvikling for mer effektiv påvising/diagnostisering og kvantifisering av sporer av *C.chauvoei* er avgjørende i denne kunnskapsutviklinga
- Ny/utvida kunnskap om i hvilken grad klima og jordforhold samt botanisk sammensetning av enga har innvirkning på risikoen for at plantematerialet kontamineres med sporer under vekst og innhøsting.
- Kartlegge hvilke silo- og surfôrtyper i Norge som representerer den største risikoen med tanke på høyt sporeinnhold i fôr og mjølk, samt om oppformering av sporer i størst grad skjer i den anaerobe eller aerobe fasen
- Undersøke i hvilken grad bruk av fullfôr påvirker sporeinnholdet i fôr og mjølk i Norge, og hvilke tiltak som effektivt kan redusere smittepresset.

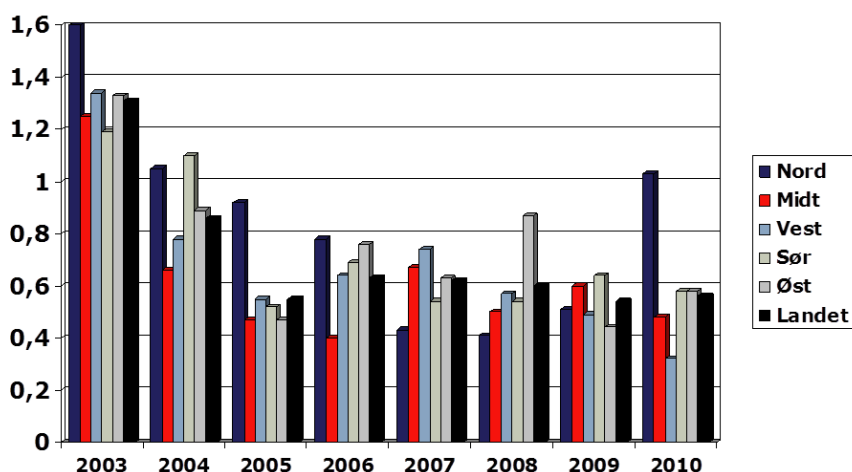
## 4. Bakgrunn

### 4.1 Kvalitetsforringelse av mjølk

For TINE er det avgjørende at mjølka til en hver tid er av best mulig kvalitet. I perioden 2006 til 2010 har det imidlertid vært en nedgang i andelen elitemjøl. Nedgangen skyldes endring i flere kvalitetsvariabler, men nedgangen har vært størst for kvalitetskriteriene ”sporer” og ”frie fettsyrer”. Andelen av mjølka som ble klassifisert som Elite/1. klasse for sporer gikk ned fra 97,4 til 96,5 % i perioden 2006 til 2010 (Figur 4.1). I samme periode gikk andelen 3.klassemjøl (høgt sporetall i siste og de fire foregående måneder) også ned fra 0,6 til 0,56 % (Figur 4.2).



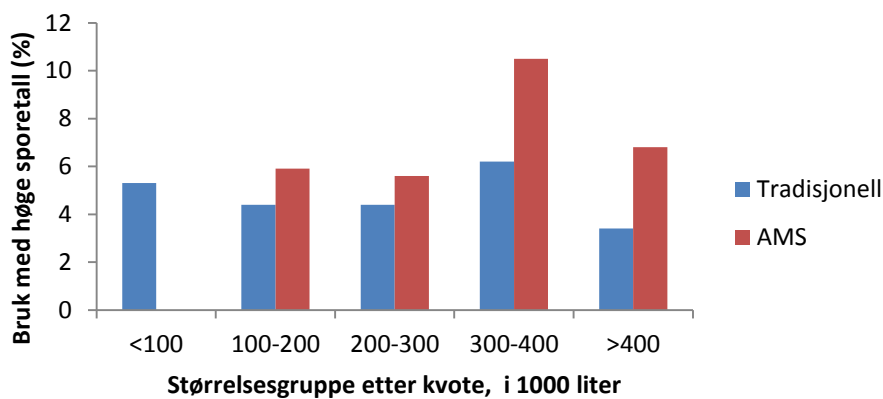
Figur 4.1 Utvikling i andel elitemjøl 2006-2010 (Ingrid Haug, TINE pers.med.)



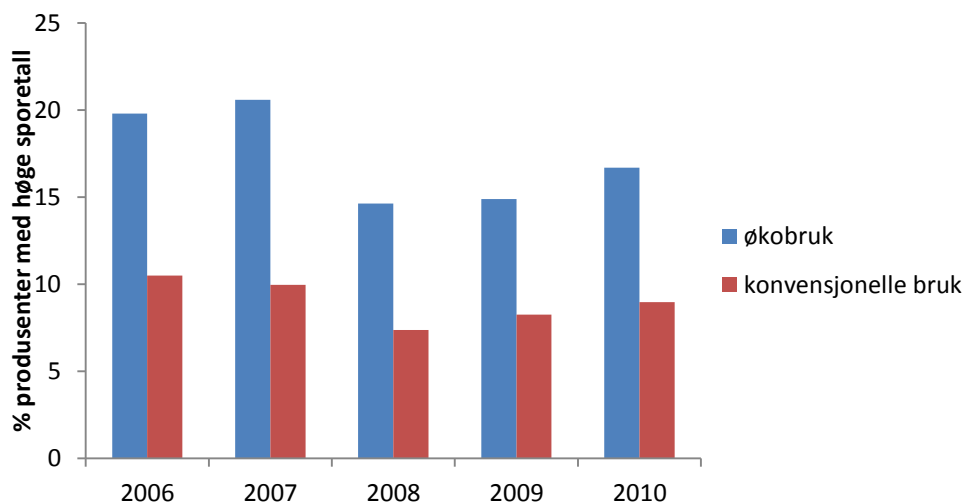
Figur 4.2. Andel leveranser i 3.klasse som følge av høgt sporeinnhold. Utvikling i perioden 2003-2010 i de ulike regionselskapene og for landet sett under ett.

Til tross for den positive, nedadgående trenden på 3.klasser på landsbasis, var svingningene fra år til år betydelige for de enkelte regionselskapene (Figur 4.2). TINE Nord hadde i gjennomsnitt for perioden høyere andel 3.klasse-leveranser (0,86 %) enn landsgjennomsnittet (0,71 %), mens TINE Midt og TINE Vest hadde lågere andel (hhv 0,64 % og 0,69 %).

Høge sporeverdier forekommer noe oftere i besetninger med AMS (automatisk mjølkesystem) enn i besetninger med tradisjonelle mjølkesystemer (Figur 4.3, Haug & Rønningen 2010). Variasjon i forhold til besetningsstørrelse er ikke entydig. Videre var det i 2010 dobbelt så mange høge (anaerobe) sporeanalyser på de norske øko-brukene som på de konvensjonelle (Figur 4.4, Ingrid Haug, pers.medd.).



Figur 4.3 Andel (%) bruk med høge sporetall i mjølk ved tradisjonell drift og med mjølkerobot (AMS). Tallene er fra 2009 (Haug & Rønningen 2010).



Figur 4.4. Andel (%) økologiske og konvensjonelle produsenter med høge sporetall i perioden 2006-2007.

I 2008 ble de aerobe sporeanalysene fjernet fra kvalitetsbetalingsregelverket til TINE. Begrunnelsen var at man anså aerobe sporer på gårdstanknivå å være et lite problem og mente det var riktigere å prioritere anaerobe analyser i stedet. Noen år tidligere hadde

det i en rapport fra Svensk Mjlk blitt slått fast at aerobe sporer i første rekke var et «sommerproblem» (Svensson *et al.* 2000). I studien som lå til grunn for denne rapporten framgikk imidlertid også at det var store variasjoner i konsentrasjonen av *B.cereus*-sporer gjennom sommeren og at det var betydelige geografiske forskjeller og forskjeller mellom industrianlegg.

I tida som har gått etterpå har imidlertid TINE/meieriindustrien kommet til at aerobe sporer likevel bør inngå som et kriterium for kvalitetbetalinga, blant anna fordi det kan være problemer med stkoagulering av alle konsummjlkprodukter. Aerobe sporeanalyser ble derfor gjeninnført i 2012. Samtidig med gjeninnfringa av de aerobe sporeanalysene ble også rutinene og opplegget rundt de anaerobe sporeanalysene endra. Mens det tidligere ble tatt tre sporeanalyser årlig av samtlige produsenter, blir nå alle tankbiler screenet på anaerobe sporer 11 ganger per år, og aerobe sporer fem ganger per år. Hvis en tankbil har høgt nivå, testes alle leverandører på ruta ved neste prøveuttak. Produsenter med høge sporetall, følges opp med ny analyse påfølgende måned inntil sporetallene igjen er innafør kravet til 1.klassemelk.

Mikrofiltrering og baktofugering i ysteriene fjerner 97-99 % av *C.tyrobutyricum*-sporene, men filtrering er kostbart. Dessuten er det alene ikke nok til å redusere sporeinnholdet tilstrekkelig. For den enkelte produsent kan i verste fall nedklassing av melka på grunn av høgt sporetall føre til at utbetalingsprisen reduseres med ca 25 % (pr. i dag kr 0,90/liter). Med stadig større besetninger blir det avgjørende for økonomien for hver enkelt leverandør å sikre førsteklasses kvalitet på melka.

## 4.2 Sjukdomsrisiko/utbredelse

Sporedannende bakterier med toksinproduksjon er årsak til en lang rekke velkjente og mindre kjente sykdommer hos mange dyrearter, også hos storfe. De mest kjente inkluderer miltbrann, miltbrannsemfysem, botulisme og tetatus (stivkrampe). En del av disse representerer betydelige tap for storfenringa, og flere har potensiale til å gi større utbrudd og mer vidtrekkende konsekvenser. Flere er zoonoser (i.e. smitter mellom dyr og mennesker).

I de seinere ra har forekomsten av miltbrannsemfysem økt, i både antall og geografisk utbredelse i Norge. I tillegg har sykdommen begynt å opptre under andre forhold enn tidligere. Dette indikerer at forekomsten og årsaksforholdene er i endring, og dette har vært satt i i sammenheng med endringer i driftsformene. Kjennskap til store problemer i nye områder har gitt økt fokus på sykdommen i veterinrmiljene. I 2010 døde over 70 slakteokser i et utbrudd på Hadeland. Etter dette ble det både fra produsenter, Mattilsynet og andre aktører etterlyst mer kunnskap rundt denne sykdommen. Dette var den direkte årsaken til at Storfesetjenesten ønsket forskingsaktivitet på området, og det ble tatt initiativ i Tine til å samordne dette med tilsvarende fokus på sporedannere som årsak til kvalitetsproblem på mjølk og fr.

Generelt regnes sykdommer forårsaket av klostridier og baciller hos storfe som sporadisk forekommende. Antall tilfeller er ukjent fordi diagnostikk er utfordrende og helseregistreringer mangelfulle. Mange av bakteriene er vanlig forekommende, og man er

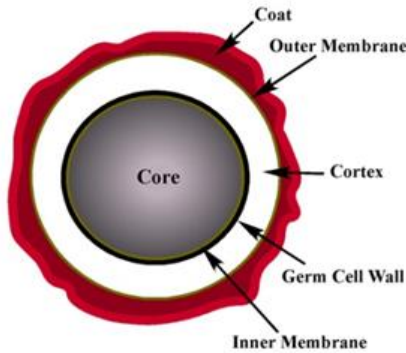
derfor avhengig av påvist toksinproduksjon eller kvantifisering for å stille diagnose. På kadavre får man oppvekst av klostridier post-mortelt, noe som ytterligere vanskeliggjør diagnose. Mange av sjukdommene har så raskt og dramatisk sykdomsforløp at man oftest ikke kommer til før dyret er dødt, og det blir registrert som sjøldød. Miltbrannsemfysem har egen kode i helsekortordningen. I tillegg eksisterer også en kode for «klostridiesjukdommer unntatt 151». Denne er imidlertid lite kjent av veterinærene, og brukes svært sjelden.

Sporesjukdommene har stor betydning når de opptrer, da de gir høy dødelighet og er vanskelige å behandle. Økonomiske konsekvenser for produsenter som rammes er betydelige. Det er smertefulle sykdommer for dyra. Klostrider og baciller er generelt følsomme for penicillin, men prognosen er likevel svært dårlig fordi toksiner som regel er til stede før behandling er igangsatt. Siden patogene klostridier finnes i jord og i tarmkanalen hos friske dyr er utryddelse av bakteriene er ikke aktuelt. Kontroll av infeksjonene må skje ved ulike forebyggende tiltak. All sau i Norge vaksineres regelmessig med en multivaksine mot en rekke klostridiearter. I enkelte områder brukes samme vaksine til storfe. Andre tiltak er endra driftsrutiner eller endra beitebruk. Alle disse tiltakene har betydelige kostnader. Det er derfor etterspurt bedre dokumenterte faglige råd om nytteverdien og praktisk gjennomføring av forebyggende tiltak.

## 5. Sporedannere med betydning for mjølke kvalitet, fôr kvalitet og dyrehelse

---

De to viktigste slektene av sporedannende bakterier er *Bacillus* og *Clostridium*.



Figur 5.1. Tverrsnitt av en spore ([www.micro.cornell.edu](http://www.micro.cornell.edu))

### 5.1 Hva er en spore og hvordan oppstår den?

Sporer (av gresk ord for sæd) brukes som betegnelse på formeringsenheter hos mange organismer. Hos bakterier brukes begrepet spore som en betegnelse på svært motstandsdyktige hvilestadier som eksisterer hos noen bakteriearter. Det dannes bare en spore av hver bakterie, så disse sporene er ikke formeringsorganer, men holder bakterien i live under ugunstige ytre forhold. Sporen dannes inne i bakterien, og kalles derfor ofte en endospore, som også skiller bakteriesporer fra andre typer sporer i biologien. I dette dokumentet brukes begrepet spore om endospore.

Sporer er ekstremt resistente mot UV-stråling, uttørking, høge temperaturer, låge temperaturer og kjemiske desinfeksjonsmidler (Setlow 2006). Sporen består av bakteriens DNA og deler av dens cytoplasma, omgitt av en svært hardfør cellevegg (Figur 5.1). Dannelse av sporer gjør at bakterier kan ligge i hvile i lange perioder før de våkner til liv igjen. Det er hevdet at en million år gamle sporer kan vekkes til liv. Strukturen til sporene er svært forskjellig fra selve cellen. Sporenes resistens mot ytre påvirkning kan forklares med dens unike struktur. Den ytterste proteinkappen gjør sporen resistent mot kjemiske og enzymatiske forbindelser. Under denne kappen ligger et nytt, tykt peptidoglykanlag som kalles cortex. Riktig dannelse av cortex er nødvendig for at sporekjernen skal dehydreres tilstrekkelig. Dehydreringen gjør at sporen tåler høge temperaturer. Under cortex ligger et peptidoglykanlag som er opphavet til ny cellevegg etter at sporen har germinert. Den indre membranen er en permeabel barriere mot potensielle skadelige kjemikalier. Kjernen av sporen er ekstremt dehydrert, og inneholder cellens DNA, ribosomer og store mengder dipicolinsyre. Dipicolinsyre kan omfatte opp til 10 % av sporens tørrvekt og finnes ikke i vegetative celler. Små, syreløslige proteiner (SASPs) er sporespesifikke proteiner som



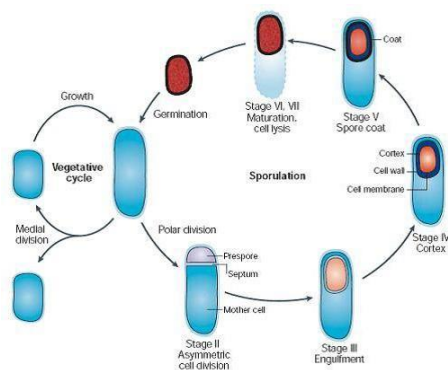
bindes til DNA og gjør dette motstandsdyktig mot UV-lys og skadende kjemikalier. Tabell 5.1 viser oversikt over generelle ulikheter mellom vegetative celler og sporer.

Tabell 5.1 Karaktertrekk ved henholdsvis vegetative bakterieceller og sporer (Madigan et al. 2003).

Karakteristikk	Vegetative celler	Sporer
Struktur	Typisk gram-positiv celle og noen få gram-negative celler	Tykt lag, sporekåpe, exosporium
Kalsiuminnhold	Låg	Høg
Dipicolinsyre	Inneholder ikke	Inneholder
Enzymaktivitet	Høg	Låg
Metabolisme (O <sub>2</sub> opptak)	Høg	Låg eller ingen
Syntetisering av makromolekyler	Tilstede	Ingen
mRNA	Tilstede	Låg eller ingen
Resistens mot varme	Låg	Høg
Resistens mot radioaktivitet	Låg	Høg
Resistens mot kjemikalier (f.eks H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) og syrer	Låg	Høg
Mulighet for farging	Mulig	Kun ved spesielle teknikker
Innhold av vann	Høg, 70-80%	Låg, 10-25% i kjernen
pH i cytoplasma	Omtrent pH 7	Omtrent pH 5,5-6 (kjerne)

### 5.1.1 Sporulering

En spore dannes inne i morcellen i en prosess som kalles sporulering. Hvordan selve sporuleringsprosessen foregår er kun delvis kjent. Som eksempel på hvordan en spore dannes bruker vi *Bacillus* (Figur 5.2). Hos *Bacillus* vil mangel på næring føre til fosforylering av et nøkkel-regulatorprotein, Spo0A, som igjen fører til en asymmetrisk celledeling med dannelse av en liten forspore og en større morcelle (stadium II, Fig.2). Forsporen omslutes av morcellens plasmamembran (stadium III), etterfulgt av syntese av cellevegg og cortex, dehydrering av sporekjernen og opptak av dipicolinsyre som blir syntetisert i morcellen under sporulering (stadium IV). Til slutt blir sporen dekket av en kompleks proteinkappe (stadium V) (Piggot & Hilbert 2004). Sporuleringsprosessen hos klostridier er ikke like godt kjent som for baciller, men også der antas Spo0A å være et nøkkelprotein (Steiner 2011).



Figur 5.2. Sporuleringsyklus hos *B. subtilis* (Juodeikiene et al. 2012)

De viktigste grunnene til sporulering hos *Bacillus* er høy celletetthet og dårlig tilgang på næring. Når cellemassen i en kultur økes, skilles det ut små peptider som akkumuleres ekstracellulært. Når disse peptidene når en kritisk konsentrasjon, bindes de til overflate-reseptorer som overfører fosfat fra ATP til Spo0A, som derved aktiverer sporulering. Det har lenge vært kjent at sporulering induseres av begrensning av næring og at karbonkilder, nitrogen og forsfor er de begrensende substratene. Konsentrasjon av aminosyrene valin, leucin, isoleucin og GTP sier noe om næringstilgang for bakteriecellen. Ved begrenset næringstilgang synker konsentrasjonen av disse stoffene i bakteriecellene. Dette starter mange reaksjoner, for eksempel sporulering. En *Bacillus*-kultur som vaskes i vann vil sporulere, så det er nærliggende å tro at bakteriene ikke trenger næring til selve sporuleringen, men bruker oppsparte energireserver. En bakterie som har fått skader av f. eks UV-stråling, høy temperatur eller av toksiske stoffer kan få problemer med å sporulere. De genetiske mekanismene bak sporulering er godt studert i *B. subtilis*, og til en viss grad i *B. cereus* og *C. perfringens*.

Det er en allmenn oppfatning at klostridier kun sporulerer under anaerobe forhold, og de fleste laboriemetoder for å lage sporer krever anaerob inkubasjon over lengre tid. Klostridier krever dessuten ofte helt definerte medier for å sporulere *in vitro* (Sacks & Thompson 1978). Det finnes forskjellige laboriemetoder for å produsere rene sporebatcher av klostridier (Meyer & Tholozan 1999), men forskjellige arter gir forskjellig utbytte (Yang et al. 2009). Hos *C. thermocellum* er det nylig vist at sporulering ikke skjer ved mangel på karbon eller nitrogen, men ved mangel på vitaminer, ved substratforandringer (både fra cellulose til cellobiose og omvendt) og som følge av oksidativt stress (Mearls et al. 2012). Sporulering hos *C. perfringens* og *C. acetobutylicum* induseres av låg pH (Wrigley et al. 1995), mens hos *C. cellulolyticum* blir sporulering induert av begrensinger på karbon og nitrogen, låg pH og uløselige karbonkilder (Mearls et al. 2012; Payot et al. 1999; Desvaux & Petitdemange 2002). Det ser således ut til at forhold som favoriserer sporulering er mer varierte hos klostridier enn hos baciller.

### 5.1.2 Germinering

Prosessen der en spore våkner til liv og blir til en vegetativ celle igjen, kalles germinering. Under forhold som er fordelaktige for vekst, særlig ved tilstedeværelse av næring, vil en spore ofte germinere. For mange arter av patogene sporedannere er germinering et tidlig

og helt nødvendig trinn i patogenesen. Kunnskap om germinering er derfor viktig for å forhindre sykdom. Germinering blir ofte trigget av lavmolekylære næringsstoffer som aminosyrer, purinderivater eller sukker. Disse stoffene kalles da germinanter. Hver art har forskjellige krav til hvilke stoffer de reagerer på. Man antar at disse lavmolekylære stoffene passerer gjennom ytterlagene til sporen, og binder seg til reseptorer (Ger) som sitter i den indre membranen (Paredes-Sabja *et al.* 2011), men mekanismer rundt denne prosessen er delvis ukjente. Binding av Ger-reseptorer fører til frigivelse av dipicolinsyre og ioner, som igjen fører til nedbrytning av sporekappen og vannopptak i kjernen. Hvor stabile sporer er og hvor raskt de germinerer, kan variere mye selv hos en stamme. Under hvilke forhold sporuleringen skjer og hvordan sporen lagres vil ha stor betydning for hvor lett sporen vil germinere. Dette gjør det vanskelig å si noe om stabilitet hos sporer som finnes i naturlige miljøer og er dannet under ulike forhold.

I laboratoriestudier er det vist at L-asparagin, kalium- og natrium-ioner vil indusere germinering hos *C. perfringens* (Paredes-Sabja *et al.* 2011), og at *C. botulinum* sporer konsekvent vil germinere og produsere toksin under strikt anaerobe forhold i biffmedium ved pH 4.6 (Wong *et al.* 1988). For lavere pH enn 4.6 er surgjøring med saltsyre mer toksisk for germinering enn surgjøring med sitronsyre. *C. botulinum* er vist å være i stand til å germinere ved pH 3.7, men dette var i en 3 % kjøttproteinløsning med et inokulat på  $10^7$  sporer, og det tok 35 uker før vegetative celler og toksin ble observert (Wong *et al.* 1988).

Det finnes lite kunnskap om sporulering/germinering i husdyrrelevante miljø som jord, planter i vekst, fordøyelseskanalen, surfôr, gjødsla og mjølka. Dette skyldes at nesten alle studier er gjort i laboratoriemedier og fortrinnsvis på human patogene arter eller kommersielt nyttige arter som *B. subtilis* og *C. acetobutyricum*. Hvordan prosesser som høsting, fermentering, lagring av fôr og gjødsel påvirker sporulering, germinering og reproduksjon av de ulike bakteriene vet man svært lite om.

## 5.2 Faktorer som påvirker vekst hos noen sporedannere

Låg pH, lågt vanninnhold og tilstedeværelse av nitritt hemmer i sin alminnelighet vekst av både klostridier og baciller, men det er forskjell mellom artene med hensyn til hvor sensitive de er for de ulike miljøfaktorene. Baciller er generelt mer følsomme for låg pH enn klostridier. Når det gjelder temperatur, vil bacillene vanligvis ha det relativt varmt (Tabell 5.2.), men det finnes arter som vokser godt ned mot  $10^{\circ}\text{C}$ , slik også *C. butyricum* og *C. tyrobutyricum* gjør. Baciller tåler generelt høyere saltkonsentrasjoner og lågere vannaktivitet enn klostridier. Klostridier foretrekker en atmosfære med 2-10 %  $\text{CO}_2$ , men de varierer i  $\text{O}_2$  toleranse. Noen stammer er strikt anaerobe og vil ikke vokse selv med svært små mengder med  $\text{O}_2$  tilstede, mens andre arter, f.eks. *C. perfringens* er aerotolerante.

Tabell 5.2. Faktorer som påvirker vekst hos noen sporedannende bakterier. Verdiene angir ytterpunktene for vekst hos de ulike artene.

Art	Vekst betingelser	O <sub>2</sub>	Temp °C	Tåler NaCl	N <sub>2</sub> fix <sup>1</sup>	Vann Aktivitet	pH	Gass prod
<i>C. tyrobutylicum</i> <sup>2</sup>			12-43	3 %	+/-	0.95	5-7.5	
<i>C. butyricum</i>			10-37		+	0.95	4.2-7	
<i>C. sporogenes</i>			20-45		-		5.2-8.5	
<i>C. perfringens</i> <sup>4</sup>	Vokser rask	Aero tolerant	15-50		+/-	0.95	5.5-8	
<i>C. botulinum</i> <sup>3,5,6,7,8</sup>	Vokser sakte	Meget strikt anaerob	Gr. I: 13-48 Gr II: 6-40	3 %	-	0.92 vekst (0.96 toksindannelse)	4.6-8	H <sub>2</sub> S Ammonia
<i>C. chauvoei</i>	Vokser sakte	Strikt anaerob	20-42		+/-		5-8	
<i>C. novi</i>		Strikt anaerob	25-45		-		8	
<i>C. septicum</i>	Vokser raskt	Strikt anaerob	20-44		+/-			
<i>C. tetani</i>	Vokser sakte	Strikt anaerob	25-42		-		6-8	H <sub>2</sub> S Ammonia
<i>B. cereus</i> <sup>9</sup>	Vokser raskt	Fakultativ anaerob	10-45	7 %		0.93	6-7	
<i>B. anthracis</i> <sup>9</sup>	Vokser raskt	Fakultativ anaerob	20-40	7 %		0.92	6-7	
<i>B. licheniformis</i> <sup>9</sup>	Vokser raskt	Fakultativ anaerob	15-55	7 %		0.92	5.7-7	

<sup>1</sup>Rainey et al. (2009), <sup>2</sup>Ruusunen et al. (2012), <sup>3</sup>Wong et al. (1988), <sup>4</sup>Strong et al. (1970), <sup>5</sup>Lindstrøm et al. (2010), <sup>6</sup>Hinderink et al. (2009), <sup>7</sup>Derman et al. (2011), <sup>8</sup>Dodds (1989), <sup>9</sup>Logan & De Vos (2009).

### 5.3 Anaerobe sporedannere

*Clostridium*-slekten består av rundt 200 arter. De fleste er ufarlige bakterier i miljø, planter, hud, slimhinner og særlig i tarminnhold hos dyr og mennesker, men noen av artene er patogene og kan gi alvorlig sykdom. De ulike artene skilles ofte på gener som koder for 16S rRNA, men de kan også skilles på toksinproduksjon, overflateantigener, anaerob metabolisme, prosentvis G-C innhold og på basis av genomsekvens-homologi. Klostridieartene deles ofte inn i grupper. Ulike fagmiljø bruker noe forskjellig inndeling.

#### 5.3.1 Sykdomsframkallende/patogene, anaerobe sporedannere

Mellom 40 og 50 klostridiearter kan knyttes til sykdom hos dyr eller menneske. Femten av disse regnes som betydelige patogener, hvorav flere produserer toksiner. I *Clostridium*-slekten finnes arter som produserer toksiner som er blant de mest potente man kjenner til, som for eksempel tetanustoksin (stivkrampe) produsert av *C. tetani* og botulinumtoksin produsert av *C. botulinum*.

De patogene slektene og artene deles ofte inn i tre hovedgrupper i henhold til patogenesen (Tabell 5.3). De neurotoksiske klostridiene produserer toksiner som virker på nervesystemet på et annet sted enn der toksinet blir produsert. Histotoksiske (vevstoksiske) klostridier produserer toksiner som hovedsakelig virker der bakteriene vokser. De endogene infeksjonene skjer etter inntak av fôr kontaminert med sporer, mens malignt ødem og gassgangren forårsakes av kontaminasjon av sår med klostridiesporer. Enteropatogene klostridier omfatter i hovedsak *C. perfringens*.

Tabell 5.3. Inndeling av de mest vanlige patogene klostridier hos storfe i hovedgrupper etter patogenese.

Hovedgruppe	Art	Kliniske symptomer
1. Neurotoksiske	<i>C.botulinum</i> <i>C.tetani</i>	Botulisme stivkrampe
2. Histotoksiske		
a. Endogen infeksjon	<i>C.chauvoei</i>	Miltbrannemfysem
b. Malignt ødem og gassgangren	<i>C.septicum</i> <i>C.perfringens, type A</i> <i>C.novyi, type A</i> <i>C.chauvoei</i> <i>C.sordellii</i>	
3. Enteropatogene	<i>C.perfringens</i>	Matforgiftning

Diagnostikk av klostridiesjukdommer er generelt vanskelig. Mange klostridier er naturlig forekommende blant anna i fordøyelseskanalen hos dyra og man er derfor avhengig av påvist toksinproduksjon eller kvantifisering for å stille diagnose. På kadavre får man relativt rask framvekst av klostridier og dette er utfordring ved undersøkelse av døde dyr. For mange av sjukdommene vil diagnose bli basert i hovedsak på kliniske funn, og disse kan være uspesifikke. Flere av disse sjukdommene gir også så raskt sjukdomsforløp og har så høy dødelighet, at sannsynligheten er stor for at de fleste dyr som er døde av disse sjukdommene er registrert som «sjøldød» uten at videre undersøkelser blir gjort. Siden patogene klostridier finnes i jord og i tarmkanalen hos friske dyr, er utryddelse av bakteriene er ikke aktuelt, og kontroll av infeksjonene må skje ved ulike forebyggende tiltak. I andre land er vaksine i omfattende bruk på storfe, mens det hos oss bare brukes i enkelte besetninger og områder.

### 5.3.1.1 *C.chauvoei* - miltbrannemfysem

Miltbrannemfysem (også kjent under betegnelsene raslesjuke, blackleg, blackquarter) har vært en velkjent storfesjukdom i områder av Norge i lang tid. Fra gammelt av ble det

regnet som en form for miltbrann, derav navnet. Sjukdommen har vanligvis et akutt forløp med nekroser, ødem og emfysem i skjelett- og hjertemuskulatur. Rasktvoksende dyr mellom ½ år og 2 år ser ut til å være mest utsatt. Det er vanligvis ungdyr med god tilvekst som dør. Dyr som først har utviklet sjukdomstegn har dårlig prognose, og de fleste dør innen 1-2 døgn. Sjukdommen må antas å være smertefull.

*C. chauvoei* kan ramme flere dyrearter. Den kan gi sjukdom hos sau, men med lågere forekomst. Det har ikke blitt ansett å være zoonose, men det er i det siste rapportert om noen få humane tilfeller. Det har vært i forbindelse med omfattende traumer med kontakt med jord. *C. chauvoei* og *C. septicum* er svært like og ble tidligere av enkelte regnet som samme art. Ved miltbrannsemfysem finnes noen ganger også andre klostridiearter som *C. septicum* og *C. novyi* (Radostits *et al.* 1994). >Om det da er snakk om en saminfeksjon der *C. chauvoei* blir overvokst, eller om denne bakterien ikke nødvendigvis trenger være tilstede, er uvisst.

Det er blitt hevdet at *C. chauvoei*-sporer som tas opp via fôr kan germinere og eventuelt oppformerer i tarm, og at sporer eller vegetative bakterier fraktes ut i vevet i form av immunceller (van Vleet 2007). Det er imidlertid mangelfull dokumentasjon i litteraturen på disse påstandene. Sporer regnes å være lite immunogene og det er uklart hvorvidt immunceller i det hele tatt gjenkjenner dem som kroppsfremmede. Det er heller ikke funnet dokumentasjon i litteraturen om påvisinger av sporer fra *C. chauvoei* eller andre klostridier i blod. Hvor vanlig slike sporer er forekommende i vev er også uklart, men sporer av *C. Chauvoei* er påvist i lever og muskulatur hos friske dyr (Kerry 1964; Groseth *et al.* 2013). Hvor vanlig det er, og om det også gjelder for dyr i områder uten miltbrannsemfysem-tilfeller, er uklart.

I et pilotstudium av Groseth *et al.* (2013) ble *C. chauvoei* påvist i leverprøver tatt ved slakteri, både fra dyr som hadde stått i en besetning der andre dyr hadde dødd av miltbrannsemfysem, og fra noen av kontrolldyra som kom fra områder og besetninger der sjukdommen ikke har vært kjent. Det så imidlertid ut til å være forskjeller i nivået av sporer mellom de to gruppene.

Det er antatt at sporer i muskulatur aktiveres ved låg oksygenmetning i vevet, slik som ved traumer og blødninger i muskulatur, og at de vegetative bakteriene deretter produserer toksiner som gir nekroser i skjelett- og hjertemuskulatur. *C. chauvoei* produserer fem forskjellige toksiner som regnes som viktige virulensfaktorer. Dette inkluderer  $\alpha$ -toksin ( $O_2$ -stabil hemolysin),  $\beta$ -toksin (DNase),  $\gamma$ -toksin (hyaluronidase),  $\delta$ -toksin ( $O_2$ -labilt hemolysin og en neuroamidase). En slik patogenese skulle tilsi at sjukdommen kunne utvikles når ellers friske dyr får omfattende traumer og/eller høg stressbelastning som f.eks ved transport. Det virker imidlertid ikke å være tilfelle. Forekomsten av sjukdommen indikerer heller at sjukdom opptrer når mengden inntatte sporer kommer over et visst nivå. Deretter vil stress og håndtering muligens øke risikoen for germinering og toksinproduksjon i muskulaturen.



*Bilder fra utbruddet av miltbrannsemyseme på Hadeland 2010. Bildet av den døde oxen viser utfloed fra naturlige åpninger som ved miltbrann. Foto: Ragnhild Merli, NVH.*

Sjukdommen har tradisjonelt vært en beitesjukdom, og gjerne i regnfulle somre. Det har derfor vært antatt at stigning av grunnvannet eller flom fører at sporene flyter opp i øvre sjikt av vannspeilet, og at dyra får det i seg når de drikker og/eller at det settes av sporer på beitegraset. Der sjukdommen opptre i tørre somre har det vært forklart ved at storfe får tilgang til myrområder som de ellers ikke oppsøker, der forekomsten av sporer kan være høgere. De berørte distrikter har i Norge vært angitt å være Vestlandet og enkelte distrikt på Østlandet, i første rekke i Gudbrandsdalen med sidedaler og Valdres (Aas Hansen 1990). I helsekortsystemet har miltbrannsemyseme egen kode (243). Antallet registreringer i Kukontrollen er på 278 registrerte tilfeller og 4 636 vaksineringer i perioden 1998-2010. 70 veterinærer har registrert sjukdommen.



Figur 5.3 Oversikt over kommuner med registrering av miltbrannemfysem (kode 243) eller vaksinasjon mot miltbrannemfysem (kode 743) i perioden 1998-2010.

Den senere tida er det registrert utbrudd også i andre områder, særlig på Romerike, Østfold, Hadeland og Nordland (Groseth *et al.* 2011 (Figur 5.3)). Det er også observert utbrudd på innefôring (Groseth *et al.* 2011), noe som også er observert i andre land. I en besetning på Hadeland døde 72 slakteokser høsten 2010. Flere nye områder er rammet. Veterinærer i felt beskriver ofte en situasjon der det først kommer et par tilfeller i en besetning, så går det noen år, og så rammes flere dyr i samme besetning og også andre besetninger i samme område. I en del områder er miltbrannsemfysem et stort problem.

Forurensing av fôr med jord har vært regna som viktigste risikofaktor for sjukdomsutvikling på innefôring, uten at dette er bekreftet i studier. Det er uvisst hvordan agens spres til nye områder. Både omsetning av fôr fra endemisk område og flytting/omsetting av levende dyr har blitt mistenkt som smittekilde.

Ved vellykket ensilering vil låg pH forhindre vekst av de fleste klostridier. Klostridiesporer vil imidlertid overleve ensilering. Ved svikt i ensileringsprosessen kan anaerobe forhold og rikelig tilgang på organisk materiale gi gode vekstvilkår for alle typer klostridier, også *C.chauvoei*. Ved produksjon og lagring av fullfôr er det flere faktorer som kan bidra til økt bakterievekst. Alternative fôrmidler, som for eksempel mask, har også blitt mistenkt å representere en risiko for smitte med *C.chauvoei* uten at dette er dokumentert gjennom analyser. Ved produksjon av fullfôr vil dessuten fôret kuttes og homogeniseres i større grad enn ellers. Dette fratår dyra muligheten til å vrake jord og andre elementer som kan være kontaminert med sporer av *C.chauvoei* så vel som andre sporedannere.



Høgt nivå av energi og protein i fôret gir gunstige forhold for deler av mikrofloraen i fordøyelseskanalen. Intensiv fôring kan dermed tenkes å gi økt oppformering også av *C. chauvoei*. En del av disse sporene vil skilles ut gjennom avføring og kontaminere miljøet. Hvorvidt *C. chauvoei* kan germinere og vokse utenfor dyret er ikke avklart. Sporene kan muligens germinere og oppformerer i gjødsellagere dersom det foreligger anaerobe forhold. Ved spredning av blautgjødning på eng og beite kan en dermed se for seg en effektiv fullføring av smittesyklus.

Internasjonalt brukes det i utstrakt grad vaksine mot miltbrannsemfysem, slik det blir gjort i spesielt belasta områder i Norge. Det er tilgjengelig velfungerende og trygge vaksiner mot miltbrannsemfysem. Det er imidlertid vanskelig å gi råd om bruk av vaksine i Norge, da det er så mange forhold rundt epidemiologi som er ukjent og dermed blir riskovurdering vanskelig. Mange besetninger som har fått store tap er ikke kjent med sjukdommen fra før, slik at det har vært liten mulighet for å plukke dem ut som risikobesetninger og vaksiner har ikke blitt vurdert. Både bruk av vaksine og andre forebyggende tiltak som innbefatter større eller mindre omlegging av driftsopplegget fører til vesentlige kostnader for produsentene. Under hvilke forhold slike tiltak vil være kostnadseffektive, er uklart.

Groset *et al.* (2011) har utarbeidet en liste med faktorer som taler for bruk av vaksine mot miltbrannsemfysem, med vektning etter betydning (Tabell 5.4). Denne er laget ut ifra hva en pr i dag har av erfaring og kunnskap. Det foreligger ikke dokumentasjon på vektningen av de ulike faktorene.

Tabell 5.4. Faktorer som taler for bruk av vaksine mot miltbrannsemfysem på besetningsnivå, med vektning etter betydning (Groset *et al.* 2011).

Aktuelle faktorer	Betydning
Miltbrannsemfysem i besetningen tidligere	+++
Besetning i endemisk område	++
Bruk av homogenisert fullfôr	+
Kjent jordtilblanding i fôr	+
Risiko for jordtilblanding i fôr (innhøstingsmetode og/eller værforhold/flom)	+
Fellesbeite med dyr fra besetninger med miltbrannsemfysem	+
Innkjøp av dyr fra endemiske områder	+
Tilførsel av grovfôr og/eller gjødning fra endemiske områder	+
Stort antall dyr i mottakelig alder (økt sårbarhet)	+
Økonomiske/sosiale konsekvenser av eventuelle utbrudd (økt sårbarhet)	+

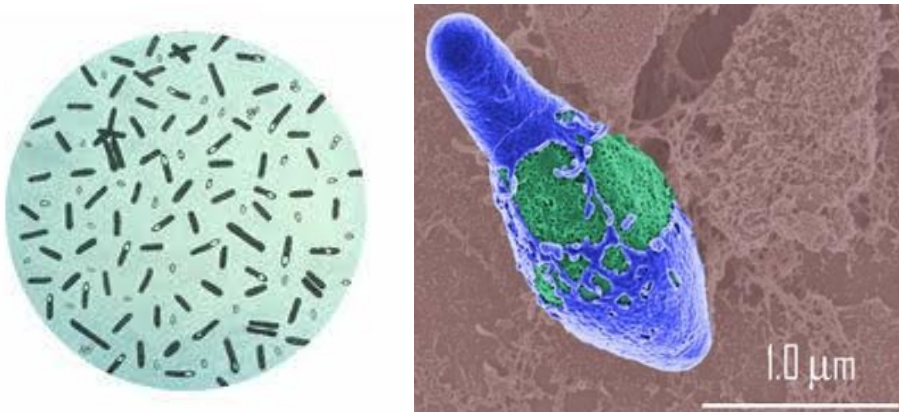
Det ble i 2008 gjennomført et prosjekt i Sverige der man ønsket å påvise *C. chauvoei* i avførings- og jordprøver. I Sverige registreres ikke tilfeller, men utbrudd av *C. chauvoei*. Årlig rapporteres om om 5-15 utbrudd av miltbrannsemfysem, men de regner også sjukdommen som kraftig underrapportert. Noen av utbruddene har også der vært omfattende. Svenskene ønsket å etablere en metode for å identifisere områder der man har stor risiko for utbrudd, der det dermed vil være kostnadseffektivt å innføre preventive tiltak. Prosjektet ble avsluttet før tiden fordi de ikke lyktes i å påvise DNA fra *C. chauvoei* i jord og avføring fra dyr i besetninger med utbrudd de siste åra (Sluttrapport, Stiftelsen Lantbruksforskning 2008). Ingen har prøvd å gjøre slike studier på vevsprøver fra dyr tatt fra slakteri, slik det ble gjort i pilotstudiet ved NVH. Det antas å være lettere å etablere

god diagnostikk på vevsprøver fra dyr, og bruke det som indikator på sporenivå i miljøet der dyra har stått.

*C. chauvoei* har i liten eller ingen grad vært gjenstand for studier med tanke på å avklare forhold som påvirker sporulering, germinering, vekst og patogenese. Å trekke konklusjoner på grunnlag av studier gjort på andre klostridiearter er ikke mulig.

### 5.3.1.2 *C.botulinum* - botulisme

*C. botulinum* er en gram-positiv stavformet bakterie (Figur 5.4). Jord regnes som bakteriens opprinnelige habitat. Bakteriens sporer kan overleve ved de fleste temperaturer og er vanskelig å drepe. De overlever f.eks. kokepunktet til vann ved normalt trykk. Den er derimot lite syretolerant.



Figur 5.4 *C.botulinum* ([http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\\_botulinum](http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_botulinum)).

Fenotypisk og genetisk danner *C. botulinum* fire distinkte grupper (I-IV, Tabell 5.5) og kan produsere syv toksin typer (A-G). Botulisme er klassisk beskrevet som en intoksikasjon med toksin fra *C. botulinum*. Flere typer klostridier er imidlertid istand til å produsere botulinum neurotoksin, slik at botulisme skyldes botulinum neurotoksin-produserende klostridier. Anaerobe forhold med proteintilgang, passende temperatur og fuktighet gir gunstige vekstforhold som gjør at sporer germinerer og produserer toksin. Slike forhold finnes særlig i kadaver som brytes ned.

Tradisjonell botulisme skjer som følge av inntak av botulinumtoksin som er preformert i fôr. Hos storfe er klassisk botulisme vanligvis forårsaket av toksin B og C. Toksin D og E påvises sjeldnere. Toksinet tas opp via mage/tarm-slimhinne, følger blodstrømmen til virkningssted. Nervetoksinet paralyserer musklene ved å blokkere acetylcholin-reseptorer

mellom muskelfibre og nerve i synapser i det autonome nervesystemet. Inkubasjonstid kan være over ei uke hvis toksinmengden er låg.

Kliniske tegn avhenger av toksindose, men varierer fra akutt død til mer uspesifikke nevrologiske symptomer. Storfe med botulisme blir slappe og får lammelser særlig i lepper, tunge, tyggemusklatur og svelg. Eventuelt kan man også se ataksi og parese. Tradisjonelt har det blitt anslått at 60-100 % av affiserte dyr dør, og at dette skjer etter 1-14 dager. Symptomene kan være noe uspesifikke, og svelglammelse kan bli mistolket som opphørt matlyst og dermed ikke alltid avslørt. Diagnostikk gjøres vanligvis basert på kliniske symptomer og utelukkning av andre årsaker til funnene. Laboratoriepåvising er sjelden aktuelt, blant annet fordi det er vanskelig.

Tabell 5.5. Fenotypiske grupper av *C.botulinum* (Lindstrøm et al. 2010)

Egenskaper	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
<b>Toksintype</b>	A, B, F	B, E, F	C, D	G
<b>Vert</b>	Menneske/dyr	Menneske/dyr	Dyr	-
<b>Form</b>	Intoksikasjon, småbarn og voksen intestinal botulisme	Intoksikasjon	Intoksikasjon, intestinal botulisme	Bacteriophage
<b>Lokalisering av toksin gen</b>	chromosome	Chromosome	Bacteriophage	Plasmid
<b>Varme-resistens hos sporer</b>	Høg	Moderat	-	-
<b>Temp/D-verdi(min)</b>	121°C/0.2	85°C/0.2-98		
<b>Nære slektninger</b>	<i>C. sporogenes</i> , <i>C. putrificum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. haemolyticum</i> , <i>C. novyi type A</i>	<i>C. subterminale</i> , <i>C. haemolyticum</i>
<b>Vektor for menneske</b>	Vegetabiler, kjøtt, hermetisert mat, honning, mjølkeprodukter	Sjømat, kjøtt, kjølt mat	Vet ikke	
<b>Vektor for dyr</b>	Silo, åtsel, korn, jord	Silo, byttedyr, åtsel, korn, sedimenter	Silo, korn, fjøreavfall	

Botulisme hos storfe er internasjonalt ikke noteringspliktig sjukdom, og det finnes ikke data på forekomst. Det er beskrevet såkalt smittsom svelglammelse fra flere land. I Norge ses det enkelte tilfeller hos storfe, ofte i form av besetningsenzootier (Aas Hansen 1990). Ved NVHs stasjonærklinikk har vi hatt omlag fem tilfeller med sterk mistanke om botulisme siste 10 år. Det har i hovedsak vært enkeltdyr. Diagnosen blir sjelden eller aldri verifisert. En gruppe storfeveterinærer i felt ble spurt om hvor ofte de mistenkte botulismetilfeller, og de rapporterte om gjennomgående få (maks ett i året) eller ingen. Det ble nevnt at det

av og til ble observert kadaver i fôret, men ikke alltid. En nevnte at de hadde hatt en del tilfeller i forbindelse med omfattende jordrotteproblem en del år.

Det er kjent en spesiell form for botulisme blant annet fra Sør-Afrika (Lamziekte) som skyldes fosfatmangel hos storfe som gjør at de slikker og spiser knokkelrester av døde dyr, som kan inneholde botulinumtoksin. «Bulbærparalyse» er tidligere beskrevet fra europeiske land og mistenkt årsak er botulisme (Aas Hansen 1990).

#### «Visceral botulisme»

De seinere åra har det, særlig fra Tyskland, blitt rapportert om en tilstand karakterisert ved økt dødelighet særlig rundt kalving, intermitterende diare, forfangenhet, ødemtendens, opptrukket buk, avmagring og slapphet. Dette har blitt satt i sammenheng med oppvekst av toksinproduserende *C. botulinum* i tarm, og en langvarig, låggradig toksinproduksjon (Böhlel *et al.* 2001; Rodloff & Krüger 2012). Tilstanden har fått betegnelsen «Visceral botulisme». Siden det kliniske bildet er lite spesifikt, og laboratoriediagnose er problematisk, er forekomsten usikker. Det har vært anslått at mer enn 2000 besetninger er rammet og over 1000 storfe skal ha dødd på grunn av denne tilstanden i Tyskland de siste par åra. Tilstanden har fått en del mediadekning, særlig siden det har blitt koplet til human sjukdom. Friedrich-Loeffler instituttet har utført en studie på antall affiserte besetninger uten at dette resulterte i pålitelige tall.

[http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/IBIZ/FLI\\_Botulismus\\_Informationen\\_2011\\_1005en.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/IBIZ/FLI_Botulismus_Informationen_2011_1005en.pdf).

Det har blitt spekulert i om mennesker kan rammes av visceral botulisme. Det ser imidlertid ut til at tilfellene hos storfe i stor grad skyldes toksin A, mens humantilfellene skyldes type E (Krüger *et al.* 2012). Visceral botulisme har også blitt kalt "multi-factorial disease dairy cow herd". Det er da foreslått at tilstanden skyldes bruk av surfôr med låg kvalitet som gir fordøyelsesproblemer og har en negativ effekt på metabolismen. Ingen av de to hypotesene om visceral botulisme er endelig bekreftet, og det er heller ikke avklart hva som skal være diagnostiske kriterier (kliniske funn og laboratoriefunn) for å stille diagnosen. I Norge har det ikke vært fokus på denne tilstanden, og det er derfor ukjent om vi har kliniske tilfeller som kan være forenelig med visceral eller kronisk botulisme.

Muligheten for at biogassanlegg kan være en årsak til økt forekomst av botulisme i Tyskland og andre europeiske land har vært diskutert. Slakteavfall og annet kjøtt, blant annet høner, sammen med blautgjødsel brukes som råmateriale i biogassanlegg. Klostridier kan germinere under denne prosessen, og oppvarming til 70 grader antas å være utilstrekkelig for å begrense forekomsten. Restmaterialet med eventuelle sporer fra slik biogassanlegg blir brukt som gjødsel på landbruksarealer og kan bidra til å øke populasjonen av sporer i jord og på planter. Sporer vil også kunne spres med støv over større områder. Beitedyr kan da få i seg høyere antall sporer enn vanlig. Disse hypotesene er så langt ikke dokumentert gjennom undersøkelser/studier.

[http://neulandwirtschaft.agrarheute.com/agrarportal/fleckvieh/inhalt/fleckvieh\\_aktuell\\_es/tiergesundheits/von\\_biogasanlagen\\_geht\\_keine\\_botulismus-gefahr\\_aus.html?redid=466592](http://neulandwirtschaft.agrarheute.com/agrarportal/fleckvieh/inhalt/fleckvieh_aktuell_es/tiergesundheits/von_biogasanlagen_geht_keine_botulismus-gefahr_aus.html?redid=466592).

Fordi bakterien har svært begrensa syretoleranse vokser den dårlig i surfôr med låg pH. Bruk av surfôr/ensilasje med høg pH har blitt knyttet til botulismeutbrudd hos storfe med de samme toksintypene som ofte gir botulisme hos mennesker (Wilson 1995). I fuktig surfôr skyldes høg pH vanligvis feilgjæring, der det er blitt produsert smørsyre på bekostning av mjølkesyre. Ensilasje produsert fra fortørka gras har derimot høg pH uten at massen er feilgjæra. I Finland ble det dokumentert et utbrudd av botulisme forårsaket av C-toksin der ni av 90 dyr døde. Det ble funnet rester av kadaver (ukjent art) i ensilasjen som hadde høg pH. Det framheves at manglende surgjøring av fôr gjør at toksin kan produseres. Toksin som allerede finnes i kadaveret når det kommer inn i fôret, vil imidlertid ikke bli inaktivert av låg pH. Det er kun bakterieveksten som hemmes ved korrekt håndtering av fôret (Myllykoski *et al.* 2009).

*C. botulinum*-sporer er påvist i sediment og tarminnhold fra ulike dyrearter i Norden (Dahlenborg *et al.* 2001; Dahlenborg *et al.* 2003). I en svensk studie ble det påvist toksin B i 73 % av undersøkte storfe og under 5 % for type E og F. De fleste positive prøvene hadde et lågt sporeinnhold (<4 sporer pr gram). Det var flere positive prøver på vinteren enn på sommeren. Dette bekrefter at påvist *C. botulinum*-sporer i tarminnhold og feces er vanlig hos friske storfe.

Betydning av innhold av botulismesporer i melk med tanke på human risiko er uviss. Pasteurisering dreper ikke sporer og kontaminering av melkeprodukter og videre spredning til mennesker kan derfor teoretisk være mulig (Lindstöm *et al.* 2010). Lågt innhold av sporer, overvekst av annen bakterieflora, veksthemmende faktorer i melka eller under foredlingsprosessene, kan være årsak til at humane tilfeller av botulisme fra melkeprodukter sjelden eller aldri ser ut til å forekomme (Lindstrøm 2010).

### 5.3.1.3 *C. tetani* - stivkrampe

*C. tetani* forårsaker stivkrampe og entrer verten gjennom sår i huden og danner nervetoksinet tetanospasmin. Stivkrampe kan effektivt forhindres med vaksine som lages av inaktivert toksin. Dette brukes ikke til storfe fordi det er umulig å forutsi hvilke dyr som har økt risiko for å rammes. Bakterien finnes i jord og i fordøyelseskanalen hos (friske og sjuke) dyr. *C. tetani* har, når den studeres i mikroskop, form som en tenniseracket (Figur 5.5).



Figur 5.5. *C. tetani*. (<http://www.docstoc.com/docs/123452532/clostridium-tetni>)

Dyr med stivkrampe får stive bevegelser, etter hvert vansker med å ete og drikke, og deretter muskelspasmer. Hodet holdes strakt fram, ørene blir stive, ryggen buet oppover, halen lett løftet, tympani og låst kjevebevegelse. Det forekommer en del tilfeller hvert år i Norge (Aas Hansen 1990). Ved NVHs stasjonærklinikk kommer det anslagsvis 1-2 storfe med tetanus i året. En liten gruppe erfarne veterinærer med hovedsakelig storfepraksis på ulike steder i Norge ga ved forespørsel inntrykk av at de fleste har sett mindre enn fem kasus i løpet av karrieren. Stivkrampe gir relativt spesifikke kliniske symptomer, slik at en må forvente at de fleste tilfeller blir tilsett av veterinær og at en forholdsvis høy andel av dem blir gjenkjent som tetanus. Mange kjenner tilstanden bedre fra hest. Det blir aldri gjort laboratoriediagnostikk for å konfirmere diagnosen. Sjukdommen må antas å være mer vanlig enn botulisme. Nesten alle affiserte dyr dør.

Hos storfe er inngangsport oftest ikke påvisbar, bortsett fra dårlig hygiene ved for eksempel fødselshjelp. Det er også kjent at flere dyr i samme besetning kan rammes, noe som skulle tilsi at opptak via fôr også er mulig. Det kan tenkes at sporene germinerer i tarmen og at det er lokal toksinproduksjon der, men dette er ikke dokumentert (Mainil 2006).

#### **5.3.1.4 *C.septicum***

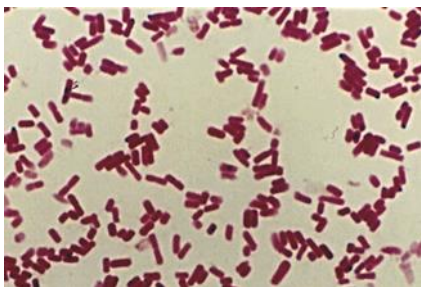
*C.septicum* er obligat anaerob. Bakterien er motil og bruker flagell(er) til å navigere fra ett miljø til et annet. *C. septicum* fermenterer sukker, aminosyrer og andre organiske substrater med hydrogengass og karbondioksid som respirasjonsprodukter ([http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\\_septicum](http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_septicum)).

Bakterien finnes naturlig i tarmfloraen hos dyr og mennesker, men kan infisere gjennom sår og forårsake gassgangren. Den er til forveksling lik *C.chauvoei* (se over). Den er årsak til malignt ødem, som ligner miltbrannsemfysem, men skyldes lokal infeksjon og toksinproduksjon i forbindelse med sår etter kastrering eller andre kirurgiske inngrep, injeksjoner osv. Hvis flere dyr har gjennomgått samme prosedyre og utviklet malignt ødem, kan det være til forveksling likne et utbrudd av miltbrannsemfysem.

#### **5.3.1.5 *C.perfringens***

De enteropatogene klostridiene er i hovedsak *C.perfringens* type A til E. *C. perfringens* er en ikke bevegelig anaerob sporedannende bakterie. Den er en Gram-positiv, stor, stav. Den lager terminale sporer og produserer en rekke ulike toksiner. *C.perfringens* påvises vanlig i surfôr.

*C. perfringens* klassifiseres i fem toksintyper (A, B, C, D og E) etter produksjon av de fire hovedtoksinene, alfa, beta, epsilon og iota. *C. perfringens* kan danne opptil 15 forskjellige toksiner som inkluderer de letale toksinene perfringolysin, enterotoksin og bet2-toksin.



Figur 5.5. Mikroskopbilde av *C. perfringens*

*C. perfringens* kan gi tarminfeksjoner hos mange arter, inkludert storfe, og er et stort problem hos både sau, geit og fjørfe. Denne typen infeksjon kalles ofte enterotoksemi siden toksiner som produseres i tarmen kan absorberes og gi systemiske infeksjoner. Dette gjelder ikke alle *C. perfringens* toksiner. I tillegg er *C. perfringens* ofte årsaken til gassgangren (vevsnekrose) både hos mennesker og dyr. Gassgangren er primært forårsaket av *C. perfringens* alfa toksin (CPA).

Tabell 5.6 Enteropatogene klostridier hos storfe

Art	Kliniske symptomer	Vert
<i>C. perfringens</i> type A	Enteritt og enterotoksikasjoner	Nyfødt og unge kalver
<i>C. perfringens</i> type B	Enterotoksikasjoner med nekrotisk/hemoragisk enteritt, brå død	Nyfødt
<i>C. perfringens</i> type C	Enterotoksikasjoner med nekrotisk/hemoragisk enteritt, brå død	Nyfødt
<i>C. perfringens</i> type D	Enterotoksikasjoner med og uten nekrotisk/hemoragisk enteritt, brå død	Unge kalver
<i>C. perfringens</i> type E	Hemoragisk enteritt, brå død	Unge kalver
<i>C. septicum</i>	Hemoragisk enteritt	Nyfødt og unge kalver
<i>C. sordellii</i>	Muligens involvert i enteritt og brå død	Alle aldre
<i>C. difficile</i>	Muligens involvert i mild enteritt	Nyfødt og unge kalver

*C. perfringens* er en vanlig årsak til matforgiftning hos menneske. Det er enterotoksinet produsert av type A som gir matforgiftning i vår del av verden. Bare ca 5 % av stammene

som isoleres danner enterotoksin

(<http://www.nvh.no/PageFiles/691/C.%20perfringens%20Senteret.pdf>).

Mastitt hos stofe forårsaket av *C. perfringens* forekommer sporadisk. Klinisk kan man observere perakutte og akutte forløp med tydelig nedsatt allmenntilstand. Gangren og sepsis kan utvikles relativt raskt ved infeksjon, mjølka blir tynn, brunaktig og det er gassproduksjon i kjertelen. Terapien vil som oftest være rettet mot å redde kua fram til den kan slaktes, fordi kjertelen oftest blir ødelagt.

### 5.3.1.6 *C.novyi*

*C.novyi* (*oedematiens*) finnes ofte i jord og avføring. Den er patogen og forårsaker en rekke sykdommer i menneske og dyr. Den finnes i tre typer, A, B, og en ikke-patogen type C, og typene skilles på grunnlag av toksinene de produserer. Ved klinisk mistanke om miltbrannsemfysem blir det av og til påvist *C. novyi*.

Tabell 5.7. Toksiner produsert av *C.novyi*

<i>C. novyi</i> type	Toksiner
A	Alpha (ødema, nekrotiserende), gamma, delta (O <sub>2</sub> labilt hemolysin), epsilon (lecithinovitelin)
B	alpha, beta (hemolytisk, nekrotisk lechitinase), zeta (hemolysin)
C	gamma(hemolytisk lechitinase)

Av og til blir *C.haemolyticum* inkludert som *C. novyi* type D, mens de øvrige *C. novyi* er nært beslekter med *C. botulinum* type C og D.

### 5.3.2 Anaerobe sporer som forårsaker kvalitetsproblemer i fôr og mjølk

I all hovedsak er det andre klostridier som forårsaker kvalitetsproblemer i fôr og mjølk enn de som gir sykdom hos dyra. Ved fermentering av plantemateriale er det i underkant av 10 arter som har vesentlig betydning og *C.tyrobotyricum* dominerer (70 %) både i surfôr og mjølk (Johnsson *et al.* 1990; Flodin 2009).

I tilknytning til fôr- og mjølkehygienespørsmål har det vært vanlig å dele klostridiene inn i grupper etter hvilke substrater de i hovedsak bruker i sin metabolisme. Klostridier som i første rekke fermenterer sukker og organiske syrer og i liten eller ingen grad proteiner og aminosyrer (f.eks. *C.butyricum*, *C.tyrobotyricum* og *C.paraputrificum*) tilhører gruppen sakkaryolytiske klostridier. Arter som i hovedsak fermenterer aminosyrer, enten ved



deaminering eller dekarboksylering (f.eks. *C.sporogenes* og *C.bifermentans*) tilhører gruppen proteolytiske klostridier. Under proteinnedbrytinga forårsaka av protelytiske klostridier kan det blant annet dannes aminer og amider som kan være skadelige for dyrehelsa.

Paholow *et al.* (2003) grupperte klostridiene i henholdsvis proteolytisk gruppe, *C.Butyricum*-gruppe, og *C.tyrobutyricum*-gruppe. At *C.tyrobutyricum* er skilt ut som egen gruppe skyldes at den har en særskilt evne til å fermentere mjølkesyre ved låg pH (Tabell 5.3). Det er dette som ofte er karakterisert som «smørsyregjæring» og bakterien som forårsaker det omtales ofte som smørsyrebakterie (Driehuis 2012).

Tabell. 5.3. Dominerende klostridier i ensilasje og deres karakteristika (etter Driehuis 2012).

Karakteristikk	Proteloytisk gruppe	<i>C. Butyricum</i> -gruppe	<i>C.tyrobutylicum</i>
Arter	<i>C.sporogenes</i> <i>C.bifermentans</i> <i>C.baratii</i>	<i>C.butyricum</i> <i>C.beijerinickii</i> <i>C.acetobutyricum</i> <i>C.saccharolyticum</i> <i>C. disporicum</i>	<i>C.tyrobutyricum</i>
Minimum pH for vekst	>5	>4.5	>4.2
Substrat for fermentering			
Proteiner	+	-	-
Karbohydrater	+	+	+
Monosakkarider	Variabelt	Mange	Få
Mjølkesyre	Noe	-	+

### 5.3.2.1 *C.tyrobutyricum*

*C.tyrobutyricum* regnes som apatogen for mennesker og dyr, men er på grunn av sin dominans og egenskaper den arten som blir regnes som den viktigste med tanke på fôr og mjølke kvalitet.

Bakterien har høg toleranse for låg pH og vil under slike forhold utnytte mjølkesyre som substrat for sin metabolisme, med smørsyre, H<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> som produkt. Denne prosessen gjør at fôret blir mindre næringsrikt (smørsyre har lågere energiverdi enn mjølkesyre), fôropptaket blir mindre og ved høge konsentrasjoner av smørsyre produseres acetoacetat som har ketogen effekt på dyra. Massiv vekst av *C. tyrobutyricum* vil videre føre til økt pH, som igjen kan resultere i økte framvekst av mindre syretolerante arter, deriblant patogener (Driehuis & Elferink 2000).

Optimumstemperatur for *C.tyrobutyricum* er 30-37°C. Ved 25°C er veksten moderat, og den vokser dårlig eller overhodet ikke ved 45°C. Optimum pH for vekst er mellom 5,0 og 5,5 (jfr Kap 5.2). Det er verdt å merke seg at det er de samme faktorene som har betydning for eventuell vekst av *C.tyrobutyricum* i ensilasje og mjølk: pH, vannaktivitet, tilstedeværesle av mjølkesyre og dessuten nitritt (Driehuis 2012).

### 5.3.2.2 *C.butyricum* og *C.acetobutylicum*

*C.butyricum* og *C.acetobutylicum* er stort sett apatogene, men representerer noe av de samme problemene som *C.tyrobutyricum* siden de bryter ned proteiner og aminosyrer under produksjon av smørsyre og proteinderivater (amider, aminer). I deler av litteraturen omtales *C.acetobutylicum* som *C.acetobutyricum*.

*C.butyricum* finnes i jord og i tarmen hos friske dyr og mennesker, og er brukt som probiotika til mennesker og dyr. Bakterien kan forbedre konsistensen på avføring og forhindre antibiotika-assosiert diarée.

*C.acetobutylicum* påvises ofte i surfôr. Den er ellers kommersielt brukt (Weizmann Organism) til produksjon av aceton, etanol og butanol fra stivelse og anses som ikke-patogen. Den skiller lett fra sine mer patogene slektninger ved at den ikke produserer gelatinase (protease med gelatin som substrat).

## 5.4 Aerobe sporedannere

Baciller er Gram-positive, stavformede, sporedannende bakterier. De kan være obligat aerobe eller fakultativt anaerobe, og er positive for enzymet katalase. Medlemmer av genus *Bacillus* (266 arter) er funnet overalt i naturen og er det genera med størst 16S-diversitet og inkluderer alt fra apatogene til svært patogene arter f.eks. *B. anthracis*. Baciller har tradisjonelt blitt sett på som jordorganismer. Årsaken til dette er at ved dyrking av bakterier fra jord har man fått opp en stor mengde bacillus-arter. I seinere år har sporer av bacillus-arter blitt påvist i stein, støv, vannmiljø og i tarm på ulike insekter og dyr (Nicholson 2002). I enkelte tilfeller har det blitt påvist symboise mellom vertsdyr og bacillus-arter for eksempel ved at sporer er viktig i utviklingen av immunsystemet (Rhee *et al.* 2004). Flere *Bacillus*-arter (særlig *B.subtilis*) er mye brukt i industrien blant annet for produksjon av antibiotika og forskjellige enzymer særlig brukt i vaskemidler. Bacitracin, polymyxin, difficidin, subtilin og mycobacillin er antibiotika produsert av *B. subtilis*. *Bacillus* blir også mye brukt som testorganismer for varme (autoklaver) og desinfeksjonsmidler fordi sporene er kjent for å være svært resistente.

I slekten *Bacillus* er det miltbrannbakterien *B. anthracis* som regnes for den viktigste bakterien siden den gir en alvorlig dyresjukdom og er en viktig zoonose. *B. cereus* lager store vanskeligheter i meieriindustrien der spredning fra jord og gras til kuas jur og spener, og derfra til råmelk, er et stort problem. Dette problemet forsterkes av at sporene overlever pasteurisering og er mer hydrofobe enn sporer fra andre *Bacillus* spp. Dette gjør at de lettere adhererer til flere typer overflater og er dermed vanskeligere å fjerne ved vasking.

#### 5.4.1.1 *B.cereus*

*B.cereus* gruppen er en viktig undergruppe av genus *Bacillus*, som inkluderer sju arter; *B.cereus*, *B.thuringiensis*, *B.anthraxis*, *B.mycoides*, *B.pseudomycoides*, *B.weihenstephanensis* og *B.cytotoxicus*. Medlemmene i *B.cereus* gruppen er store bakterier (cellebredde > 0.9 µm) som produserer sentralt til terminal liggende ellipsoide eller sylindriske sporer som ikke utvider cellen. De sporulerer lett i de fleste media etter 1-3 dager. De har svært like 16S og 23S rRNA-sekvenser noe som indikerer at de stammer fra en felles evolusjonær linje. *B.anthraxis* er nært beslektet med de andre artene i *B.cereus* gruppen når det gjelder rRNA sekvens, men skiller seg ut når det gjelder patogenisitet.

I ett tilfelle har *B.cereus* forårsaket anthrax-like symptomer, noe som gjør det vanskelig å peke på definitive kriterier for å skille mellom *B.anthraxis* og *B.cereus*. *B.thuringiensis*, som brukes som biopesticid, er også svært lik *B.cereus*. Genomesekvensering har vist at det ikke er noen taxonomisk grunn for å skille disse to artene, men navnet *B.thuringiensis* er forbeholdt de stammer som produserer krystallinske forbindelser som er toksiske for insekter.

*B.cereus* er en vanlig jordsaprophytt som ofte blir funnet i råmateriale og ingredienser til matindustrien, slik som grønnsaker, stivelse, krydder. Som nevnt innledningsvis forårsaker også sporer av *B.cereus* problemer også for meieriindustrien (konsummelkprodukter). *B.cereus* tilpasser seg lett forskjellige temperaturer, og er rapportert å kunne vokse helt fra ca 4 °C til 50 °C. (Anderson 1997).

Hos menneske gir *B.cereus* to ulike typer matforgiftning: diarétypen dominert av magekramper og vandig diaré, og den emetisk typen dominert av kvalme og oppkast. Enterotoksinene som forårsaker diaré lages under vegetativ vekst i tynntarmen, mens det emetiske toksinet er preformert i maten. Det emetiske toksinet er svært stabilt og tåler høy temperatur ved oppvarming av mat, og låg pH i magesekken.

*B.cereus* forekommer sporadisk som mastittagens hos storfe. Spene- og jurskader gir økt risiko for å få sporene i kontakt med vev. Klinisk kan man observere perakutte og akutte forløp med tydelig nedsatt allmenntilstand og sterk hevelse i juret. Sekretet er ofte rødfarget. Gangren og sepsis kan utvikles relativt raskt. Behandling kan forsøkes, men kjertelen står sjelden til å redde. Terapien vil som oftest være rettet mot å redde kua fram til den kan slaktes. Andre basiller er svært sjelden årsak til mastitt i Norge.

#### 5.4.1.2 *B.anthraxis* - Anthrax (miltbrann)

*B.anthraxis* forårsaker miltbrann som er en alvorlig sykdom hos både dyr og mennesker. Ved typiske tilfeller finner man dyret dødt med tjæreaktig, ikke koagulert blod i fra naturlige kroppsåpninger. Hvis man rekker å observere symptomene inkluderer de sterkt nedsatt allmenntilstand, høy feber, muskelskjelvinger, pustevansker, fall i

melkeproduksjon og abort hos drektige dyr. Slimhinnene blir hyperemiske og det oppstår blodig diaré. Blod i urinen og ødemer i underhuden kan av og til observeres i hals- og brystregionen. Miltbrann er en gruppe A-sjukdom og ved klinisk mistanke eller døde dyr uten annen diagnose, skal det undersøkes for miltbrann umiddelbart. Miltbrannsporere brukes også som bioterror.

De viktigste virulensfaktorene hos *B.anthraxis* er en polyaminosyrekapsel som er antifagocytær, samt to toksiner: ødemtoksinet og det letale toksinet. Toksinene benytter et tredje protein, protektivt antigen, for å komme inn i cellene. Alle disse virulensfaktorene er produsert fra to store plasmider (pXO1 og pXO2).

Miltbrann som årsak til sykdom hos husdyr og menneske er et omfattende problem i store deler av verden. Insidens varierer med jordtype, klima og preventive tiltak. Norge hadde flere tusen tilfeller fram til mellomkrigstida, deretter gikk forekomsten ned. I 1990 er det beskrevet at vi har sporadiske tilfeller, under 10 kasus årlig (Aas Hansen, 1990). Det siste kjente tilfellet her til lands var i 1993. I en del øst-europeiske land er det jevnlig tilfeller, også hos mennesker. Sverige hadde, etter nær 30 år uten utbrudd, nye utbrudd i 2008 og 2011. I 2008 døde ti dyr i en besetning på innefôring. De hadde ikke klassiske kliniske tegn utover feber og etter hvert død (Lewerin *et al.* 2010). Sannsynlig smittekilde var grovfôr kontaminert med støv og jord fra et område med flom året før. I 2011 døde 22 dyr på beite som følge av omfattende gravearbeid i området. Det ble da valgt å bruke en vaksine til storfe i området de nærmeste årene (OIE, Follow-up-report 3, 20.09.2011).

Siden miltbrann tidligere var en vanlig forekommende sykdom, er det trolig nedgravd mange tusen miltbrannskadaver i Norge. Fra 1900 til 1940 ble det registrert ca 14 000 tilfeller i landet. Sporene beholder infektiviteten lenge, men den antas å reduseres med tida. Det stemmer også med at forekomsten av sykdom har gått ned. Risikoen for utbrudd må derfor antas å være vesentlig redusert. Tilfellene fra Sverige, der situasjonen må antas å være forholdsvis lik den norske, viser imidlertid at ved spesielle forhold kan man også få omfattende utbrudd. I Sverige gjorde man i 2011 en kartlegging av tilfeller av miltbrann fram til 1960, for å bruke dette i risikovurdering i forbindelse med igangsetting av gravearbeider. Noe tilsvarende er ikke gjort i Norge. Siden det er ca dobbelt så mange storfebesetninger i Norge som i Sverige skulle man kunne anta at det er større sannsynlighet for å få utbrudd hos oss.

Vegetative bakterier er lite motstandsdyktige. Sporene kan imidlertid beholde infektiviteten lenge. Sykdommen smitter ikke direkte fra dyr til dyr. Sporene tas opp per oralt, inhaleres med luft (menneske, lungeanthrax) eller tas opp gjennom sår i huden (menneske, hudanthrax). Bakterien formerer seg antagelig kun i dyr eller mennesker, derfor er det i praksis dyrekadaver eller produkter fra infiserte dyr som er kilde til ny smitte. Åpning av graver med miltbrannkadaver er en vesentlig smittekilde. Flom kan føre til spredning av sporer. Klima ser ut til å være viktig i endemiske områder. Mye regn og høg temperatur gir tilsynelatende «anthrax-år». Det er blitt spekulert over at slike forhold gir vegetativ vekst i jord (Radostits *et al.* 1994). Kontaminering av fôr med jord og ikke behandlet kjøttbeinmel i kraftfôr, særlig importert fra land med høgere forekomst av miltbrann, har tidligere vært smittekilde. Enkelte insekter kan også overføre smitte. De

fleste antatte risikofaktorer for annen sporesjukdom må derfor også regnes å være gjeldene også for miltbrann.

#### 5.4.1.3 *B.licheniformis* (abort)

*B.licheniformis* hører til i *subtilis*-gruppen sammen med *B. subtilis* og *B.pumilus*. Dens optimale veksttemperatur er 50°C, men den kan overleve ved mye høyere temperaturer. På samme måte som *B.cereus* har arten blitt satt i sammenheng med abort hos storfe. Det kan være vanskelig å avklare om det er et tilfeldig funn, sekundær bakterievekst eller primærårsak til hendelsen. Dette ser ut til å være mest vanlig i siste del av drektigheten. I USA er det anslått at 4 % av aborter skyldes *Bacillus* spp. (Kirkbride 1993). I en finsk studie ble *B. licheniformis* påvist i 5 % av aborterte fostre (Syrjälä *et al.* 2007). Et dansk studium viser at det i aborterte fostre ble funnet *B. licheniformis* i 0,02 %. I dette studiet blir det hevdet at bakterien når fram til foster etter hematogen infeksjon hos morddyret og kryssing av placenta (Agerholm 1995). Patogenesen er omdiskutert, men mange mener at sporene inntas med fôr og at den på grunn av skader i tarmkanalen kan komme over i blodbanen og videre over i fostre. Det er også hevdet at individer med nedsatt immunforsvar er mest utsatt (Kirkbride 1993). Det reiser igjen to spørsmål; hvor vanlig er hematogen infeksjon hos voksne dyr? Og hvordan krysser bakterien placenta?

I en oppsummering av overvåking- og kontrollprogrammet for *Brucella abortus* (2000-2006) ble *B. licheniformis* påvist i 2 av 63 aborttilfelle (3 %). Ved Veterinærinstituttet er det rapportert at *B. cereus* har blitt påvist i ett tilfelle de seineste åra. Deres oppfatning er at *Bacillus* spp. forekommer som abortårsak, men ikke er en hyppig årsak (pers kom Mette Valheim). I en del andre land er det vanlig å se *B. licheniformis*-aborter som utbrudd med flere tilfeller samtidig. Det norske fôringssystemet, blant annet med noe bruk av avfall fra bryggerier og en del problemer med surfôr kvalitet, skulle imidlertid tilsi at forekomsten ville være høyere. Grunnen til relativt låg forekomst kan ligge i driftsstruktur, siden besetningene er relativt små og man oftest ikke har så mange høgdrektige dyr samtidig.

*B. subtilis* og *B. pumilis* kan ødelegge mat og gi matforgiftning.

## 6. Diagnostikk og analysemetoder

---

De samme metoder som brukes til diagnostikk av sjukdom og analyse av matvarer kan i prinsippet også brukes til å analysere fôr, gjøsel og jord. Noen ganger er det tilstrekkelig å påvise en patogen bakterie i forbindelse med diagnostikk, men ved analyse av matvarer og fôr vil man ofte vite antallet per vekt- eller volumenhet, mer eller mindre eksakt.

De aller enkleste metodene for å gjenkjenne en bakterie er å så ut prøven på spesifikke agarer som gir svar på antall av den aktuelle bakterien i prøven. Er dette en sporedannende bakterie vil eventuelle kolonier kunne stamme fra både vegetative celler og sporer. For å kvantifisere kun sporer må de vegetative bakteriene drepes ved varmebehandling før utsæd. Finnes det ikke spesifikke agarer for det man leter etter, brukes selektive agarer og man identifiserer eventuelle kolonier videre med f. eks. biokjemiske tester. PCR (Polymerase Chain Reaction) kan brukes til identifikasjon ved at 16S rRNA gener oppformerer og sekvenseres, og sekvensen blir brukt til identifiseringen. Vel så ofte brukes PCR til å stadfeste at en stamme har gener for toksinproduksjon, men da er bakterien allerede artsbestemt.

### 6.1 «Tradisjonelle» metoder

#### 6.1.1 *Platespredning*

Til kvantifisering av bakterier har det tradisjonelt vært brukt platespredning. Dette gjøres ved at et bestemt volum (100 µl) av en kjent fortykning strykes på overflaten av en agarskål. Etter inkubering telles kolonier på overflaten av agarskålen og antall CFU (colony forming units) i den opprinnelige prøven kan beregnes. Ved bruk av næringsrike medier (Blodagar eller BHI/brain heart infusionagar) vil de fleste bakterier vokse opp. Såes det ut på to parallelle skåler kan en skål inkuberes anaerobt og en aerobt, dermed kan antall anaerobe bakteriene kvantifiseres. Ved bruk av en selektiv agar som f. eks *B.cereus* selektiv agar (Oxoid) kan antall *B. cereus* i prøven bestemmes direkte. Det finnes også selektiv agar for *C. perfringens* (Merck Millipore), men ofte finnes det ingen spesifikke selektive agar for den bakterien man undersøker for. Da må man plukke kolonier fra en mindre selektiv agar og gjøre biokjemiske- eller DNA-tester på koloniene for å identifisere disse.

Ved utstryking av prøve på en agar testes et volum på 100 µl, og negative funn blir presentert som <10 CFU/g. Er bakterietallet i en prøve svært lågt blir denne metoden usikker. Ved innstøping av prøven er det mulig å teste opptil 1 ml, og man detekterer da ned til 1 CFU/g. Innstøping gjøres ved at 1 ml prøve blandes med agar som er flytende, men ikke for varm (ca 47°C) i en petriskål. Skålen inkuberes, deretter telles kolonier både i agaren og på overflaten.

For kvantitativ bestemmelse av aerobe sporer (dvs. *Bacillus*) i fôr brukes vanlig "Brain Heart Infusion" agar (BHI). 20 gram prøve veies opp og tilføres deretter buffra pepton før den overføres til rør som kokes ved 80°C i 12 minutter. Deretter settes prøven på plater, normalt med fortykning -2, -3. Platene inkuberes på 30 °C i døgn. Dersom det vokser bakteriekolonier på platene, brukes mikroskop til å confirmere *Bacillus* (stavforma). For bestemmelse av *Bacillus* i *gjødsel* brukes ofte en metode beskrevet av Ôstling (1993).

Johnsson (1990) har beskrevet en platespredningsmetode for kvantitativ bestemmelse av *C.tyrobutyricum* der prøvemateriale utsås på plater med RCA tilsatt cycloserin og nøytralrødt, etter at prøvematerialet har vært oppvarma til 80°C i 13 minutter. Platene inkuberes deretter anaerobt ved 28°C i fem dager. *C.tyrobutyricum*-kolonier skilles fra andre klostridier ved å analysere laktat-dehydrogenase aktivitet. Metoden benyttes blant annet ved Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala. Den gir en sikker identifikasjon av *C.tyrobutyricum* (Johnsson 1990).

*C.perfringens* (i mjølk) blir bestemt kvantitativt ved overflatespredning på TSC-agar som inkuberes anaerobt. *C.perfringens* og andre sulfittreducerende klostridiervil være svarte, og lyse blått under UV-lys (NMKL 2009).

Gjennom en avtale mellom TINE og det kommersielle laboratorieselskapet Eurofins, leverer langt de fleste norske mjølkeprodusenter sine fôrprøver til kjemiske- og mikrobiologiske analyser til dette laboratoriet. Hos Eurofins brukes en intern metode for bestemmelse av *C.tyrobutyricum* i fôr; 20 gram prøve veies opp og tilføres buffra pepton 1:10. Prøven overføres til rør og kokes i 12 minutter ved 80°C. Deretter ansettes prøvemateriale på RCM-plater (sannsynligvis tilsatt nøytralrødt) med uttynninger -1 og -2. Etter inkubering i to døgn foretas opptelling av smørsyresporer som (vanligvis) gir gult fargeomslag. Fra Eurofins opplyses det at man også mikroskoperer koloniene ved usikkerhet, samt at det sjekkes at det lukter surt fra skålene. Forfatterne av denne rapporten stiller seg imidlertid skeptiske til at lukt og/eller mikroskopering kan bidra til å øke sikkerheten på at det er kolonier av *C.tyrobutyricum* og ikke andre klostridiearter som telles. Alle klostridier er stavforma, og *C.tyrobutyricum* skiller seg ikke vesentlig fra de andre, og alle klostridier vil produsere syre. RCM-mediet er ikke spesielt selektivt for *C.tyrobutyricum*.

### 6.1.2 Most Probable Number (MPN)

Denne metoden regnes som en kvantitativ metode, selv om det er større usikkerhet ved denne metoden enn ved direkte utsæd på skål. MPN gjøres oftest i reagensrør ved at den opprinnelige prøven splittes i flere rør (oftest 10 x eller 2 x), og det undersøkes for vekst/ikke vekst i underprøvene. Mest sannsynlige antall (MPN) bakterier i den opprinnelige prøven blir så lest ut av en tabell etter hvilke rør det er vekst i.

I mjølk er antallet anaerobe sporer vanligvis lågt (<400/liter). Til sammenligning ligger det totale bakterietallet på over 30 000/ml (bactocunt). Ved låge bakterietall er MPN en bedre egna metode (enn platespredning). Det brukes da oftest et vekstmedium i rørene som favoriserer klostridier (RCM) og i noen tilfeller også laktatbaserte medium (BBB) som vil kunne favorisere *C.tyrobutyricum* foran andre klostridier. I noen tilfeller blir prøvene også varmebehandla før inokulering for å inaktivere/drepe vegetative bakterier. Rørene tettes

med en parafinpropp. Når parafinproppen etter inkuberinga er pressa opp i røret som følge av gassdannelse, regnes prøven som positiv. For kvantifisering av anaerobe sporer i mjølk brukes ulike varianter av MPN-metoden. I hovedsak dreier det seg om varierende antall rør og fortyntninger. Presisjonsnivået på analysen øker generelt med stigende antall rør og fortyntninger.

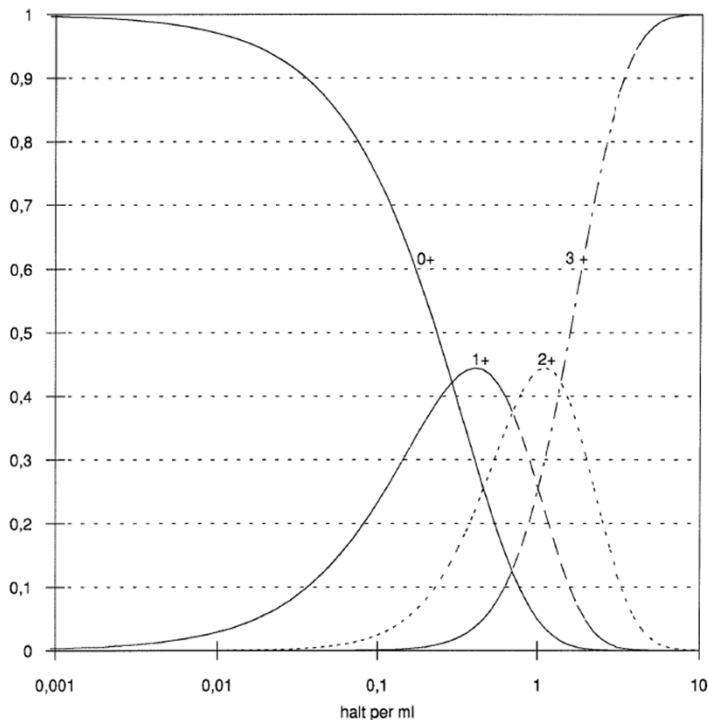
#### 6.1.2.1 3-rørsmetoden

Dersom man bare er ute etter å grovt skille prøver med henholdsvis høgt og lågt sporeinnhold, vil denne metoden kunne gi et tilfredsstillende sikkerhet og presisjonsnivå. Hvert av rørene fylles da med samme mengde av prøvematerialet. Ved gassutvikling i null, ett eller to rør, oppgis resultatet som «lågt innhold». Med gassutvikling i tre rør oppgis resultatet som «høgt innhold».

TINE benytter i dag denne metoden på lass- og leverandørprøver som grunnlag for kvalitetsbetaling. Metoden er utvikla av Svensk Mjølk og er beskrevet av Andersson & Christiansson (1992) og Andersson (1994). Rørene som benyttes av TINE inneholder Reinforced Clostridial Medium (RCM), et vekstmedium som består av bl.a. av kjøttekstrakt, pepton, gjærekstrakt, sukker, stivelse, salt og aminosyren cystein. Hos TINE omtales mediet som MRCM (modifisert RCM). I tillegg kan røra tilsettes en redoks-indikator (nøytralrødt) som gjør at man kan skille ut syredannende klostridier. Vekst av klostridier gir fargeomslag til gult. Rør med fargeomslag uten at det er gassutvikling, regnes ikke som positive.

Ved bruk av 3-rørsmetoden som grunnlag for kvalitetsbetaling er det viktig at produsenten ikke rammes av falske positive resultat. Det er stor sannsynlighet for å få «riktig» resultat, dvs tre positive rør fra prøver med høgt sporeinnhold med denne metoden. Eksempelvis er det 95 % sjans for å få tre positive rør dersom sporeinnholdet er 4,1/ml (4100/l). Ved middels høgt innhold av sporer kan man få ulike utfall. Sannsynligheten for at produsenten feilaktig får resultatet «høgt innhold» ved et middels høgt sporeinnhold på 1,0/ml er da 25 % (Andersson & Christiansson 1992). Ved et lavt sporeinnhold (0,46/ml) er sannsynligheten for å få tre positive rør bare 5 %. Ved en ny prøve (konfirmerende analyse) vil risikoen for å komme ut med falsk høg prøve være:  $0,05 \times 0,05 = 0,25$  %.

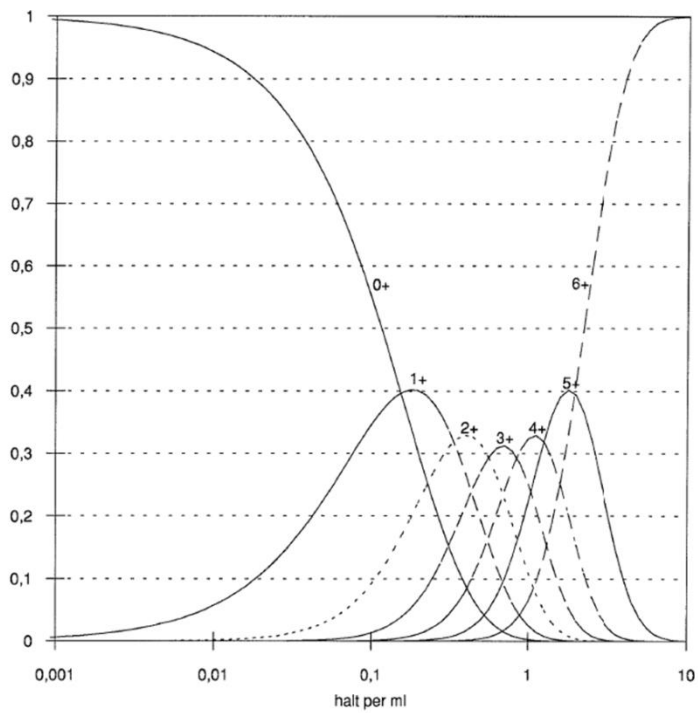




Figur 6.1 Sannsynlighet (y-aksen) for veskt i 0,1,2 eller 3 positive rør ved analyse av 3 x 1 ml mjølk (Andersson og Christiansson1992).

Ved et slikt system vil med andre ord produsenter med høgt sporeinnhold i mjølka bli avslørt med stor sannsynlighet. Det vil alltid være noen som ikke blir identifisert. Dersom man skal få tak i alle med høgt antall anaerobe sporer, vil dette urettferdig ramme en del av de som leverer melk med lågt innhold av anaerobe sporer. TINE tar i dag fire individuelle prøver samt lasseprøver før produsenten blir rammet av pristrekk. Dette innebærer at det er 0,0006 % sjans for å bli rammet av feilaktig trekk (TINE 2013).

En enkelt MPN analyse gir en god indikasjon på nivået av sporer, men gir ikke et eksakt resultat. Konfidensintervallet for MPN-talla er store. Dette skyldes at bakteriene fordeler seg tilfeldig i prøven. Presisjonen på analysen kan økes ved å øke antallet rør med samme fortynning. Som det framgår av Figur 6.2 blir da kurvene brattere og smalere, sammenligna med tre rør per fortynning (Figur 6.1). Konfidensintervallet blir mindre ved økende antall rør med samme fortynning, men man må opp i et betydelig antall rør per prøve for å oppnå vesentlig forbedring i sikkerheten. Ved å øke fra 10 til 20 rør x 1 ml vil konfidensintervallet bli redusert fra 550-2640 til 690-2100 (Andersson & Christiansson 1992).



Figur 6.2 Sannsynlighet for vekst i 0-6 rør ved analyse av 6 x 1 ml mjølk (Andersson og Christiansson 1992). X-aksen viser 95 % konfidensintervall.

### 6.1.2.2 9-rørsmetode

TINE bruker i dag en modifisert versjon av 9-rørsmetoden beskrevet av Demeter (1967) for å kvantifisere innholdet av anaerobe sporer i ystemjølkk. Det brukes i alt ni rør som alle inneholder Reinforced Clostridial Medium (RCM) og med en parafin/vaselin-propp på toppen. Tre og tre rør fylles med ett av tre prøvevolum/fortynninger (10 ml, 1ml og 0,1 ml mjølkk). Antall positive rør for hver fortynning blir lest av. Gassvolumet må minst fylle bunnen av røret når det blir snudd for å være positivt. Mest sannsynlig antall (gassproduserende) sporer blir funnet ved å lese av MPN-tabell.

Det kommersielle laboratoriet Eurofins bruker 9-rørsmetoden for kvantitativ bestemmelse av *C.tyrobutyricum* i gjødsel. Johansen (upublisert) sammenligna for noen år tilbake analyseresultatet fra denne metoden med resultater etter platespredning på RCM-agar tilsatt cycloserin og nøytralrødt og påfølgende test med laktat dehydrogenase (Jonsson, 1990). Med MPN-metoden ble det i gjennomsnitt for fem gjødselprøver påvist 3,5-6,4 log<sub>10</sub> CFU/g anaerobe sporer. Imidlertid ble det ikke påvist forekomst av *C.tyrobutyricum* ved den mer artsspesifikke metoden. De samme prøvene ble også analysert for innhold av *C.perfringens*-sporer. Her varierte tallene fra 0-4,0 log<sub>10</sub> CFU/g. Dette eksemplet illustrerer at analysemetoden kan ha stor innflytelse på resultatet ved analyser av miljøprøver. Det gir også en indikasjon på at MPN-metoder som kan være egna til analyser av f.eks. mjølkk, ikke nødvendigvis er like godt egna til analysering av gjødsel eller anna prøvemateriale med et større spekter av sporedannere enn det som normalt forekommer i mjølkk.

### 6.1.2.3 12-rørsmetode

Dette er en variant av foregående metode som brukes av Steins/Arla Foods. Her brukes totalt 12 rør med BBB-medium (Bryant and Burkey, modifisert av Bergère) forseгла med parafinpropp. BBB-medium brukes til deteksjon av laktatfermenterende klostridier i melk og melkeprodukter. Ni rør såes ut med 1 (alternativt 2) ml mjølkk og 3 rør bblir utsådd med 0,1 (0,2) ml mjølkk. Som kontroll på anaerobe vekstforhold inneholder rørene redoksindikatoren resuzurin, som skal bli avfarga under anaerobe forhold. Røde rør blir følgelig kassert.

Det mest sannsynlige sporeinnholdet (MPN/l) blir beregna ut i fra MPN tabeller. BBB-mediet har i tillegg til å inneholde laktat, også låg pH noe som gir en viss seleksjon for *C.tyrobutyricum*, sjøl om enkelte andre klostridier også kan vokse i dette mediet. Ved å øke antall utsådde fortynninger vil måleområdet bli større, men usikkerheten i analysen vil være den samme. Med 12-rørsmetoden vil måleområdet være mellom 50-22 000 sporer pr. liter, mens for 10 rør à 1 ml vil måleområdet være 110-2300. Konfidensintervallene er like (Andersson & Christiansson 1992; Christiansson, pers.med.).

#### 6.1.2.4 Kvantifisering av sporer fra aerobe bakterier hos TINE

Følgende metode, basert på Christiansson *et al.* (1992) benyttes av TINE på leverandørmjølkk og lassprøver for bestemmelse av *B.cereus*:

Tre rør tilsettes prøvemateriale (2 ml for leverandørmjølkk, 4 ml for lassprøver). Prøven inkuberes i ved 72 °C i 5 minutter, og deretter ved 20°C i ett døgn. Deretter blandes/mikses prøven og en dråpe fra hvert rør (30 µl) overføres til Mossel eller PEMBA-skål som begge er selektive agarer for *B.cereus*. Skålene står i 1-2 timer i romtemperatur før de blir snudd og videre inkubert ved 30°C i 20-48 timer. Skålene blir normalt avlest etter 20 timer, men dersom resultatet er usikkert står de lenger. Dråper med vekst av typiske kolonier blir avlest som positive, og angir et positivt rør. Resultatene oppgis som henholdsvis «lågt innhold» (0,1 eller 2 positive rør) og «høgt innhold» (3 positive rør).

#### 6.1.2.5 Evaluering av de ulike MPN-metodene

Med tanke på et betalingsystem der hensikten er å klassifisere sporeinnholdet i mjølkk over eller under et gitt nivå, kan det være tilstrekkelig å bruke tre rør med samme prøvemengde. Systemet med konfirmerende prøver gjør dessuten at det er liten risiko for at nedklassing av leverandørmjølkk på feil grunnlag med nåværende prøvemethoder som benyttes av TINE på mjølkk. Ni eller flere rør med ulike fortytning vil fordyre analysen, men i liten grad øke sikkerheten (Andersson & Christiansson, 1994). Et anna alternativ for å øke sikkerheten ved høgt sporeinnhold er å øke prøvevolumet. Ulempen er at sannsynligheten for å få falske positive (ved låge sporetall) også øker. Tilsvarende kan man gjøre analysen «strengere» ved å redusere volumet, men det gjør det også mindre sannsynlig å avsløre høge sporetall (flere falske negative rør). For produsenter med middels høge sporetall vil imidlertid den tilfeldige faktoren i analysemetodikken gi betydelig variasjon i antall positive og negative rør, og det vil derfor være vanskelig å bruke resultatene som et aktivitet styringsredskap i den praktiske drifta.

En rekke ulike bakterier vil kunne vokse på RCM, som altså brukes både i analysene av leverandørprøvene og ystemjølka i TINE. Rørene som brukes på leverandørmjølka er tilsatt nøytralrødt. Både Johnsson (1990) og Christiansson *et al.* (1995) har konkludert med at nøytralrødt kan brukes til å skille mellom klostridier og andre bakterier på RCM-substrat. Klostridiene produserer en gul, fluoriserende farge, mens *Bacillus*-arter ikke gjør det. Christiansson *et al.* (1995) fant riktignok at én enkelt *Bacillus*-art ga en gul-orange farge og kraftig gassdannelse, og at en annenga svak orange-farging uten gassdannelse.

Gassdannende laktobasiller finnes i store mengder i surfôr, og visse stammer er relativt varmetålende. Det vil derfor ikke være urimelig å anta at disse bakteriene kan forstyrre resultatet ved analyser av fôr. Christiansson *et al.* (1995) gjorde utstryk av positive RCM-rør med mjølkeprøver til agarplater, uten at det ble identifisert laktobasiller.

BBB-substratet er i utgangspunktet mer selektivt for *C.tyrobutyricum* enn RCM. I tillegg til at BBB inneholder laktat, har mediet en lågere pH (pH=6,0) enn RCM (pH=6,8) noe som ytterligere favoriserer *C.tyrobutyricum* framfor andre klostridier. Flodin (2009) fant riktignok at BBB kan gi positivt utslag også for klostridier som er «laktat-negative». Årsaken er trolig at disse artene bryter ned proteinet i substratet i stedet for laktat. Samtidig viste Flodin (2009) at *C.tyrobutyricum* var den dominerende arten i den svenske leverandørmjølka (Tabell 6.2) og det samme er vist for surfôr av Johnsson (1991). Det er noe større usikkerhet rundt hvilke bakteriesporer som gir positivt utslag på MRCM-substratet som benyttes av TINE.

Tabell 6.1. Resultat av artsbestemmelse med Rapid ID 32 A fra 103 leverandørmjolk-prøver med positivt utslag på klostridieanalyse (Flodin 2009).

Art	Antall
<i>C.tyrobutyricum</i>	70
<i>C.beijerinckii/butyricum</i> <sup>1</sup>	10
<i>C.acetobutylicum</i>	3
<i>C.perfringens</i>	9
<i>C.fallax</i>	1
<i>C.bifermentans</i>	2
<i>C.sp</i>	3
Ukjente <sup>2</sup>	5

1 Rapid ID 32 A kunne ikke skille *Cl. Bejerinckii* og *Cl. Butyricum*.  
 2 Ukjente kunne ikke bli identifisert med Rapid ID 32 A.

### 6.1.3 Toksinpåvising

Tabell 6.2 gir en oversikt over de diagnostiske metodene for deteksjon av toksiner som finnes i dag. Det finnes to forskjellige kommersielle kit for deteksjon av enterotoxin fra *B.cereus* (Tecra VIA og BCET-RPLA). PET-RPLA Toxin Detection Kit brukes for å detektere *C.perfringens* enterotoksin.

Ved mistanke om botulisme kan påvising av bakterie ikke brukes, fordi denne finnes i miljøet. Toksinpåvising er vanskelig fordi det kan være små mengder og innholdet ikke er jevnt fordelt i prøven. Toksinpåvising i serum, vev eller tarminnhold er også vanskelig. Serologisk diagnose har vist seg lite egnet (Mawhinney *et al.* 2012). Museforsøk brukes derfor forstansatt og er i dag eneste godkjente metode for påvising av botulinum toksin i dyr, mennesker og mat. Ved mistanke om botulinum forgiftning injiseres serumprøve fra dyr (el. menneske) i mus som etter hvert utvikler spesifikke symptomer som vepsetalje, pustebesvær og død. Det jobbes intenst for å utvikle nye metoder siden musetester er lite ønskelig sett fra et etisk perspektiv.

Veroceller (epitelceller fra ape) kan benyttes for å teste om stammer av *B.cereus* og *C.perfringens* produserer enterotoksin. Dette gjøres ved at supernatanter fra

bakteriekulturer settes til Veroceller som deretter observeres m.h.p. protein syntese og vitalitet.

Tabell 6.2. Metoder for påvisning av toksiner/bakterier

	Mus bioassay	PCR	Toksin påvisning i vev og sårsekret immunokjemiske metoder	Påvisning av enterotoksin produserende stammer:	Bakteriepåvisning i vev immunoloiske metoder
<i>C. botulinum</i>	Toksinpåvisning i serum /mat Toksintype kan bestemmes				
<i>C. tetani</i>	Ingen rutine diagnostikk, men kan brukes				
<i>C. perfringens</i>		Ja	A toksin	Verocelle test + kommersielt kit	Ja
<i>C. chauvoei</i>		Ja			Ja
<i>C. septicum</i>		Ja			Ja
<i>C. novyi</i>		Ja	Type A og B		Ja
<i>B. cereus/ B. thuringiensis</i>		Ja		Verocelle test +2 kommersielle kit	

### 6.1.4 Andre metoder

Ekelund *et al.* (2003) har utarbeidet en analysemetode for *B.cereus* og *C.tyrobutyricum* sporer i mjølk, der pasteurisert mjølk en filtrerer og filtret inkuberes på agarplater. Blodagar blir brukt for *B.cereus* med inkubering ved 20 °C i 48 timer, RCM agar blir brukt for *C.tyrobutylicum* med inkubering ved 37 °C i 72 timer. Etter inkubering kan man telle kolonier opptil 200 CFU/filter og en kan angi CFU/l mjølk. Koloniene kan verifiseres videre fra filtret og metoden gir ingen falske resultater slik MPN-metodene gjør.

## 6.2 DNA-baserte metoder

### 6.2.1 PCR (polymerase chain reaction)

PCR benyttes for å produsere mange kopier av en bit av DNA, for eksempel et gen eller deler av et gen. Forskere ønsker ofte å isolere enkeltgener for å undersøke DNA-sekvensen til genet. Diagnostisk brukes PCR for å oppformere 16S rRNA gener som deretter blir

sekvensert, og sekvesen gir nøyaktig identifikasjon av en bakterie på artsnivå. PCR brukes også for å påvise toksinogener innenfor en art eller til å påvise feil (mutasjoner) i et gen.

I en PCR-reaksjon brukes det såkalte primere, som er en kort DNA-bit med en bestemt sekvens. To primere (en på hver side) med sekvens fra det området man ønsker å oppformere blandes med DNA fra bakterien man underøsker og det tilsettes en varmestabil DNA-polymerase, nukleotide (byggesteiner for DNA) og utsettes for helt bestemte temperatursykluser. Etter en slik behandling sitter man igjen med ca  $10^9$  kopier av den DNA-biten man ønsket å oppformere, og så mye DNA kan detekteres med enkle metoder.

### 6.2.2 *Real time PCR (RT-PCR)*

RT-PCR er en teknikk som gjør det mulig å kvantifisere DNA-sekvenser og dette vil igjen kunne si noe om antall bakterier som har akkurat denne sekvensen. Kvantifiseringen er basert på at man vet hvor mange sykluser med kopiering (amplifications) som trengs for å nå et gitt antall av denne bakterien. Mange bakterier: kort tid, få bakterier: lang tid. Dette er særlig nyttig når man skal følge arter som er forventa å forekomme, f.eks. ved ei sammenligning mellom ensilasje tilsatt en gitt bakterie/mikroorganisme og en som ikke har fått den samme tilsettinga.

En av fordelene med metoden er at man kan kvantifisere arter selv om antallet er svært lite. Andre metoder greier ikke å kvantifisere arter som forefinnes i mindre enn 1 %, Med denne metoden kan man kvantifisere arter som utgjør mindre enn 1 % av den totale mikrobielle populasjonen (Muck 2012).

### 6.2.3 *PCR på sporer*

Når man skal undersøke miljøprøver for bestemte bakterier er det nærliggende å velge Polymerase Chain Reaction (PCR)-metoden der man direkte på prøven kan oppformere DNA-biter der sekvensen er spesifikk for den bakterien man leter etter. Ved å velge RT-PCR-metoden kan man i tillegg kvantifisere antallet av den bestemte bakterien i en prøve. Når det gjelder sporedannende bakterier blir dette derimot vanskelig. Hos sporer er DNA omgitt av en meget solid sporevegg/kappe (se Kap 5.) og DNA er ikke tilgjengelig for PCR slik som i vegetative celler. Det er i litteraturen beskrevet flere forskjellige metoder for å ødelegge sporeveggen slik at DNA blir frigitt (Dineen *et al.* 2010; Kuske *et al.* 1998; Ryu *et al.* 2003) og det finnes flere kommersielt tilgjengelige kit som skal kunne ekstrahere spore-DNA fra f.eks. jordprøver. De fleste metodene og kitene er laget for bacillus arter.

### 6.2.3.1 Forsøk med å bruke PCR for direkte bestemmelse av *C. perfringens* sporer gjennomført ved Norges veterinærhøgskole i 2012

Som en del av dette forprosjektet ble det ved Norges veterinærhøgskole høsten 2012 gjennomført en studie for å undersøke om det var mulig å detektere sporer direkte ved å kjøre PCR på f.eks høy/surfôr. Det ble laget en sporeløsning av *C. perfringens* på ca 107 sporer/ml. *C. perfringens* ble valgt som testorganisme siden vi har gode metoder for å lage rene sporeløsninger av denne bakterien, og de fleste tidligere utførte testene er gjort på *Bacillus* sporer. I en slik ren sporeløsning finnes det ikke fritt DNA tilgjengelig utenfor sporen, og sporen må ødelegges for å få et positivt PCR resultat.

Fire av de «tøffeste» metodene ble testet i forsøket:

Varmebehandling i:

- Triton X-100
- Sucrose/TritonX-100
- Bead beating (kraftig risting med små silacakuler)
- Guanidine-HCl, pH 2.8

Sporene ble behandlet som beskrevet i litteraturen (Dineen *et al.* 2010; Kuske *et al.* 1998; Ryu *et al.* 2003). Prøvene ble så sentrifugert for å fjerne hele sporer og eventuelt sporereseter. Deretter ble det kjørt PCR på supernatanten. I PCR ble det benyttet primere mot *C. perfringens*  $\alpha$ -toksin. PCR ble kjørt på forskjellige fortynninger av de behandlede sporene.

Ingen av metodene resulterte i positiv PCR.

Konklusjon:

Direkte deteksjon av sporer i fôr ved hjelp av PCR blir meget vanskelig, i hvert fall for *C. perfringens*.

### 6.2.3.2 Deteksjon og kvantifisering av klostridier etter germinering

Videre ønsket man å undersøke om det var mulig å detektere *C. perfringens* germinert fra veldig få sporer i en blanding av andre bakterier. Følgelig ble 5, 50, 500 og  $5 \times 10^5$  *C. perfringens* sporer tilsatt til rør med en blanding av *E. coli* og *Bacillus* (Ca 104 av hver). Prøvene ble inkuberer anaerobt over natt og PCR ble så kjørt på kultur supernatant. *C. perfringens* ble påvist i alle rør ved hjelp av PCR.

Konklusjon: Helt ned til 5 sporer kan detekteres i et rør med 104 *E. coli/Bacillus* etter germinering av sporene.



### 6.2.3.3 PCR på *C. chauvoei*

*C. chauvoei* er strikt anaerob og kan være vanskelig å dyrke. For å undersøke om vi kunne påvise *C. chauvoei* i kultur med bruk av PCR, ble *C. chauvoei*-stammen fra utbruddet på Hadeland i 2010 dyrket i flytende medium over natt som reinkultur og i blandingskultur. PCR ble utført på kultursupernatant fra rein *C. chauvoei*-kultur, *C. chauvoei* i blanding med *E. coli/Bacillus* og *C. chauvoei* i vann. Primere brukt er tidligere beskrevet av Sasaki *et al.* (2000; 2001). For å teste nedre deteksjonsgrense for *C. chauvoei*-sporer ble det gjort et forsøk på å lage en rein sporebatch av denne bakterien. Det lyktes ikke.

Konklusjon: *C. chauvoei* ble påvist både fra renkultur og fra blandingskulturer, men vi vet ikke noe om nedre deteksjonsgrense.

Siden PCR direkte på sporer virker som en høgst usikker metode, må sporene germineres slik at DNA blir tilgjengelig før PCR undersøkelsen. Ulempen ved germinering er at man ikke lenger kan kvantifisere antall sporer/bakterier tilstede i prøven i utgangspunktet ved hjelp av kvantitativ PCR siden bakteriene er blitt oppformert i buljong. Fortynning av prøven før germinering for å se høyeste fortynning som gir oppvekst og positiv PCR for en bestemt bakterie vil gi en indikasjon på antall sporer/bakterier av en type i den opprinnelige prøven. Da vil både sporer og vegetative bakterier telles. Ved å inkubere prøven ved 77°C i 15-20 minutter drepes alle vegetative celler samtidig som det aktiverer germinering, og det er bare sporene som vil oppformeres. Likevel vil DNA fra vegetative celler kunne gi positiv PCR, slik at det ikke kun er sporer som detekteres. Eneste mulighet for å kvantifisere sporer etter oppvarming og germinering er utsæd på agarskåler. Deretter må koloniene identifiseres vha f.eks PCR. Men selv om det brukes selektive agarskåler for f. eks clostridier, vil det bli mye arbeid å plukke kolonier til PCR for å finne f. eks. *C. chauvoei* som vi må anta finnes i låg konsentrasjon i forhold til andre klostridier.

Per i dag ser det ikke ut til å finnes noen god metode for en eksakt kvantifisering av *C. chauvoei* i dyrefôr, men det er mulig å gi et ja/nei svar om det er *C. chauvoei* tilstede, og i tillegg si noe om ca antall.

## 6.3 Sammenheng mellom sporeinnhold og fermenteringskvalitet i fôr ?

En stor del av litteraturen som omhandler effekten av ulike faktorer som kan tenkes å påvirke den hygieniske kvaliteten av konservert fôr (gjødsling og gjødseltyper, høsteteknikker, bruk av konserveringsmiddel etc) har utelukkende studert effekt på fermenteringsmønstret, og da særlig innholdet av smørsyre og ammoniakk i fôret. TINE Rådgiving har på sin side erfart at det er relativt få gårdbrukere som rekvirerer hygieniske analyser når de sender inn prøver til laboratoriet (Schei, pers.med.) Variabiliteten i

innhold og fordeling av bakterier og sporer og derav følgende utfordringer knytta til prøveuttak, samt at mikrobiologiske analyser til dels er kostnadskrevenne kan være viktige årsaker til at mange ikke tar «bryet» med å ta slike analyser, verken i forskning eller praksis.

TINE Rådgiving gjennomførte vinteren 2010/2011 et prosjekt der målet var å undersøke om gjæringskvalitet kan brukes som indirekte mål på hygienisk kvalitet. Fôrpøver fra 217 melkeproduksjonsbruk ble analysert både mikrobiologisk og kjemisk. Sammenhengen mellom innholdet av sporer fra anaerobe sporedannere og smørsyre var relativt liten ( $r=0,33$ , Schei *et al.* 2013). Det var altså et relativt stort antall prøver med høgt sporetall uten at det samtidig var høgt innhold av smørsyre i fôret. Sammenhengen mellom innholdet av sporer fra smørsyreproduserende bakterier og ammoniakk var enda svakere ( $r = 0,15$ ). Prøvene ble analysert hos Eurofins (intern metode, se Kap 6.1.1.). Resultatet gir klare indikasjoner på at sporene i surfôret i første rekke er kommet inn i fôret gjennom forurensning, før eller under slåtten, og at de i liten grad er resultat av dårlig gjæring.

Ei sammenstilling av mikrobielle- og kjemiske analyseresultater fra en omfattende serie med norske forsøk knytta til bruk av husdyrgjødsel på eng, viste også at det var liten sammenheng mellom innholdet av smørsyreproduserende sporedannere og smørsyre (Johansen, upublisert). I dette materialet forekom en rekke prøver med høgt innhold av smørsyre, uten at det samtidig ble funnet høgt innhold av sporer. Dette tilsynelatende misforholdet kan forklares med at bakteriene på det tidspunktet det er tatt prøver, er i full aktivitet under for dem, gode vekstbetingelser og da vil sporeinnholdet være lågt.

Om lag 20 år tidligere sammenligna Spoelstra (1990) innholdet av klostridiesporer i laboratoriesiloer med og ordinære, store siloer. I små siloer kunne ca 60 % av variasjonen i sporeinnholdet forklares med enten innholdet av smørsyre eller ammoniakk. I store siloer kunne bare 20-30 % av variasjonen forklares av de samme parametrene. Spoelstra forklarte mangelen på sammenheng mellom sporeinnhold og konsentrasjon av gjæringsparametre i store siloer med at innholdet er svært heterogent.

Konklusjonen er at kjemiske analyser ikke kan erstatte mikrobiologiske analyser for å kvantifiser eller gradere («høgt», «lågt») innholdet av klostridiesporer i fôret, og spesielt ikke i fôrpøver fra store siloer. Samtidig frarådes det å bare analysere fôrets innhold av klostridiesporer. I situasjoner der man ønsker å undersøke om fôret kan være årsak til høge klostridietall i mjølka, anbefales det å ta både mikrobiologiske og kjemiske analyser av fôret, eventuelt supplere bestemmelser av sporetallet med en kvantifisering av innholdet av vegetative celler. Til praktiske formål er det imidlertid mer aktuelt å rekvirere analyser av fermenteringsprodukter, da dette også har vesentlig interesse for fôrets næringsverdi og opptaksindeks.

## 7. Kontaminering av mjølk og fôr

---

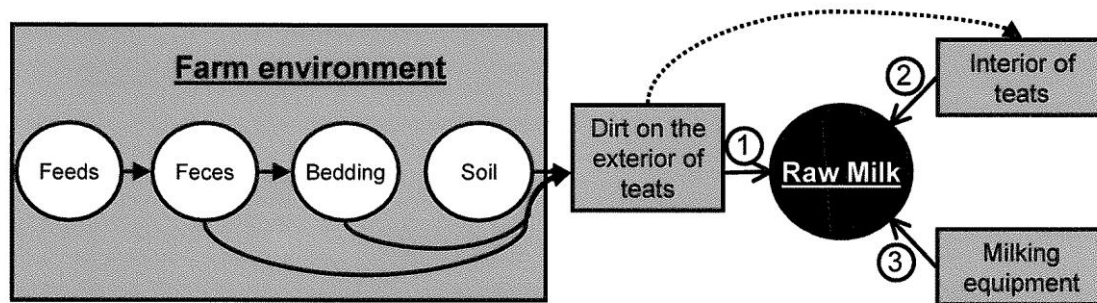
### 7.1 Kontaminering av mjølk

Mjølka er tilnærma steril når den skilles ut i alveolene i juret (Tolle 1980). Mikroorganismer blir overført til mjølk via overflata av spener og jur (1), fra spenenes innside ved mastitt (2) og via overflata av mjølkeutstyret (3) (Figur 7.1). I følge Vissers (2008) er kontaminering fra spenene bare relevant for mastitt-patogener og ikke for sporedannende bakterier. Kontaminering via luft er også vanligvis neglisjerbar (Akam *et al.* 1989; Stadhouders & Jørgensen 1990, TeGiffel *et al.* 1995). Med andre ord skjer kontamineringa i hovedsak under og etter mjølkning. Sporene på juret kommer fra fôr, feces, strømateriale og jord.

Sporer i (sur)fôr spises av dyret og passerer gjennom fordøyelseskanalyen tilnærma upåvirka og akkumuleres i feces. I en studie av 24 nederlandske mjølkeproduksjonsbruk, fant følgelig Vissers *et al.* (2007b) at gjødsla inneholdt omtrent tre ganger så mange sporer som surfôret. Jur og spener kontamineres deretter av feces og strømateriale blanda med feces. Reingjøring av jur og spener før mjølkning vil bare delvis kunne fjerne sporene. Enkel tørking med tørt tørkepapir fjerner 45-50 % av sporene (Bertilsson *et al.* 1996) mens mer omfattende vasking og tørking kan fjerne opp til 96 % av sporene (og (Magnusson *et al.* 2006) Under mjølkninga kan derfor sporer fra gjødsel og strø overføres til mjølka (Te Giffel *et al.* 2002).

I en norsk studie fant Torp *et al.* (2001) låge forekomster av vegetative bakterier i strø (300 CFU/g). Seinere fant Magnusson (2007) i en omfattende studie at store mengder sporer av *B.cereus* kan forekomme i strø, og at det var en klar sammenheng mellom sporeinnholdet i strøet og sporeinnholdet i mjølka. Tilsvarande sammenheng ble påvist av Hogan *et al.* (1988). Ved hjelp av PCR-analyser dokumenterte Magnusson at bakteriestammene i strøet var en hovedkilde for *Bacillus*-sporer i mjølk. Djupstrø av sagflis viste seg å kunne innholde like mange *B.cereus*-sporer som det man ofte påviser i jord. I noen tilfeller ble det også funnet høge sporetall i dypstrø av halm. Under kontrollerte forsøk i laboratorium fant Magnusson indikasjoner på at torv og torv/sagspon-blandinger hadde en hemmende effekt på veksten av *B.cereus*. En mulig årsak til dette kan være låg pH i torva. Disse funnene er imidlertid ikke verifisert gjennom studier under praktiske forhold i fjøs. Magnusson (2007) viste også at mengde gjødsel i strøet hadde betydning for hvor raskt konsentrasjonen av *B.cereus* økte. I strø med lite gjødsel var tilveksthastigheten mindre enn i strø med mye gjødsel.

Jur og spener kan også kontamineres med jord, spesielt i forbindelse med beiting (Christiansson *et al.* 1999; Slaghuis *et al.* 1997).



Figur 7.1 Kontaminering av råmjølk med mikroorganismer fra ulike kilder og via ulike ruter (fra Vissers & Driehuis 2007, her fra Vissers 2008).

Ved utilstrekkelig reingjøring kan mjølka kontamineres av mikroorganismer og mjølkerester på de indre overflatene av mjølkingsutstyret/anlegget. Sporene er generelt mer motstandsdyktige mot reingjøringsmidler enn vegetative bakterier (Saran 1995). I tida som går mellom to mjølkinger kan det oppstå bakterievekst, og bakeriene kan også rekke å sporulere. Gamle og sprukne gummideler er særlig utsatt for akkumulering av mikroorganismer (Akam *et al.* 1989).

Vissers *et al.* (2006) modellerte effekten av ulike faktorer (reinhold, fôr, gjødsel, jord, strø) på innholdet av anaerobe og aerobe sporer i tankmjølk basert på registreringer på 24 nederlandske mjølkeproduksjonsbruk. Surfôr viste seg å være den absolutt viktigste enkeltfaktoren som påvirka innholdet av klostridiesporer i mjølka. Nødvendige tiltak for å oppnå tankmjølk med  $< 1$  spore/mL, er etter denne modellen avhengig av innholdet av sporer i surfôret:

Innhold av klostridiesporer i surfôr	Aktuelle/mulige tiltak
$< 3 \log_{10}$ cfu/g	Reingjøring av jur og spener med en metode som fjerner 75 % av sporene på spenene er tilstrekkelig
$3 - 5 \log_{10}$ cfu/g	Nr 1: Fjerning/utrangering av møkkete dyr Nr 2: Ta i bruk mer effektive reingjøringsmetoder av jur og spener
$> 5 \log_{10}$ cfu/g	Ikke mulig å oppnå ei målsetting om tankmjølk med $< 1$ spore/ml, uansett hvilke tiltak som settes inn.

Vissers *et al.* (2006) anbefalte på bakgrunn av dette at surfôr med  $> 5 \log_{10}$  CFU/g klostridiesporer ikke må benyttes i mjølkebuskaper. I tråd med dette fant Nadeau *et al.* (2010) at oppformering av sporer i surfôret var hovedårsaken til høgt sporeinnhold i mjølk, og at gårder med mye sporer i mjølk hadde mer møkkete kyr enn gårder med lite sporer.

Den samme forskergruppa gjorde tilsvarende undersøkelser for årsaker til kontaminering av mjølk med *B.cereus* (Vissers *et al.* 2007c). Sporeinnholdet i mjølka på 24 gårdsbruk ble registrert over et helt år, i tillegg til at det ble tatt prøver fra jord på beitearealer, av surfôr, gjødsel og strø. I gjennomsnitt inneholdt mjølka  $1,2 \log_{10}$  *B.cereus*-sporer /L, og

ingen prøver hadde høyere verdi enn det som var angitt som maksimalt akseptabelt innhold ( $3,0 \log_{10}$  sporer/L). Konsentrasjonen av *B.cereus* i jord, feces, strø og surfôr var i gjennomsnitt henholdsvis  $4,9 \log_{10}$ ,  $2,2 \log_{10}$ ,  $2,8 \log_{10}$  og  $2,4 \log_{10}$  sporer per gram. Sporeinnholdet i tankmjølka økte i perioden juli-september sammenligna med resten av året og i samme periode ble det påvist tilsvarende økning i feces, strø og surfôr. Økningen av konsentrasjonen av sporer i mjølka kunne ikke relateres til beiting. Derimot ble det funnet signifikant korrelasjon mellom sporeinnholdet i mjølk og feces, og mellom feces og surfôr, også i beiteperioden. Vissers *et al.* (2007c) mente at økningen av innholdet av *B.cereus*-sporer om sommeren kan forklares med økt vekst av *B.cereus* som følge av høyere temperaturer. Sjøl om jorda inneholdt over 100 ganger høyere konsentrasjon med sporer sammenligna med fôr og feces, viste modellberegninger basert på de omtalte registreringene at for året sett under ett blir *B.cereus* i hovedsak overført til mjølka fra fôr, via feces. Deres anbefaling var derfor at gårdbrukerne må ta forholdsregler for å sikre et lavt kontamineringsnivåi fôret ( $< 3,0 \log_{10}$  sporer/g) og hindre videre framvekst av *B.cereus* i fôr (blant annet ved å unngå varmgang og pH  $> 5,0$  under aerob lagring), feces og strø. I tillegg anbefalte de ekstraordinære reingjøringsrutiner av jur og spener i beiteperioden dersom innholdet av sporer i jorda er høyt ( $> 4,0 \log_{10}$ /g). Med utgangspunkt i at Christiansson *et al.* (1999) fant negativ korrelasjon mellom innholdet av *B.cereus*-sporer i mjølk og tørrstoffinnholdet i jord framholdt Vissers *et al.* (2007c) også at man bør unngå beiting på svært fuktig jord.

Modellene til Vissers *et al.* (2007c) ble verifisert blant annet med data fra svenske undersøkelser der jord (på beiteareal og på drivveier) ble identifisert som den viktigste kilden til kontaminering av tankmjølk i beitesesongen, mens sagflis/spon i djustrøbåser var den viktigste kontamineringskilden ved innefôring (Christiansson *et al.* 1999; Magnusson *et al.* 2007).

### 7.1.1 Spesielle utfordringer i fjøs med mjølkerobot

Ved innføring av mjølkerobot (automated milking system (AMS)) har det vært bekymring omkring mjølke kvaliteten. Noen studier sammenlikner mjølke kvalitet i besetninger før og etter oppstart med AMS (Klungel *et al.* 2000, Salovuo *et al.* 2005), eller sammenlikner besetninger med AMS og mjølking i mjølkestall (Klungel *et al.* 2000, Svennersten-Sjaunja & Pettersson 2008; Oudshoorn *et al.* 2012). Redusert mjølke kvalitet, spesielt økt innhold av frie fettsyrer (FFA), økt totalt bakterietall (total plate count (TPC)), økt celledtall (somatic cell count (SCC)) og økt frysepunkt ble observert i besetninger ved oppstart med AMS (Klungel *et al.* 2000; Salovuo *et al.* 2005; Svennersten-Sjaunja & Pettersson 2008). Til dels skyldtes endringene problemer med rutiner i oppstartfasen som seinere ble forbedret (Salovuo *et al.* 2005; Svennersten-Sjaunja & Pettersson 2008), og til dels hadde mjølka så høy kvalitet også etter overgangen til AMS at endringene ikke utgjorde noe problem. Systemene for vasking av spener før mjølking regnes nå for å være gode nok ved bruk av AMS (Svennersten-Sjaunja & Pettersson 2008). Salovuo *et al.* (2005) påviste *B.cereus* sporer bare i to av 39 prøver (1 spore/ml), og av totalt 144 prøver analysert for klostridiesporer hadde over 80 % av prøvene både fra AMS og konvensjonell mjølking

mindre enn 400 MPN/L, mens det var en noe høyere andel med høye prøver (>1000 MPN/L) fra AMS enn fra konvensjonelle besetninger (henholdsvis 6,0 og 3,3 % av prøvene). MPN/L. Klungel *et al.* (2000) grupperte nivået av klostridiesporer i prøvene til under eller over det nivået som gir pristrekk. Før overgangen til AMS ga 1,7 % av prøvene trekk, mens etter overgangen ga 1,8 % av prøvene trekk. Undersøkelsen omfatta 28 besetninger. Til sammenlikning hadde besetninger med vanlig mjølkestall og to daglige mjølkinger 0,6 % prøver med trekk og de med tre daglige mjølkinger 0,3 % prøver med trekk.

Oudshoorn *et al.* (2012) undersøkte innholdet av klostridiesporer i mjølk både sommer og vinter på henholdsvis 10 AMS-besetninger og 10 konvensjonelle besetninger, men fant ingen forskjell mellom de to mjølkesystemene. Innocente og Biasutti (2013) sammenlikna mjølk fra 7 AMS-besetninger med 7 besetninger med konvensjonell mjølkestall, og ved 3 anledninger i løpet av et år produserte de opprinnelsesmerket Montasio-ost av mjølka. De fant ikke forskjeller verken i kjemisk sammensetning, frysepunkt, SCC, TBC, ulike kaseinfraksjoner, ysteegenskaper eller i kvaliteten av osten etter modning.

## 7.2 Kontaminering av planter og surfôr

Plantene kan kontamineres med sporer på ulike stadier. Under spiringa vil plantedelene være i direkte kontakt med jord. Sporer kan da lett feste seg og følge plantedelene også videre i framveksten. I en review-artikkel av Drouin & Lafreniere (2012) blir det hevdta at sporene kan inkorporeres på innsida av celledaga etter hvert som planten vokser og at at sporene kan penetrere planten fra rota som følge av skader påført plantene under slått eller beiting. Dette har vi imidlertid ikke funnet dokumentasjon på i litteraturen.

Overjordiske plantedeler kan kontamineres med sporer fra jorda som følge av slagregn eller vind (støv) og av sporer i husdyrgjødsel. Under slått og innhøsting kan plantemassen kontamineres ytterligere med jord, døde/døende plantedeler og eventuelle rester av husdyrgjødsel på jordoverflata.

### 7.2.1 *Sporer og sporedannere på stående planter*

På stående plantemasse består mikrofloraen (gjærne kalt epifyttisk flora) av bakterier, sopp og mikroalger og relaterte sporer. Når det gjelder sporedannende bakterier, kan forekomsten av vegetative bakterier være sparsom, mens mengden sporer kan være stor. Eventuelle forskjeller i sporetall på ulike fôrvekster er i liten grad dokumentert. Det har tidvis vært reist spørsmål om kløver på grunn av sin morfologi er mer utsatt for kontaminering med husdyrgjødsel sammenlikna med gras, og at dette kan være en medvirkende faktor til større problemer med høge sporetall i mjølka på økologiske mjølkeproduksjonsbruk enn på konvensjonelle. Adler & Lew (1995) sammenlikna imidlertid

den epifyttiske floraen på gras og rødkløver, uten å finne forskjell verken i forekomst av aerobe sporedannere eller klostridier. Lin *et al.* (1992) sammenligna alfalfa med mais (corn). Det ble påvist moderate sporetall på mais, mens ingen sporer på alfalfa. I Finland fant Pursiainen og Tuori (2008) noe høyere forekomst av sporer fra smøryreproduserende klostridier på helgrøde av kveite sammenligna med belgvekster (erter, bønner og vikker). Spørsmålet synes fortsatt å stå ubesvart.

At det kan forekomme en økning i den epifyttiske mikrofloraen etter hvert som plantene eldes, synes rimelig da døende plantedeler er et naturlig habitat for mikroorganismene (Ercolani 1997). De døde plantedelen akkumuleres gjerne nær jordoverflata. I dette mikroklimaet er det etter måten liten tilgang på luft, høy fuktighet og tilstedeværelse av aminosyrer, oranske syrer og andre faktorer som kan initiere germinering av sporene. Adler & Lew (1995) påviste en økning i tallet på aerobe bakterier fra skyting til blomstring (gras) fra 6,9 til 8,3  $\log_{10}$  CFU/og dessuten at antallet aerobe sporer var høyere på de nederste plantedelen enn på de øverste. Müller (2009) fant en sikker økning i tallet på både mugg- og gjærsopp på høsta gras fra mai til juni og fra juni til august, men ikke tilsvarende endring i tallet på klostridiesporer.

Det kan også være grunn til å anta at sporetallet på stående plantemasse er påvirket av årstida som følge av forskjeller i temperatur, lys og fuktighet, men det er ikke funnet dokumentasjon i litteraturen på dette. Det er imidlertid en alminnelig erfaring at det kan være vanskeligere å oppnå god gjæringskvalitet i surfôr fra andreslått enn fra førsteslått. I feltforsøk på Nord-Vestlandet ble det påvist flere prøver av rundballesurfôr med *B.cereus*-sporer fra andreslått enn fra førsteslått, mens det ikke var forskjell mellom første og andreslått i tallet på klostridiesporer (Johansen *et al.* 2010).

## 7.2.2 Sporer og sporedannere i jord

*C.perfringens* finnes i alle typer jord, muligens så nær som i ørkenen (Sahara), mens forekomsten av de ulike typene av *C.botulinum* synes å være geografisk betinget (Bott *et al.* 1968; Eklund *et al.* 1982; Eklund *et al.* 1984; Hauschild 1989), samt at det er indikasjoner på at jordas pH og innhold av organisk stoff kan ha betydning (Lewis 1975). I Norge, Sverige, Danmark, Nederland og langs kysten av Baltikum er *C. botulinum* type E utbredt i akvatiske sedimenter (Johannsen 1963, Huss 1980, Hauschild 1989). Generelt kan det synes som om tallene er lågere i jord enn i sedimenter. Det er funnet én referanse der det rapporteres om funn av *C.hauvoei* i jord. Denne referansen gjelder en undersøkelse i Zambia der Hang'ombea *et al.* (2000) fant at forekomsten av ulike Clostridie-arter (*C.chauvoei*, *C.septicum* og *C.novyi*) i jord varierte mellom ulike områder/jordforhold. *B.cereus* finnes vidt utbredt i de fleste typer jord, i sedimenter og støv (for referanser; se Stenberg Arnesen *et al.* 2008).

Heyndrickx (2011) har gitt en oversikt over innholdet av aerobe og anaerobe sporedannere i jord og gjødsel fra en rekke referanser. Tabell 7.1 gjenngir sammenstillinga for jord. For noen av referansene i tabellen henvises det til den omtalte review-artikkelen.

Tabell 7.1. Forekomst av aerobe og anaerobe sporedannere i jord, analysert som enkeltarter, slekter eller gruppe ( $\log_{10}$  /g). Etter Heyndrickx (2011).

	Jordas bruksmåte	N	Gj.snitt	Var.bredde	Referanse
<i>B. cereus</i>	Landbruk	38	4,9	4,1 - 6,0	Vissers <i>et al.</i> 2007c Rammer 1996
		27		5,7 - 6,1	
<i>C. botulinum</i>	Bigårder	235	2,0/kg	1,7 - 3,0/kg	Nevas <i>et al.</i> 2006
<i>C. perfringens</i>	Diverse	502		0 - 3,5	Li & McClane 2007 Voidarou <i>et al.</i> 2011
	Landbruk	750			
<i>C. tyrobutyricum</i>	Landbruk	59	4,2	3,2 - 4,9	Vissers <i>et al.</i> 2007b Rammer 1996
		27		3,6 - 4,0	
<i>Clostridium sp.</i>	Landbruk	21		2,4 - 6,5	Smith 1975
Anaerobe sporer	Landbruk		4,0	2,0 - 5,2	Julien <i>et al.</i> 2008

Ettersom drening, jordarbeiding og gjødsling påvirker jordas fuktighet, pH, organiske innhold, næringsstatus og fysiske egenskaper er det ikke urimelig at det også påvirker innholdet av bakterier og bakteriesporer. Det er ikke funnet dokumentasjon på hvor vidt manglende drenering, flom, tørke eller jordarbeiding mm har innvirkning på innholdet av sporer i jord(overflata). Sammenhengen mellom sporeinnholdet i jord og gjødslingspraksis er studert i en rekke undersøkelser. Flere har funnet signifikant sammenheng mellom tilførsel av husdyrgjødsel og sporeinnhold i jord (Voidarou *et al.* (2011); N'dayegamiye og Côté (1989); Borreani & Tabacco 2008) har alle rapportert om sammenheng mellom jordas innhold av anaerobe sporer og gjødslingspraksis. Lafrenière *et al.* (2005) sammenligna sporeinnholdet i jord etter spredning av ulike gjødseltyper og fant høyere konsentrasjoner og større variabilitet etter spredning av fastgjødsel og papirproduksjonsavfall enn etter spredning av blautgjødsel og mineralgjødsel. Rohde *et al.* (1994) konkluderte med at tilførsel av blaut husdyrgjødsel ikke påvirka innholdet av *Clostridium* i jordoverflata, men at det over tid syntes å øke innholdet av *Bacillus*. Lafrenier *et al.* (2005) fant dessuten at sporeinnholdet i jorda jevnt over var høyere under bestand av alfalfa enn under timotei, mens Voidarou *et al.* (2011) ikke fant forskjeller i sporeinnholdet i jord under ulike grønnsaker og rotvekster etter tilførsel av husdyrgjødsel.

Årsaken til disse noe varierende resultatene, kan blant anna være knytta til bakterienes evne til raskt å tilpasse seg varierende tilgang på næring, vann, lys og luft i jordoverflata gjennom henholdsvis sporulering, germinering og oppformering. Dette gjør at det nærmest umulig å estimere aktivitet og produksjon av bakterier basert på enkeltprøver, sågar også på månedlige bestemmelser (Clarhold & Rossvall 1979).

Sporeinnholdet i jord synes generelt å være dårlig kartlagt i Norge og behovet for dette knytta opp mot patogener påpekes i Kapittel 5.. Mangelfull kartlegging så langt kan trolig knyttes både til analytiske utfordringer og det faktum at sporeinnholdet varierer mye over tid og rom. Enkelte har spekulert på i hvilken grad sporeinnholdet i jord vil kunne påvirkes av klimaendringer, men det er så langt vi har registrert ikke fremsatt hypoteser rundt dette.



### 7.2.3 Sporer og sporedannere i husdyrgjødsel

Både klostridier og baciller er, sammen med en rekke andre bakteriearter (f.eks. *E.Coli*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria monocytogenes*), protozoer og virus en normal del av tarmfloraen hos storfe så vel som hos andre dyr og mennesker. Følgelig inneholder også feces en rekke både patogene og ikke-patogene arter.

Totalantall bakterier, og antall ulike typer bakterier, i normalflora i mage og tarmtraktus hos storfe varierer fra individ til individ. Det påvirkes av en rekke faktorer som blant annet fôring, miljø, alder og helsestatus. Antallet mikrober varierer også med sted i tarmen, fordi særlig pH og oksygennivå kan variere. I vom, blindtarm og stortarm er normalt oksygennivået lågt. Hos storfe er antall CFU/ml eller CFU/g rundt  $10^{10}$  til  $10^{11}$  i vom,  $10^6$ - $10^8$  i løpen, over  $10^7$  i tolvfingertarm,  $10^6$ - $10^7$  i tynntarm,  $10^8$ - $10^9$  i blindtarm og om lag  $10^9$  i feces (Russel & Rychlik 2001). Nyere studier tyder på at antallet sporer påvist i feces hos menneske og dyr er så høgt at det er ikke kan forklares ved inntak av sporer via fôr alene, men at det skjer en oppformering i tarm. Dette indikerer at intestinaltraktus i dyr kan være det egentlige habitatet, og at jordsmonn er mer å betrakte som et reservoar for sporedannende baciller. Totalantallet av aerobe sporer har i en studie blitt vist å være  $10^5$  CFU/g i jord og  $10^4$  CFU/g i human feces (Hong *et al.* 2009).

Tabell 7.2. Innhold av anaerobe sporer i husdyrgjødsel (etter Heyndrickx (2011)).

Organisme	Antall prøver (N)	Log <sub>10</sub> /g	Gjødseltype	
Anaerobe sporer	43	3,0-4,6 CFU	Land	Adler & Lew 1995
		3,7-4,8 CFU	Fastgjødsel	
		1.8-5.2 MPN	Fersk avføring fra storfe	Christiansson <i>et al.</i> 2007 Daniel <i>et al.</i> 1993
Anaerobe sporer	31	1.27 CFU/g	Fersk storfegjødsel	Thurston-Enriques <i>et al.</i> 2005
		8.01 CFU/g	Gammel storfegjødsel	
		0-4,2 CFU/g	Storfegjødsel m/var. TS-innhold	Lilleeng 2010
<i>C.tyrobutyricum</i>		2,0-4,0 CFU/g	Storfegjødsel, 1-20 % TS	Rohde <i>et al.</i> 1994
<u><i>B.cereus</i></u>	56	0 - 2,9 CFU/g	Storfe, feces fra rektum.	Christianson <i>et al.</i> 1999
B.cereus		4,0-5,8 CFU/g		Ôsterling & Lindgren 1991.
Anaerober		4,0-6,0 1.16 CFU/g	Svinegjødsel	Rohde <i>et al.</i> 1994

Det er identifisert et stort antall klostridiearter i husdyrgjødsel og i hovedsak proteolytiske klostridier. Dette kan forklares med at miljøet har høgt innhold av proteiner og aminosyrer. Ettersom det også er et betydelig innhold av cellulose og lignin i gjødsla, påvises normalt også polysakkarid-nedbrytende klostridiearter. Gouet & Contripios (1971) fant at *C.tyrobutyricum* var dominerende art i feces, mens Lango & Heinonen-Tanski (1995) som isolerte hele 24 ulike klostridiearter fra sju prøver med blautgjødsla fra storfe, fant låg forekomst av *C.tyrobutyricum* i gjødsla.

Magnusson (2007) har blant annet vist at at det er en klar sammenheng mellom dyras inntak av *B.cereus*-sporer og sporeinnholdet i gjødsla. I et forsøk med mjølkekyr, ble fôr kontaminert med *B.cereus*-sporer. Dette resulterte i økt innhold av *B.cereus*-sporer i gjødsla fra kyrne.

En sammenstilling av resultater fra en rekke undersøkelser av sporeinnhold i husdyrgjødsel er gitt av Heyndrickx (2011) og gjengis i Tabell 7.2 supplert med data fra en studie av mjølkeproduksjonsgårder i Gudbrandsdalen (Lilleeng 2010). For noen av referansene i tabellen henvises til den omtalte reveiw-artikkelen. Prøvetakings- og analysemetoder varierer mellom de ulike referansene, og det kan derfor være anskelig å sammenligne tallene. Fjærfegjødsel er ikke omtalt i tabellen, men oppgis blant annet av Driehuis (2012) som en «notorisk» kilde for *C. botulinum*.

#### 7.2.4 Spredning av husdyrgjødsel på eng

Ca 90 % av grovfôrårealet (eng og beite) hos storfeprodusentene blir gjødsla med husdyrgjødsel om våren, noe mindre om sommeren (67 %) og bare 10 % om høsten (<http://www.ssb.no/emner/10/04/10/jordarbeid/tab-2001-06-25-07.html>, lasta ned 31.januar 2013). Statistikken inkluderer ikke areal der husdyrgjødsla blir pløyd ned og tilsådd på nytt.

At det brukes så mye gjødsla på eng og beite kan tilskrives det faktum at over 90 % av gjødsla fra storfe og gris lagres og spres som blautgjødsla og/eller gylle (<http://www.ssb.no/emner/10/04/10/jordarbeid/tab-2001-06-25-01.html>, lasta ned 31.januar 2013). Med blautgjødsla menes at feces er blanda med urin, mindre mengder strømaterialer fra fjøset og fôrrester. Avsløpsvann fra fjøset, pressaft fra surførsiloer og eventuelt regnvann (utendørslager) kan være en del av blautgjødsla. Tørrstoffinnholdet i blautgjødsla kan variere fra 6 til nærmere 14 %. Videre er det vanlig å tynne ut blautgjødsla ytterligere med vann til 4-5 % tørrstoff før utkjøring. Den kan da spres gjennom gylleanlegg, slangespredere, gjødslingsmaskin e.l.

I motsetning til Sverige har andelen blautgjødsla i Norge vært høg helt siden 1970-tallet (Nesheim, L., pers.medd). I Sverige ble ca 90 % av husdyrgjødsla lagra som fastgjødsla så seint som på midten av 1990-tallet (Rammer 1996). Det er en viktig grunn til at det i

Sverige på 1990-tallet var stort fokus nettopp på tørrstoffinnholdet i gjødsla og hvordan dette påvirker utnyttingsgraden av gjødsla og den hygieniske kvaliteten av fôret. Fjærfegjødsel er nesten alltid fastgjødsla (ca 28-30 % tørrstoff, blanding av gjødsla og strø) og blir også brukt som gjødsla i grovfôrproduksjonen, men blir nesten alltid pløyd ned i jorda og sjelden spredd på eng.

I en utvalgsundersøkelse av Statistisk Sentralbyrå i 2000 ble bruken av husdyrgjødsla kartlagt, med hensyn til mengder, spredetidspunkt, spredeutstyr og nedmolding. Utvalgsundersøkelsen viste at det ble brukt breispreder eller kanonspreder på 93 % av eng- og beitearealet som ble tilført husdyrgjødsla. På resten av arealet ble gjødsla tilført med stripespreder eller nedfeller. I åpen åker ble 95 % av arealet gjødsla med breispreder. Etter år 2000 finnes det ingen statistikk for hvor mye brukt de ulike spredemetodene er i ulike deler av landet, men inntrykket er at breispredning av husdyrgjødsla med tankvogn enda er svært dominerende. Stripespreder, nedfeller, systemer for slangespredning har imidlertid blitt noe mer vanlig.

Ut over at gjødsla representerer en risiko for at plantene kan kontamineres med sporer, påvirker tilførsel av gjødsla også plantenes kjemiske sammensetning. Økt tilførsel av N kan resultere i mindre sukker og mer N-holdige bestanddeler i plantene. Mangel på sukker kan føre til at de ønska mjølkesyrebakteriene får redusert konkurransekraft i forhold til proteolytiske klostridier som vil øke i antall. Ved sterk N-gjødsling, høg N-status i jorda og mangel på vann, kan det imidlertid produseres store mengder nitrat i plantene. Under surgjøringa som følge av fermenteringsprosessen, reduseres nitrat til nitritt og nitrogenmonoksid. Disse stoffene har dokumentert hemmende virkning på framvekst av klostrider (for referanser, se blant annet Driehuis 2000). Høgt innhold av nitrat i fôret er derimot ikke ønskelig av hensyn til risikoen for nitratforgiftning hos dyra. Sjøl om risikoen er størst på beite, kan det også forekomme ved utfôring av surfôr fra sterkt gjødsla plantemateriale.

#### 7.2.4.1 Gjødslas tørrstoffinnhold ved spredning på eng og beite

Rammer *et al.* (1994) fant høgere konsentrasjon av *B. cereus*-sporer både på gras (Tabell 7.3) og i ferdig surfôr ved spredning av husdyrgjødsla, og da spesielt fastgjødsla, enn når det utelukkende ble brukt mineralgjødsla. Sammenligna med ingen bruk av husdyrgjødsla, ga bruk av blautgjødsla ikke høgere konsentrasjoner av Clostridium-sporer verken på graset eller i surfôret, mens sporetallet økte ved bruk av fastgjødsla. Dessuten resulterte bruken av fastgjødsla i dårligere gjæringskvalitet (høgt innhold av smørsyre). Dette gir ytterligere indikasjoner på at graset ble mer kontaminert med gjødsla ved bruk av fastgjødsla enn blautgjødsla og mineralgjødsla. Fortørking (og bruk av ensileringsmiddel, resultat ikke vist) hadde gjennomgående positiv innvirkning, ved at både antallet sporer ble redusert og gjæringskvaliteten av surfôret bedre (lågere innhold av smørsyre).

Resultatene understøttes blant annet av Daniel *et al.* (1993) og Adler og Lew (1995) som også fant høgere forekomst av klostridiesporer på stående plantemasse ved tilførsel av husdyrgjødsla (gylle, land og fastgjødsla) på eng enn ved tilførsel av samme mengde N

tilført fra mineralgjødning. Adler og Lew (1995) viste imidlertid at antallet sporer gikk ned over tid, og at det i det ikke var effekt av gjødslinga 40 dager etter at gjødsla ble spredd. I Rammer's undersøkelser ble graset høsta 30-50 dager etter gjødselspredning. Tallet på aerobe bakterier var i forsøka til Daniel *et al.* (1993) upåvirkta av at det var tilført husdyrgjødsel.

Tabell 7.3. Innvirkning av husdyrgjødsels tørrstoffinnhold på forekomsten av sporer på henholdsvis direktehøsta og fôrtørka gras og surfôr.

Gjødseltype	Direkte høsta gras (19-23% TS)			Fôrtørka gras (25-49% TS)		
	Mineral- gjødning	Blautgjødning (6 % TS)	Fastgjødning (20 % TS)	Mineral- gjødning	Blautgjødning (6 % TS)	Fastgjødning (20 % TS)
På graset, ved høsting						
<i>B. cereus</i> -sporer	3,2	>4,1	4,9	2,9	3,3	4,7
<i>Clostridium</i> - sporer	<2,0	<2,0	2,5	<2,0	<2,0	2,0
I surfôret:						
<i>Clostridium</i> -sporer, log CFU/g	3,2	3,9	5,1	2,6	2,9	3,5
Smørsyre	1,1	2,0	8,7	0,3	0,5	1,0
NH <sub>4</sub> -N	7,3	7,4	15,6	4,8	4,7	5,6

I en norsk forsøksserie fant Johansen (upublisert) generelt låge konsentrasjoner av klostridiesporer i surfôr fra eng gjødsla med ulike typer og mengder husdyrgjødsel (Tabell 7.4). Det var likevel svak tendens til høgere konsentrasjon av klostridiesporer ved bruk av ublanda storfegjødsel (5-6 % TS) og blautgjødning fra sau (6-10 % TS) sammenligna med vassblanda storfegjødsel (3-4 % TS) og mineralgjødning (kontroll). Det kunne ikke påvises negativ effekt av å bruke vassblanda storfegjødsel (3-4 % TS), sjøl i svært store mengder. Fôret ble ikke analysert for aerobe sporer i disse undersøkelsene.

Tabell 7.4. Effekt av gjødseltype og spredemetode på innholdet av anaerobe sporer i direktehøsta surfôr m/ 15–22 % tørrstoff (Johansen, unpubl.).

Gjødseltype (N=100)	Log <sub>10</sub> MPN/g	Spredemetode for storfegjødsel (N=56)	Log <sub>10</sub> MPN/g
Blaut sauemøkk	1,7	Platespredning	1,3
Ublanda storfegjødsel	1,6	Stripespredning	1,0
Vassblanda storfegjødsel	1,3	Mineralgjødning	0,8
Mineralgjødning	1,0		
<i>P-verdi</i>	<0,01	<i>P-verdi</i>	<0,05

#### 7.2.4.2 Spredetidspunkt, spredehyppighet og effekt av nedbør

I ei feltundersøking som omfattet 100 svenske mjølkeproduksjonsbruk, fant man indikasjoner på økt forekomst av høge sporetall i mjølka på bruk der husdyrgjødsel i hovedsak ble spredd på våren, sammenligna med bruk der gjødsel ble spredd etter førsteslått, på høsten, eller der det utelukkende ble brukt mineralgjødsel (Malmquist og Spörndly 1993). Det må understrekes at et stort flertall av gårdene brukte fastgjødsel.

Rammer (1996) undersøkte om gjentatt tilførsel av blaut storfegjødsel (4-10 % TS) på eng økte risikoen for kontaminering av jord og planter og dermed kunne gi redusert hygienisk kvalitet av surfôret. Gjødsel ble tilført med stripespredningsutstyr. Konsentrasjonen av *Clostridium*-sporer og *Bacillus*-sporer på jordoverflata og på plantene ble ikke påvirket av at det ble tilført husdyrgjødsel. Til tross for dette ble det funnet høgere konsentrasjon av klostridie-sporer i surfôret fra enga som var tilført blautgjødsel, sammenligna med surfôr produsert fra eng gjødsel med mineralgjødsel. Gjødselmengdene i disse forsøka var moderate (2 tonn på våren, 2 tonn etter førsteslått). Det er ikke uvanlig å kjøre ut 3-4 tonn ublanda blautgjødsel (6-8 % TS), eller inntil 5 tonn vassblanda blautgjødsel (3-4 % ts) både på våren og etter førsteslått.

I de norske forsøkene (Johansen, upublisert) fant man ingen klar effekt av å utsette spredninga av husdyrgjødsel fra seks til fire uker før førsteslått. For alle forsøka sett under ett fant man indikasjoner på at både lite og mye nedbør etter gjødselspredning kan gi økt sporeinnhold i fôret, i sammenligning med moderate nedbørsmengder (Johansen 2006). En mulig forklaring på dette fenomenet kan være at det ved mangel på nedbør, både blir redusert plantevekst og mindre nedvasking av husdyrgjødsel, og dermed høgere konsentrasjon av sporer på plantene, mens høge sporetall i forbindelse med store nedbørsmengder kan skyldes kjøreskader og innblanding av jord og døde/døende planterester under innhøstinga.

I et forsøk på Sæter fagsenter med kunstig vanning for å simulere ekstra nedbør rett etter at gjødsel var spredd, greide man imidlertid ikke å påvise at dette hadde innvirkning på innholdet av klostridiesporer i surfôret (Johansen og Todnem, upublisert). Tilsvarende undersøkelser er gjort etter spredning av fastgjødsel på grasmark i Sverige. Heller ikke her ble det påvist at nedbørsmengden hadde innvirkning på kvaliteten og/eller sporeinnholdet i fôret (Rohde *et al.* 1996).

#### 7.2.4.3 Spredemåte

Laws *et al.* (2002) har vist at gjæringskvaliteten av surfôr reduseres når avstanden i tid fra gjødselspredning til høsting avtar. Konsentrasjonen av smørsyre og ammoniakk-N økte mens innholdet av mjølkesyre ble mindre når tidspunktet for spredning av blautgjødsel ble utsatt fra 10, til 6 og videre ned til 2 uker før høsting. Effekten var imidlertid liten når det ble brukt nedfellingsutsyr, men særlig tydelig ved breispredning av gjødsel. I disse forsøka ble ikke fôrets innhold av sporer analysert.

I den tidligere refererte norske forsøksserien med spredning av husdyrgjødsel på eng ble også ulike spredemetoder sammenligna. Sporetalla var gjennomgående låge, men den tradisjonelle metoden med bruk av tankvogn med platespreder resulterte i noe høgere

innhold av klostridiesporer i surfôret enn stripespredning og bruk av utelukkende mineralgjødning (Tabell 7.4). Seinere er det i regi av Bioforsk og Norsk Landbruksrådiving gjort sammenlignende forsøk med husdyrgjødning spredd med henholdsvis nedfellingsmetoden og breispreeingsmetoden, og gjødning med utelukkende mineralgjødning. Forsøka ble gjennomført i Gudbrandsdalen (2008-2009) uten tilsetning av ensileringsmiddel og med fortørking av graset til 25-30 % TS. Heller ikke i disse undersøkelsene var det mulig å påvise forskjeller av de ulike spredemetodene når det gjaldt innhold av klostridiesporer i det ferdige (rundballe)surfôret. Det ble påvist sporer bare i noen få prøver og i låge konsentrasjoner (Nesheim *et al.* 2010).

### 7.2.5 *Husdyrgjødning på beite*

Eventuell spredning av husdyrgjødning på beiter påvirker i første rekke dyras beiteadferd, gjennom at dyra viser aversjon mot å beite gras som er kontaminert med gjødning, eller i nærheten av gjødningruker og urinflekker. Det er derfor anbefalt at det bør gå minst tre uker fra husdyrgjødning er spredd på beitemark, før dyra slippes utpå (Johansen & Höglind 2003). Høgt beitepress og sterkt kontaminering av beitearealet med feces gir etter all sannsynlighet økt risiko for at også jur og spener blir kontaminert med klostridiesporer, uten at dette ser ut til å være direkte dokumentert i litteraturen.

### 7.2.6 *Slått, fortørking og innhøsting*

Sjøl om plantene i noen grad kontamineres i løpet av vekstperioden, skjer den mest omfattende kontamineringa i forbindelse med slått og innhøsting.

Norsk rådgivingstjeneste anbefaler høg stubbehøgde som et viktig tiltak for å redusere risikoen for kontaminering av graset under innhøsting med jord, gjødningrester og dødt plantemateriale og dermed også risikoen for å få med sporer inn i siloen. I en svensk studie kunne man imidlertid ikke påvise forskjeller verken i mikroflora eller fermenteringskvalitet ved stubbehøgder på henholdsvis 10-12 cm og 5-6 cm (Malmquist & Spörndly 1993). I disse forsøka var det spredd husdyrgjødning på enga.

En ny undersøkelse ved Sveriges Lantbruksuniversitet antyder at tørrstoffinnholdet i graset ikke har betydning for mengden sporer på graset som blir med inn i siloen (Müller & Johansen 201x). Gras fra samme eng ble fortørka til henholdsvis 30, 50 og 70 % tørrstoff. Forskjellene i tørrstoffinnhold ble oppnådd med varierende lengde på fortørkingsperioden, og alt gras ble breispredd. Det kunne ikke påvises klostridiesporer ved silolegging for noen av alternativene. Innholdet av *B.cereus* ble ikke analysert. Dersom økt tørrstoffinnhold i graset oppnås f.eks. gjennom økt bruk av venderive, er det imidlertid grunn til å anta risikoen for kontaminering med sporer fra jord, dødt plantemateriale og eventuelle rester av husdyrgjødning på jordoverflata øker.

Spörndly *et al.* (2009) og Johansen *et al.* (2010) sammenligna sporeinnholdet i fortørka surfôr der graset enten ble strenglagt eller breispreidd. Fortørkingsmetodene ble utført parallelt og på samme jorde/engstykke. I de svenske forsøka ble det oppnådd et tørrstoffinnhold på 40 % ved breispreiingsmetoden og i underkant av 30 % ved strenglegging. Det var klart høgere innhold av smørsyre i surfôret fra strenglagt, moderat fortørka gras enn fra breispreidd, sterkt fortørka gras. Den føreløpige konklusjonen var derfor at breispreiingsmetoden så ut til å kunne gi bedre hygienisk kvalitet på surfôret enn strengleggingsmetoden gjennom å øke opptørkingshastigheten og dermed muligheten til å oppnå høgt tørrstoffinnhold i graset før pressing. Klostridienes aktivitet vil avta gradvis med økende tørrstoffinnhold, for etter hvert å opphøre rundt 35-40 % tørrstoff (Mc Donald *et al.* 1991). Seinere ble det imidlertid gjennomført et tilsvarende forsøk under andreslått, med lågere oppnådd tørrstoffinnhold i graset ved pressing. Her var resultatene mer i samsvar med det man fant i de norske forsøka (Spörndly, pers.medd.) som ble gjennomført på Nord-Vestlandet. Her ble det bare oppnådd 33 % tørrstoff ved breispreiing (mot 26 % ved strenglegging). Mikrobiologiske analyser avslørte her forekomst av klostridiesporer i 67 % av tilfellene når surfôret var produsert fra breispreidd gras mens det tilsvarende tallet for surfôr produsert fra strenglagt gras bare var 42 %. Det var ingen forskjell i frekvensen av tilfeller med *B.cereus* mellom de to fortørkingsmetodene. Ved breispreiing må graset samles med rive før det kan presses i rundballer. Under denne prosessen kan jord, rester av husdyrgjødsel og/eller dødt/døende plantemateriale bli revet opp og bli med inn i massen. Det kan derfor ikke avvises at breispreiingsmetoden øker risikoen for at fôret kan kontamineres med sporer sammenligna med tradisjonell strenglegging, spesielt under innhøstingsforhold med mye dødt plantemateriale i bunnen og/eller ujevn jordoverflate.

### 7.3 Sporeinnhold i andre fôrslag enn gras og surfôr

I en norsk undersøkelse fant Torp *et al.* (2001) at innholdet av aerobe sporer var om lag 10 ganger høgere i mask (5,95 log<sub>10</sub>/g) enn i surfôr (4,04 log<sub>10</sub>/g). Det var ikke oppgitt sporetall i kraftfôr og høy i denne referansen, men tallet på vegetative bakterier var lavt (henholdsvis <100 og 100). Christiansson *et al.* (1999) fant i gjennomsnitt 3,5 log<sub>10</sub> aerobe sporer/g i høy, med et maksimalt innhold på 4,6 log<sub>10</sub>/g. Christiansson *et al.* (1999), Slaghuis *et al.* 1997 og TeGiffel *et al.* (1995) har alle påvist lavt innhold (<3,0 log<sub>10</sub>/g) av *B.cereus* i kraftfôr.

## 8. Risikofaktorer for oppformering av sporedannende bakterier under ensilering, lagring og utfôring

---

### 8.1 Årsaker i ensileringsarbeidet til at sporer oppformerer i surfôr

#### 8.1.1 *Tempo i silolegginga (kapasitet på høsteredskapen i forhold til silostørrelse)*

Når graset slås opphører fotosyntesen, mens respirasjonen fortsetter. Grasets respirasjon gir tap av tørrstoff (TS) og en betydelig varmeutvikling. Så lenge graset ligger luftig ute på jordet vil det ikke bli målbar varmeutvikling, så temperaturen i graset vil være den samme som lufttemperaturen. Straks graset fylles i tilhenger, legges inn i siloen, eller presses i rundballe vil respirasjonsvarmen oppkonsentreres i grasmassen. Så lenge deler av graset er levende, og oksygen er tilgjengelig, vil respirasjonen fortsette. Varmen i grasmassen vil da være en kombinasjon av grasets temperatur ved høsting (utetemperaturen), grasets respirasjon og eventuell respirasjon fra mikrobiell aktivitet. Mengden av ulike mikroorganismer som følger graset inn (epifyttfloraen) sammen med tidsaspektet fra graset plukkes opp på jordet og til lufta er presset ut av massen, har stor betydning for hvilke, og i hvor stor grad, aerobe mikroorganismer oppformerer i grasmassen. Temperaturen i grasmassen påvirker hvor raskt mikroorganismene oppformerer. Langvarig innlegging i silo, som gir varmgang i grasmassen er en kjent årsak til oppformering av gjærsopp (Wilkinson og Davies 2013). Når lufttilgangen opphører går gjærsoppen over til anaerob metabolisme, og vokser mye saktere. Når luft igjen kommer til ved åpning av siloen vil varmgang komme raskt når det er mye gjærsopp i fôret. Det er en godt kjent sammenheng mellom varmgang ved innlegging og uttak fra silo. Varmgang, spesielt ved uttak, er nært knyttet til høgt innhold av anaerobe sporer i fôret (Vissers *et al.* 2007a).

#### 8.1.2 *Komprimering av grasmassen*

Alle typer siloer og baller blir noen ganger for dårlig komprimert, med resultat at luft kan trenge inn i massen på sårbare punkt hvor siloen er utett eller plastdekket er dårlig. Dårlig komprimert masse finnes ofte øverst i tårnsiloer, langs kanter, på toppen og i enden av plansiloer, og i hele, eller i sentrum av rundballer. I tårnsiloer utgjøres komprimeringa av vekta på graset som ligger høgere opp i siloen. God jamning i siloen er da det viktigste tiltaket for å oppnå kompakt surfôrmasse. Det er en stor utfordring å oppnå god hygienisk kvalitet i toppsjiktet i tårnsiloer. I plansiloer er også god jamning nødvendig, men der er det i tillegg i stor grad arbeidet som gjennomføres med pakketraktoren som bestemmer komprimeringa.

Behovet for komprimering er avhengig av plantematerialet som høstes. Grovt plantemateriale som skyldes plantens fenologi, for eksempel grove stengler av luserne, strandsvingel eller bladfaks, eller høsting ved seint utviklingstrinn, setter strenge krav til



finkutting av grasmassen for å kunne komprimeres tilstrekkelig. Jo tørrere graset er, jo lettere trenger luft inn i massen, og behovet for finkutting øker.

For sjelden pakking i plansilo, slik at sjiktene som pakkes blir for tynne, for liten vekt på pakkeredskaper, eller for liten pakketid totalt, gir for dårlig komprimering (Muck and Holmes 2000). En femårig undersøkelse av volumvekt på TS-basis ( $\text{kg TS/m}^3$ ) i maissurfôr i Pennsylvania (Craig *et al.* 2009) avdekket meget store forskjeller i volumvekt ulike steder i plansiloer. Høgest volumvekt var det i bunnen midt i siloene, mens volumvekta ble kraftig redusert ut mot kantene, og mot toppen, av surfôrmassen. Total variasjon for enkeltpunkter var fra 75 til 348  $\text{kg TS/m}^3$ . I gjennomsnitt for 12 prøvepunkter (fire i bredden, og tre i høyden) i hver silo varierte volumvekta fra 133 til 269  $\text{kg TS/m}^3$ , og bare 29 % av siloene hadde gjennomsnitt over "måltallet" på 222  $\text{kg TS/m}^3$ , som tidligere ble foreslått av Ruppel *et al.* (1995). Til sammenlikning fant Muck og Holmes (2000) en variasjon fra 106 til 434  $\text{kg TS/m}^3$  som middelverdi per silo for 175 siloer med mais og luserne i Wisconsin. I en undersøkelse av 127 plansiloer med grassurfôr fant Spiekers *et al.* (2009) at gjennomsnittlig volumvekt økte fra 173  $\text{kg TS/m}^3$  i toppsjiktet, til 214  $\text{kg TS/m}^3$  i midten og 229  $\text{kg TS/m}^3$  i bunnsjiktet. Volumvekta økte med 3  $\text{kg TS/m}^3$  per prosentenhets økt TS %. For å unngå varmgang ved åpning av plansiloer anbefalte Spiekers *et al.* (2009) at volumvekta bør være minimum 160  $\text{kg TS/m}^3$  ved 20% TS i graset, stigende til 290  $\text{kg TS/m}^3$  ved 55 % TS i graset. Ved bruk av siloer i laboratorieskala viste imidlertid McEniry *et al.* (2007) at komprimeringa av surfôr er uten betydning for kvaliteten hvis siloen er så tett at ingen luft slipper til i surfôret. På 80- og 90-tallet ble det satt opp noen få gasstette grassiloer med bunnuttak i Norge, men på grunn av praktiske problemer med å få fôret ut (frost i fuktig surfôr) er slike siloer ikke lenger i bruk her i landet. Bortsett fra små laboratorieskala-siloer er ingen andre siloer helt gasstette, og komprimeringa, både i siloer (Vissers *et al.* 2007a) og i rundballer (Randby 1996), er vist å ha stor betydning for surfôrets hygieniske kvalitet. Jo mer utett siloen er, eller jo dårligere plastkvalitet som er nytta til tetting, jo viktigere er god komprimering av massen. Mens luftinfiltrasjon i fuktig surfôr ga kraftig smørsyregjæring, ga luftinfiltrasjon til fortørka surfôr en kraftig vekst av gjærsopp, stort forbruk av WSC og økt massetap (McEniry *et al.* 2007).

Ved undersøkelse av ulike punkt i åtte plansiloer med mais fant Vissers *et al.* (2007a) at alle surfôrprøver (16 av 128) med høgt innhold av smørsyresporer ( $> 5 \log_{10} \text{MPN/g}$ ) kom fra de øverste 50 cm av siloen. Alle de 8 siloene inneholdt minst ei prøve med høgt sporeinnhold. Ingen av prøvene fra "surfôrkjernen" (minst 160 cm fra topp eller vegg) hadde sporeinnhold  $> 3 \log_{10} \text{MPN/g}$ , hvilket viser at vekst av smørsyrebakterier ikke hadde skjedd i kjernen av siloen. Surfôrets tetthet ble målt til å være nesten 4 ganger høyere i kjernen ( $96 \text{ N/cm}^2$ ) enn i overflaten ( $25 \text{ N/cm}^2$ ). Også Nadeau *et al.* (2010) fant mye høyere innhold av klostridiesporer i plansilo 20-30 cm fra siloveggen enn midt i silokjernen.

Tidligere undersøkelse av maissurfôr i plansilo viste også låge verdier av klostridiesporer i kjernen ( $2 \log_{10} \text{MPN/g}$ ), men høge verdier ( $> 5 \log_{10} \text{MPN/g}$ ) i perifere områder som var mer eksponert for luft (Corrot 1986).

### 8.1.3 *Plastkvalitet og plastmengde for tetting av surfôrsiloer og -baller*

Kvaliteten på plastdekket er av stor betydning for utestengningen av luft i det ytterste sjiktet både i plan- og tårnsiloer, og i alle typer plastpakket fôr, som små og store rundballer, firkantballer og surfôrpølser. Borreani & Tabacco (2008a) sammenlikna tradisjonell 180 µm tykk svart-hvit polyeten (PE) plast med 125 µm tykk svart-hvit ekstrudert polyeten plast med ekstra oksygen-barriere (OB). Oksygenpermeabiliteten ble målt til 990 og 70 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> per 24 timer for de to respektive plastkvalitetene ved 23°C, stigende til >3000 og 400 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> per 24 timer for de to kvalitetene ved 50°C. På begge de to undersøkte gårdene var innholdet av klostridiesporer i surfôret ved åpning, i et sjikt ca 40 cm under overflate, lågere ved bruk av OB-plast enn ved bruk av vanlig PE-plast (2,24 vs. 5,04 log<sub>10</sub> MPN/g og 1,29 vs. 2,19 log<sub>10</sub> MPN/g, henholdsvis på gård 1 og 2). Innholdet av klostridiesporer 40 cm under OB-plast var på begge gårdene omtrent like som i prøver tatt i kjernen av surfôret, 1,5 m under overflaten (2,09 og 1,19 log<sub>10</sub> MPN/g i prøver fra surfôrkjernen henholdsvis på gård 1 og 2). God plastkvalitet, med oksygenpermeabilitet < 100 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> per 24 t hindret økt mengde klostridiesporer i surfôr (Borreani & Tabacco 2008a). Surfôret under PE-plast på gård 1 inneholdt ubetydelig med smørsyre, < 2 g/kg TS, til tross for et sporeinnhold (5,04 log<sub>10</sub> MPN/g) som anses å være så høgt at det ikke bør brukes til mjølkekyr (Vissers *et al.* 2006). Lafrenière (2007) fant > 4 log<sub>10</sub> MPN/g av klostridiesporer i surfôr hvor smørsyreinnholdet var under deteksjonsgrensen. Forfatteren har ikke gitt noen forklaring på dette fenomenet.

Borreani & Tabacco (2008b) sammenlikna to typer og mengder plastfilm til rundballer, 2, 4, 6 og 8 lag, med enten vanlig, hvit, 25 µm tykk PE-film eller transparent coextrudert 25 µm tykk OB-film. OB-filmen var helt overlegen i å redusere vekst av mugg på overflaten og i å redusere TS-tapet i rundballene. Sporeinnholdet i rundballe surfôret var imidlertid lågt i alle prøvene, med verdier fra 1,0 til 2,2 log<sub>10</sub> MPN/g, og så vidt lågere for OB-film enn for PE-film i det aller ytterste sjiktet av ballene (0 til 3 cm under overflaten).

Når det ble oppnådd strikt anaerobe forhold i maissurfôr (i kjernen av plansiloer) økte ikke mengden klostridiesporer i løpet av gjæringsprosessen, den ble heller litt redusert, fra 2.76 til 2.09 log<sub>10</sub> MPN/g på en gård og fra 3.01 til 1,19 log<sub>10</sub> MPN/g på en annen gård (Borreani & Tabacco 2008a). Disse verdiene er i samme område som gjennomsnittlig verdi 2.23 log<sub>10</sub> MPN/g funnet i 1953 prøver av maissurfôr (Cotto 1983) og i området 1,0 til 3,0 log<sub>10</sub> MPN/g funnet i kjernen av 20 siloer med maissurfôr (Corrot 1986).

### 8.1.4 *Bruk av ensileringsmidler*

Det viktigste formålet ved bruk av ensileringsmidler i Norge har tradisjonelt vært å redusere risikoen for feilgjæring i fuktig surfôr, der feilgjæring i hovedsak er definert som smørsyregjæring, altså vekst av klostridier. Med økt bruk av fortørking er man i utgangspunktet ikke like utsatt for smørsyregjæring som ved direkte høsting av gras med under 20 % TS. Ved ensilering av fortørka gras i rundballer under gode forhold kan smørsyregjæring normalt unngås selv uten bruk av ensileringsmidler (Randby 2010a,b; Holte 2012). Surfôrprøver fra praksis har imidlertid vist at forholdene rundt omkring i Norge er langt fra ideelle, slik at bruk av syreholdig ensileringsmiddel fremdeles har en

sterk berettigelse for å hindre smørsyregjæring, i alle fall opp til 35 % TS i gras (Holte 2012). I tillegg er det mange flere grunner til å nytte syreholdige ensileringsmidler. Det reduserer intensiteten i surfôrgjæringa både i fuktig og fortørka surfôr (Huhtanen *et al.* 2002), hvilket øker fôropptaket (Huhtanen *et al.* 2002; Krizsan & Randby 2007), produksjonen av mikrobeprotein i vomma (Jakkola *et al.* 2006), mjølkeytelsen og fett- og proteinprosent i mjølk (Huhtanen *et al.* 2003).

Ensileringsmidler basert på maursyre som aktiv ingrediens har vært mest brukt i Norge, men også enkelte andre syrer, særlig propionsyre, og andre typer midler, har vært brukt. Den omfattende bruken av maursyre i Norge har uten tvil bidratt sterkt til å begrense problemet med smørsyregjæring i fuktig surfôr under vanskelige innhøstingsforhold, spesielt ved at pH umiddelbart senkes, men også fordi at syra dreper en del av plantecellene, og derved hemmer respirasjon og varmeutvikling i gras. Låg pH og temperatur favoriserer mjølkesyrebakterier framfor klostridier. Andre typer ensileringsmidler, som inokulanter (mjølkesyrebakterie-kulturer) og rene kjemiske preparat basert på natrium-nitritt og hexametylentetramin har også i noen grad blitt brukt. Inokulanter har vært markedsført i Norge i rundt 30 år, men har aldri fått særlig utberedelse. Hovedårsaken til dette er trolig at en stor andel av bøndene som har tilsatt inokulanter ved ensilering i siloer har fått problemer med varmgang både ved innlegging og uttak (Nordang 1991). Kofasil Ultra (natrium-nitritt, hexametylentetramin, propionsyre og benzoesyre) blir nå brukt i ganske stort omfang til fortørka rundballer. Natrium-nitritt reduserer germinering av klostridiesporer i surfôr (Spoelstra 1983). Mer enn 1 g nitrat per kg fôr, som omdannes til den aktive komponenten nitritt, beskytter mot vekst av *C. tyrobutyricum* i surfôr (Spoelstra 1983). Denne effekten av nitritt, for å senke antallet klostridiesporer i surfôret, er hovedformålet ved bruk av Kofasil Ultra ved ensilering. Knicky & Spörndly (2009) viste at effekten er doseavhengig, men at dosen kan reduseres hvis nitritt kombineres med andre effektive kjemikalier, for eksempel Na-benzoat og Na-propionat, eller Na-benzoat og K-sorbat. Tabacco *et al.* (2009) fant klostridievekst bare i surfôr der nitratinnholdet var under deteksjonsgrensen på 100 mg/kg fôr. Fortørka surfôr har ofte ikke så låg pH at det i seg sjøl hindrer vekst av klostridier. Driehuis og Van-Wikselaar (2000) anbefaler å unngå etanolgjæring i fortørka surfôr fordi etanolgjæring og syregjæring konkurrerer om substrat, og i motsetning til syregjæring bidrar ikke etanolgjæring til å senke pH, og derved til å hemme klostridievekst. Økende tørrstoffinnhold hemmer vekst av klostridier (McDonald *et al.* 1991). Dersom varmgang i fortørka surfôr fører til "lommer" med økt fuktighet, vil imidlertid forholdene ligge til rette for vekst av klostridier også i fortørka fôr.

Nadeau *et al.* (2010) studerte forskjeller mellom gårder med høgt og lågt sporeinnhold i mjølk, og fant noe hyppigere bruk av rundballer på gårder med mye sporer (50 % rundballer) enn på gårder med lågt sporeinnhold i mjølk (27 % rundballer). Majoriteten av surfôret i hele undersøkelsen inneholdt 30 til 44 % TS. Rundballene var i hovedsak ensilert uten tilsetningsmidler, mens det øvrige surfôret i hovedsak var ensilert med tilsetningsmidler (inokulanter eller syremidler).

## 8.2 Årsaker til oppformering av sporer i surfôr under uttak og ved fôring

### 8.2.1 Varmgang ved åpning (surfôrets aerobe stabilitet)

Når siloer åpnes og luft slipper til endres brått vekstbetingelsene for mikrobenene i surfôret. Overgang fra anaerob til aerob vekst av syretolerant mjølkesyreforbrukende gjærsopp (*Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* og *Pichia spp.* (Pahlow *et al.* 2003) som allerede er til stede i surfôret er normalt det første som skjer. Gjær forbruker sukker og mjølkesyre, og øker både temperatur og pH i surfôret (Muck 2012). Deretter vokser *Bacillus spp.* og andre aerobe bakterier opp, som ytterligere øker temperaturen, før muggsopp til slutt fullfører nedbrytningen av fôret (Muck 2012). De mest aktuelle gjærsopper har temperaturoptimum rundt 30°C (Wilkinson & Davies 2013). Bonnefoy *et al.* (2009) studerte stabiliteten til mais- og grassurfôr ved 10, 20 og 30°C, og fant god stabilitet ved 10°C, men pH-økning, og en økning i mengden gjær og mugg ved lagring ved 20 og 30°C.

Temperaturen i omgivelsene og i surfôret er derfor av betydning for hvor raskt en aerob nedbrytning vil skje. Temperaturstigningen i massen går raskere i tørt enn i fuktig surfôr fordi det trengs mer varme til å heve temperaturen i fuktig materiale (McDonald *et al.* 1991). I en studie som omfattet 25 gårder i Nederland fant Te Giffel *et al.* (2002) at grassurfôr er en betydelig kilde til kontaminering av mjølk med *Bacillus*-sporer, med innhold i surfôr fra 10<sup>2</sup> til 10<sup>5</sup> sporer per g. Innholdet av aerobe sporer i mjølk ble målt til 1 til 100 sporer per ml. Gras blir kontaminert med jord ved høsting, og germinering og oppformering av *Bacillus*-bakterier skjer i forbindelse med lufttilgang og varmgang ved åpning av surfôret (Te Giffel *et al.* 2002). I en studie som omfattet sju gårder i Sverige fant derimot Magnusson *et al.* (2007) at innholdet av *Bacillus cereus*-sporer var så lågt i fôr at det var uten betydning for innholdet i mjølk, men at det var svært høgt innhold i sagflis som var brukt i liggebåsene (17 000 *B. cereus*-sporer per g flis).

Den viktige rollen til gjærsopp i å sette i gang varmgangsprosessen i surfôr når luft kommer til er godt dokumentert (Johnson & Pahlow 1984, Pahlow *et al.* 2003). I tråd med dette fant Tabacco *et al.* (2011) at mengden gjær i surfôret ved åpning var sterkt negativt korrelert ( $R^2 = 0,628$ ) med surfôrets aerobe stabilitet. Mengden gjær varierte fra < 1,0 til > 5,0 log<sub>10</sub> cfu/g, og var sterkt negativt korrelert med uttakshastigheten på surfôret, surfôrets tetthet (kg TS/m<sup>3</sup>), pH, TS- % og eddiksyreinhold, og positivt korrelert med innholdet av mjølkesyre. Wolthusen *et al.* (1989) fant at surfôr med minst 8 g udisosiert eddiksyre per kg fôr ble funnet å være stabilt, mens surfôr med mindre enn 3 g per kg var ustabil. Östling & Lindgren (1995) har angitt en likning for beregning av mengde udisosiert eddiksyre avhengig av total eddiksyremengde og surfôrets pH. Kriterier for at surfôr skal ha god aerob stabilitet er foreslått av Wilkinson & Davies (2013) til: < 10<sup>5</sup> cfu gjærsopp/g og ≥ 8 g udisosiert eddiksyre/kg. I tillegg må surfôrets tetthet være på 170-180 kg TS/m<sup>3</sup> ved 25 % TS og 240-250 kg TS/m<sup>3</sup> ved 45 % TS.

Når vekst av aerobe organismer, for eksempel gjærsopp, på surfôroverflaten når et visst omfang bruker de opp oksygen slik at forholdene like under blir anaerobe (Muck & Pitt

1994). Dette gir grobunn for klostridievekst (Jonsson 1989). Vissers *et al.* (2007a) påviste at surfôrprøver fra områder i siloen med tegn på aerob ustabilitet (høgere temperatur enn omgivelsene, høgt antall gjær og mugg-sopp, høg pH) også hadde høgest innhold av klostridiesporer.

Prøver av grassurfôr tatt fra siloer på gårder i Nederland i 1982 viste at hele 44 % av prøvene inneholdt mer enn  $10^5$  klostridiesporer per g, og at gjennomsnittlig sporeinnhold var  $4,9 \log_{10}/g$  (Spoelstra 1984; 1990). Nyere data fra Nederland i 2002 og 2004 viste at innholdet av klostridiesporer i surfôr da var blitt vesentlig lågere. Bare 5 % av prøvene inneholdt  $>10^5$  klostridiesporer per g, og gjennomsnittlig sporeinnhold var  $3,2 \log_{10}/g$  (Driehuis 2012). Dette var i tråd med reduserte problemer med sporer i mjølk levert til meieri i tidsrommet 1980 til 2000 (Driehuis 2012). Mens surfôrprøvene i de eldre undersøkelsene var tatt fra surfôr ved åpning, gjennomførte Vissers *et al.* (2007a) seinere en undersøkelse der prøver fra 21 gårder ble tatt fra gras- og maissurfôr både fra siloene, samt i fjøset ved fôring etter at de to surfôrtypene hadde blitt blandet. Gjennomsnittlig klostridiesporeinnhold i surfôrblandingene ved fôring var mer enn 10 ganger så høgt som i prøvene tatt direkte fra siloene. Hele 18 % av surfôrblandingene hadde  $> 10^5$  sporer/g, og ytterligere 41 %  $> 10^4$  sporer/g, mens 5 og 15 % av grassurfôrprøvene, og 0 og 0,5 % av maissurfôrprøvene ved åpning hadde tilsvarende høge (henholdsvis  $>10^5$  og  $>10^4$  sporer/g) verdier (Vissers *et al.* 2007a). Maissurfôr er mindre utsatt for oppformering av klostridiesporer under den anaerobe surfôrgjæring enn grassurfôr, men er mer utsatt for varmgang ved åpning, og bidrar derfor mer til høgt sporeinnhold i surfôr som følge av varmgang ved utfôring (Driehuis 2012). I en påfølgende undersøkelse på 24 gårder i Nederland fant Vissers *et al.* (2007b) en nær sammenheng mellom klostridiesporeinnholdet i prøver av blandet surfôr tatt på fôrbrettet og innhold av sporer i tankmjølk. Ut fra målsetningen om å oppnå mindre enn 1000 sporer/L mjølk, må fôret ligge under  $\log_{10} 3$  cfu/g, og aller viktigst er det at fôret aldri kommer opp i  $\log_{10} 5$  cfu/g. Hvis prøvene tas fra feces, tilsvarer dette at innholdet i faeces må være  $< \log_{10} 4$  cfu/g. På grunn av tida som går fra surfôret utsettes for luft og til fôret er spist opp, anbefaler Wilkinson & Davies (2013) et måltall for surfôrets aerobe stabilitet på sju døgn.

### 8.2.2 Kvalitet på plastdekket og aerob stabilitet

Når plastdekket over siloer ikke er tett, slik at surfôret har hatt noe lufttilgang over lengre tid før åpning, reduseres den aerobe stabiliteten (McEniry *et al.* 2007; Wyss & Rubenschuh 2012). Dette skyldes trolig at gjærsopp har blitt oppformert over tid. Dolci *et al.* (2011) fant at plastens tetthetsegenskaper hadde stor betydning for surfôrets innhold av gjærsopp ved åpning, og fôrets påfølgende aerobe stabilitet. Rundballesurfôr av fuktig gras, hvor plasten ble perforert av 75 spiker-stikk to uker før åpning, hadde redusert innhold av mjølkesyre, økt innhold av  $\text{NH}_3\text{-N}$ , økt pH, og fikk redusert sin aerobe stabilitet fra 113 til 44 timer (Randby 2002). Ved åpning av plansilo fant Borreani og Tabacco (2008a) høge konsentrasjoner av smørsyresporer,  $5,04 \log_{10}$  MPN/g, i toppsjiktet, inntil 40 cm under surfôroverflaten, i en silo utsatt for luftlekkasje over lengre tid pga dårlig plast (svart/hvit180- $\mu\text{m}$  tykk polyeten plast), mens bedre plastkvalitet (coekstrudert polyeten/polyamid-plast med økt oksygen-barriere) på en annen del av samme silo bare ga  $2,24 \log_{10}$  MPN/g med smørsyresporer.

### 8.2.3 *Uttakshastighet og aerob stabilitet*

Uttakshastigheten fra plansilo, sett i forhold til temperaturen, er den viktigste faktoren som styrer aerob nedbrytning av surfôr under uttak. For å minimere problemet med dårlig aerob stabilitet må god ensileringssteknikk kobles med tilstrekkelig raskt uttak (Borreani & Tabacco 2012). Nødvendig uttakshastighet er nært knyttet til hvor kompakt surfôret er (surfôrets tetthet), og det er viktig å holde en glatt, fin surfôroverflate når fôret tas ut (Wilkinson og Davies 2013). Wilkinson (2005) foreslo minimum uttakshastighet fra plansiloer til å være 15 til 30 cm/dag om vinteren og det dobbelte om sommeren. Til sammenlikning ble det på italienske gårder observert uttakshastigheter på 7 til 25 cm om vinteren og 8 til 33 cm om sommeren (Borreani & Tabacco 2010). Anbefalte daglige uttakshastigheter ved seks lokaliteter i verden spenner fra 1 m/uke ved låge vintertemperaturer (< ca 4°C) til 2,15 m/uke ved høge sommertemperaturer (ca 24°C) (Borreani & Tabacco 2012). Plansiloer blir ofte konstruert for å gi maksimal effektivitet i innlegginga, og er for brede til å sikre tilstrekkelig rask uttakshastighet (Wilkinson & Davies 2013). Kunnskap om mengde fôr som skal tas ut daglig, samt temperaturen i den årstiden fôret skal brukes, er nødvendig når plansiloer skal dimensjoneres (Borreani & Tabacco 2012). Når platen er utett er porøsiteten og tettheten (volumvekta) av surfôret, samt uttakshastigheten, av stor betydning for kvaliteten av surfôret som tas ut (Driehuis & Elferink 2000).

### 8.2.4 *Effekt av ensileringsmidler på aerob stabilitet*

Bruk av vanlige homofermentative mjølkesyrebakterier som *L. plantarum*, *L. casei*, *Pediococcus spp.* og *Enterococcus faecium* har vist seg å ha en negativ effekt på surfôrets aerobe stabilitet, sannsynligvis fordi mengden eddiksyre i surfôret reduseres (Muck 2012). På slutten av 1990-tallet ble inokulanten *Lactobacillus buchneri* lansert. Den vokser sakte, og produserer eddiksyre fra WSC og mjølkesyre, særlig når den mest intensive surfôrgjæringa avtar (Muck 2012). Målet med økt eddiksyreinhold er å bedre den aerobe stabiliteten til fôret ved å hemme vekst av gjær og mugg. Økt aerob stabilitet ved bruk av *L. buchneri* er godt dokumentert (Li & Nishino 2011; Tabacco *et al.* 2011; Chaucheyras-Durand 2012). Surfôrets gjæringskvalitet blir ikke forbedret ved inokulering med *L. buchneri*, heller tvert i mot, så *L. buchneri* brukes ofte i kombinasjon med homofermentative mjølkesyrebakterier (Muck 2012).

Ensileringsmidler basert på syrer, spesielt kombinasjonen av propionsyre og maursyre, men også maursyre alene, øker surfôrets aerobe stabilitet (Randby 1996a; 2002; 2010a; 2010b). Kofasil Ultra øker fôrets aerobe stabilitet under de fleste forhold (Knicky & Spöndly 2009; Randby 2010b), men gir ikke like entydig positiv effekt som syrebaserte midler (Randby 2010a; Holte 2012). Et nytt ensileringsmiddel basert på Na-benzoat og hydrogen-peroksyd har gitt bedre aerob stabilitet enn både negativ kontroll og maursyretilsetning, men ga ingen forbedring av surfôrets gjæringskvalitet sammenlikna med negativ kontroll (Heikkilä *et al.* 2012).

### 8.2.5 Oppformering av sporer i forbindelse med fôring

Dårlig hygienisk kvalitet i fullfôr er et vanlig problem som mistenkes å være koblet til produksjonsproblemer, dårlig dyrehelse, store TS-tap, redusert fôropptak og redusert ytelse (Werner 2003; Kung 2005). Kung (2005) fant at halvparten av prøver av fullfôr på gårdsbruk hadde aerob stabilitet på mindre enn 12 timer. Sju av 9 prøver av fullfôr tatt ut på gårder i Sverige hadde nedsatt hygienisk kvalitet, hvorav 4 prøver hadde sterkt nedsatt kvalitet (Werner 2003). En mikrobiologisk studie av fullfôr viste at vekst av aerobe bakterier og gjærsopp økte kraftig etter ca 2 døgn, og at varmgang oppsto etter 3 til 4 døgn (Werner 2003). Under produksjon av fullfôr blandes ingredienser som har ulik hygienisk kvalitet, og luft blandes inn. Dette utgjør en risiko for vekst av aerobe organismer, spesielt hvis temperaturen er høy (Seppälä *et al.* 2010). Undersøkelse av fullfôrblandere på 9 gårder viste en variasjon fra mindre enn 1 kg til 140 kg i mengde fôr som var igjen i blanderen etter at den tilsynelatende var tømt i forbindelse med fôring (Werner 2003). I forsøksskala produserte Seppälä *et al.* (2010) fullfôr enten med bare friske råvarer, derav 63 % grassurfôr av god kvalitet, eller med samme resept, der det også ble blandet inn 10 % rest av tilsvarende fullfôr produsert en uke tidligere. Fullfôret produsert av friske råvarer hadde en aerob stabilitet på 66 timer, mens fullfôret med innblandet rest var stabilt i bare 9 timer. Tilsetning av 0,2 til 0,3 % av et propionsyreholdig konserveringsmiddel i forbindelse med fullfôrblandingen økte fullfôrets stabilitet med bare 3 timer, uavhengig av om fullfôret var produsert kun av friske råvarer, eller innblandet med 10 % rester. Kung (1998) observerte redusert varmgang, og en liten reduksjon i mengden gjær i fullfôr tilsatt 0,3 % av et konserveringsmiddel basert på salter av propionsyre, eddiksyre, benzoesyre og sitronsyre.

Seppälä *et al.* (2012) undersøkte aerob stabilitet av fuktig og sterkt fortørka surfôr tilsatt ulike biologiske og kjemiske ensileringsmidler, samt av fullfôr produsert med basis i de ulike surfôr kvalitetene. Med unntak av fuktig surfôr tilsatt homofermentative inokulanter, hadde alle surfôr typene god aerob stabilitet, 133 til 336 timer. Likevel hadde fullfôret stabilitet på fra 8 til 141 timer, og bare 4 til 8 timer for fullfôr produsert av fuktig surfôr tilsatt homofermentative inokulanter. Nesten alle fullfôrkvalitetene gikk varme mer enn 10 ganger så raskt som surfôret de var produsert fra (Seppälä *et al.* 2012).

Problemene med varmgang og dårlig hygienisk kvalitet i fullfôr er i tråd med resultatene til Vissers *et al.* (2007b) som påviste mye høyere innhold av klostridiesporer i en blanding av grassurfôr og maissurfôr tatt ut på fôrbrettet enn i prøver av de samme surfôr kvalitetene tatt ut i siloene.

## 9. Kunnskapsmangler - framtidige forskningsoppgaver

---

### 9.1 Dyrehelse

Sjøl om miltbrann (*B.anthraxis*) har størst potensiale for skape alvorlige problemer, er det miltbrannemfysem (*C.chauvoei*) som i dag representerer den største utfordringa når det gjelder storfesjukdom forårsaka av sporedannende bakterier i Norge. Det er betydelige kunnskapsmangler knytta sjukdommens epidemiologi. Dette inkluderer spørsmål rundt sjukdomsutviklinga i det enkelte dyr, utbredelse/forekomst, risikovurderinger og forebyggende tiltak:

- Kan bakterien overføres fra smitta dyr til friske dyr i forbindelse med flytting, kjøp og salg av dyr, og følgelig risikoen for dyrehold i nærheten av utbrudd, akutt og i framtida?
- Hvordan finner sporene veien ut til vevet?
- Hva er forekomsten av *C.chauvoei* i jordsmonn i endemiske og ikke-endemiske områder?
- Finnes bakterien i ikke-sjuka dyr/besetninger, eller er det nivåforskjell i mengde?
- Forekommer *C.chauvoei* i surfôr? Og i strø/talle? Kan i såfall bakterien germinere og vokse i disse miljøene, f.eks. under utfôring og aerob lagring av surfôr og/eller fullfôr?
- Er det sammenheng mellom innhold i feces og inntatt mengde i fôr, slik at prøver av feces kan brukes som indikator? Hvordan er overlevelsen av sporer eller bakterier i kadaver?

Alle disse spørsmålene har betydning, både for risikovurdering og for å kunne gi gode praktiske råd for forebyggende tiltak. Økt kompetanse på disse områdene sammen med metodeutvikling for bl.a. diagnostikk bør derfor prioriteres i framtidige forskningsprosjekter. Ny kunnskap på *C.chauvoei* vil også kunne ha overføringsverdi til andre sjukdommer forårsaka av sporedannende bakterier, f.eks. miltbrann og botulisme.

I videre forskning foreslås samarbeid med Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) som har mye relevant kompetanse på sporedannere gjennom sitt fokus mot bioterror. De har blant annet utviklet gode prosedyrer og metoder for preparering av prøver for isolering og deteksjon av sporedannere (på artsnivå) fra ulike miljø.

### 9.2 Analyser og prøvebehandling

Det er tidligere i rapporten blitt påpekt at gode metoder for analyser og diagnostikk av *C.chauvoei* savnes, og at direkte PCR ikke er egna til kvantitativ bestemmelse av sporeinnholdet i surfôr. Videre metodeutvikling på dette området er viktig for å øke



kunnskapen om epidemiologi og som grunnlag for risikovurdering av *C. chauvoei* spesielt, men også på generelt grunnlag for videre kunnskapsutvikling på sporedannende bakterier.

TINE benytter i dag rør med MRCM-substrat som i utgangspunktet er mindre selektivt enn BBB-substratet som benyttes i forbindelse med 9-rørsmetoden hos Steins/Arla Foods. Det finnes dokumentasjon på hvilke klostridiearter som finnes i rør med BBB-substrat og artene fordeles antallsmessig. Tilsvarende kunnskap for klostridier fra MRCM-rør mangler, men kunne ha bidratt vesentelig til å styrke beslutningsgrunnlaget for valg av framtidige analysemetoder på mjølk hos TINE SA.

Det er også lite/ingen kunnskap om hvor homgen tankmjølka er, og følgelig hvor representativ en enkelt prøve fra mjølketanken er. Videre er det knytta usikkerhet til hvor lenge en mjølkeprøve kan lagres (og under hvilken temperatur) uten at det oppstår bakterievekst.

Når det gjelder analyser av fôrprøver, er det allerede påpekt (Kap. 6.1.2.7) at det er behov for å foreta en nærmere undersøkelse av hvilke medier og metoder som er best egna. Et viktig moment i denne sammenhengen er risikoen for at gassdannende lactobaciller kan forstyrre analyseresultatet ved bruk av MPN-metoder med medium som er lite selektive for *C. tyrobutyricum*. En sammenligning av aktuelle MPN-metoder (ulike substrater og antall rør) med metoden beskrevet av Jonsson (1991) som regnes for å gi svært nøyaktig bestemmelse av *C. tyrobutyricum*, er av stor betydning, både for forskning og rådgivning.

Fôr synes å være den viktigste enkeltfaktoren som påvirker sporeinnholdet i mjølk. Siden sporene fra fôret oppkonsentreres i gjødsel er det også vist at det er en nær sammenheng mellom høgt sporeinnhold i gjødsel og mjølk. Det er etablert MPN-metoder for analyser av gjødsel, noe som i utgangspunktet legger til rette for at gjødselprøver kan brukes som mål på smittepresset. Det er imidlertid lite/mangelfull dokumentasjon på hvordan gjødselprøvene bør tas. Bør prøven tas fra rektum på dyret, og i så fall - fra hvor mange dyr og hvilke? Eller gir prøver av gjødsel fra båser og/eller i gangareal i fjøset samme resultat? Og er det nok med ett prøveuttak, eller bør det gjentas?

### 9.3 Kontaminering og framvekst av sporer i fôr

Høgt innhold av klostridiesporer i (sur)fôr er utpekt som en viktig årsak til høgt innhold av klostridiesporer i mjølk. En rekke faktorer er påpekt å ha betydning for kontaminering av plantene og seinere framvekst av klostrider i surfôret under lagring og utføring. Det er imidlertid fortsatt betydelige kunnskapsmangler. Når det gjelder kontaminering av plantemassen før den kommer i siloen omfatter kunnskapsmangelen blant annet:

- Hva betyr jordart og jordas næringstilstand sammen med fuktighet for risikoen for kontaminering av plantemassen under innhøsting?

- Hvor stor betydning har innblanding av dødt/døende plantemateriale for sporeinnholdet i surfôret?
- Kan det bekreftes at jord under plantebestand med høg andel belgvekster har høgere innhold av sporer enn jord under plantebestand med gras under norske dyrkingsforhold?
- Er kløverrike bestand mer risikoutsatt for kontaminering i forbindelse med spredning av husdyrgjødsel på eng sammenligna med reine grasbestand?

Videre har man per i dag ikke kunnskap om hva slags surfôr som representerer det viktigste problemet med tanke på høge sporetall og risiko for kontaminering av mjølk.

- Er det som før - fuktig surfôr, forurenset med jord og/eller husdyrgjødsel, innlagt i tårnsiloer, i for sakte tempo med manglende syredosering og eventuelt dårlig jamning i siloen?
- Er det løst pressa og dårlig tetta rundballer?
- Eller er det, som på resten av kontinentet, først og fremst surfôr med dårlig aerob stabilitet fra plansiloer?
- I hvilken grad har vi i Norge like store problemer med ujamn, og dårlig komprimering av gras i plansiloer, som er avdekket i andre land?

Det er også betydelig kunnskapsmangel knytta til produksjon og bruk av fullfôr, og hvordan sporer eventuelt oppformerer på veien fra siloen, gjennom fullfôrmikser og fram til fôrbrettet. Herunder kommer mulig "bakteriesmitte" fra gammelt til nytt fullfôr ved dårlig rengjøring av fullfôrmikser og eventuell annen redskap. All litteratur peker på fullfôr som et omfattende hygienisk problem. Undersøkelser av hygienisk kvalitet av norske fullfôrkvaliteter har hittil ikke vært gjennomført.

Litteraturgjennomgangen gir ingen indikasjoner på at AMS gir grunnlag for redusert hygienisk kvalitet på mjølka. Statistikken fra husdyrkontrollen gir derimot indikasjoner på det motsatte. Det vil derfor være av stor interesse å finne ut om det kan være andre årsakssammenhenger enn mjølkeroboten per se som gir opphav til høgere andel leverandører med høge sporetall på AMS-bruk enn på bruk med tradisjonelle mjølkesystemer.

Endelig savnes et «verktøy» som gjør at de ulike faktorene kan sees i sammenheng og vektas etter betydning, både før, under og etter konserveringa til bruk i rådgivinga som forebyggende tiltak. Til dette kan modellering være et aktuelt hjelpemiddel.

## 10. Litteraturliste

---

- Aas Hansen, M. 1990. Kompendium i infeksjonsmedisin hos drøvtyggere, hest og gris. Norges Veterinærhøgskole
- von Adler, A. & Lew, H. 1995. Dynamik der epiphytischen Mikroflora auf Grünlandpflanzen im Zusammenhang mit verschiedenen Düngungsvarianten. Sonderdruck aus Die Bodenkultur, Journal für landwirtschaftliche Forschung, 46. Band, Heft 3, 223-240.
- Agerholm J.S, Krogh H.V., & Jensen H.E. 1995. A retrospective study of bovine abortions associated with *Bacillus licheniformis*. Zentralbl Veterinarmed B, 42(4), 225-34.
- Agerholm J.S, Jensen, N.E, Dantzer, V., Jensen, H.E. & Aarestrup F.M. 1990. Experimental infection of pregnant cows with *Bacillus licheniformis* bacteria. Vet Pathol., 36(3), 191-201.
- Akam, F. D., F. H. Dodd, & Quick, A. J. 1989. Milking, milk production hygiene and udder health. 78. FAO.
- Andersson, J. 1994. Förenklad metodik för påvisande av smörsyrabakteriesporer i leverandörmjolk. SMR Forskning. Bnr. FO 1994-15.
- Andersson, J. & Christiansson, A. 1994. Betalingsystem för sporer. Hur användbara och tillförlitliga är sporanalyserna? Svensk Mjolk Forskning, Rapport nr 4941.
- Andersson, J. & Christiansson, A. 1992. Användning av MPN-metodik för klassning av sporhalter i leverantörmjolk. Mejeriernas FOU-rapport. SMR-MR 101:3/A. Reg nr 4884.
- Bagge, E., Sternberg Lewerin, S. & Johansson, K.E. 2009. Detection and identification by PCR of *Clostridium chauvoei* in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. Acta Veterinaria Scandinavica, 51:8 (<http://www.actavetscand.com/content/51/1/8>)
- Bertilsson, J., Lingvall, P. & Gyllenswärd, M. 1996. Factors affecting the contamination of bulk milk with clostridia spores. Proc. of International Dairy Federation (IDF): Bacteriological quality of raw milk. Wolfpassing, Austria, 13-15 March 1996, 33-35.
- Radostits, C.C., Blood, O.M. & Gay, D. 1994. Veterinary Medicine. A Textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Eight edition, Bailliere Tindall.
- Bonnefoy, J.C., Boudra, H. & Doreau, M. 2009. A decrease in silage distribution frequency: its effect on feed quality. Renc. Rech. Ruminants (3R) 11, 137-140. (her e. Chaucheyras-Durand *et al.* 2012.)
- Borreani, G. & Tabacco, E. 2008a. Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents butyric acid bacteria spore formation in farm corn silage. J. Dairy Sci. 91, 4272-4281.
- Borreani, G. & Tabacco, E. 2008b. New oxygen barrier stretch film enhances quality of alfalfa wrapped silage. Agronomy Journal 100, 942-948.
- Borreani, G. & Tabacco, E. 2010. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. J. Dairy Sci. 93, 2620-2629.
- Borreani, G. & Tabacco, E. 2012. Effect of silo management factors on aerobic stability and extent of spoilage in farm maize silages. Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July, 71-72.

- Bott, T. L., Johnson, J. Foster, E. M. & Sugiyama, H. 1968. Possible origin of the fish incidences of *Clostridium botulinum* type E in an inland bay (Green Bay of Lake Michigan). *Journal of Bacteriology*, 95, 1542.
- Böhnel, H., Schwagerick, B. & Gessler, F. 2001. Visceral botulism--a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, 48(6), 373-83
- Chaucheyras-Durand, F. Sindou, J. & Bonnefoy, J.C. 2012. Effects of TMR distribution twice a week on lactating cows performance: efficacy of a silage additive on TMR stability. *Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July*, 488-489.
- Christiansson, A., Andersson, J., Ekelund, K. Jönsson, L. & Månsson, E. 1992. Två metoder för bestämning av *Bacillus cereus* i leverandörmjolk. *Svensk Mjolk Forsking, Rapport nr 4948*.
- Christiansson, A., Bertilsson, J. & Svensson, B. 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J.Dairy Sci*, 23: 305-314.
- Christiansson, A., Andersson, I., Flodin, J. & Tryggvasson, L. 2007. Utveckling och standardisering av metodik för analys av klostridiesporer i träck. En rapport från Svensk Mjolk Forskning, Rapport nr 7070-P, 25 pp.
- Christiansson, A., Ogura, H., Ekelund, K., Persson, M. & Below, M. 1995. Utveckling av ny, snabbare metodik för analys av klostridiesporer i leverantörmjolk. *Svensk Mjolk Forsking, Rapport nr 4948*.
- Colombardi, G., Allegretti, A., Melani, D. Bettoni, B. & Pecorari, M. 2005. Growth of *Clostridia* spores in soil, food, faeces and milk of dairy farm with different levels of echnology in production area of Permigian-Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 56 (5), 309-344.
- Corrot, G. 1986. Repartition géographique de la contamination butyrique dans les silos. Rapport no. 86013. Istitut Technique de l'Elevage Bovin, Paris, France. (her e. Borreani, G. and Tabacco, E. 2008a)
- Cotto, G. 1983. Sur la zone de l'emmenthal, trop de spores butyriques dans l'ensilage. *Elev. Bovin* 130, 32-36.
- Craig, P.H., Griswold, K.E. & Dinh, S.K. 2009. Six years of corn density evaluations in south central Pennsylvania. *Proc. Int. Silage Conference (ISC), Madison, Wisconsin, July 27-29*, 223-224.
- Dahlenborg, M., Borch, E. & Rådström, P. 2001. Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* Types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Appl Environ Microbiol.*, 67(10), 4781-4788.
- Dahlenborg, M., Borch, E. & Rådström, P. 2003. Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. *Int J Food Microbiol.*, 82(2), 105-110.
- Daniel, P., Opitz von Boberfeld, W., Obermüller, P. Benckise, G. & Ottow, J.C.G., 1993. Einfluss der Gölledüngung auf Mikroflora, Gäreigenschaften, Gärqualität und Futterwert von Deutchem Weidelgras (*Lolium perenne* L.). In: *VDLUFA-schriftenreihe*, ISSN 0173-8712, 465-468.
- Davies, D.R., Merry, R.J., & Bakewell, E.L. 1996. The effect of timing of slurry application on the microflora of grass, and changes occurring during silage fermentation. *Grass and Forage Science*, 51, 42-51.
- Dermeter, K.J. 1967. *Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft*, 4. Aufgabe, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 144-148.
- Dybwad, M., Granum, P.E., Bruheim, P. & Blatny, J.M. 2012. Characterization of airborne bacteria at an underground subway station. *Appl Environ Microbiol.*, 78(6), 1917-29.

- Derman, Y., Lindström, M., Selby, K. & Korkeala, H. 2011. Growth of group II *Clostridium botulinum* strains at extreme temperatures. *Journal of Food Protection*, 74(11), 1797-1804.
- Desvaux, M., & Petitdemange, H. 2002. Sporulation of *Clostridium cellulolyticum* while grown in cellulose-batch and cellulose-fed continuous cultures on a mineral-salt based medium. *Microb Ecol.*, 43(2), 271-9.
- Dodds, K.L. 1989. Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum-packed potatoes. *Appl Environ Microbiol.*, 55(3), 656-660.
- Dolci, P., Tabacco, E., Cocolin, L., & Borreani, G. 2011. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7499-7507.
- Driehuis, F. 2012. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July*, 87-104.
- Driehuis, F. , Elferink, S.J.& Oude, W.H. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The Veterinary Quarterly*, 22, 212-216.
- Driehuis, F. & van Wikselaar, P.G. 2000. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. *J. Sci. Food Agric* 80, 711-718.
- Drouin, P. & Lafrenière, C., 2012. Clostridial Spores in Animal Feeds and Milk. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/39470/InTech-Clostridial\\_spores\\_in\\_animal\\_feeds\\_and\\_milk.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/39470/InTech-Clostridial_spores_in_animal_feeds_and_milk.pdf). Lasta ned desember 2012.
- Ekelund, K. Ogura, H., Ollermark, I., Monthán, A. Christiansson, A. & Svensson, B. 2003. Filtrering av mjölk för analys av *Bacillus cereus*-sporer ogch *Clostridium tyrobutyricum*-sporer. *Svensk Mjölkk Forskning. Rapport nr 7024-1*
- Eklund, M W. ,Peterson, M. E., Poysky, F. T., Peck, L. W. & Conrad J. F. 1982. Botulism in juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in the United States. *Aquaculture* 27, 1-11.
- Eklund, M.W., Poysky F. T., Peterson, M. E., Peck, L. W. & Brunson, W.D. 1984. Type E botulism in salmonids and conditions contributing to outbreaks. *Aquaculture* 41, 293-309
- Ercolani, G.L. 1997. Occurence and persistence of culturable clostridial spores on the leaves of horticultural plants. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 137-140.
- Espelund, M. Fykse, E.M. Aarskaug, T. Skogan, G., Olsen J.S, & Blatny, J.M. 2012. Comparison of sample preparation methods used for real-time PCR analysis NBC conference, Tampere, Finland. *Conference Proceedings*.
- Flodin, J. 2009. Validation of Steins/Arla Foods method for lactate fermenting clostridia in milk. Uppsala Universitet, Medicinska fakulteten, Institutionen för medicinsk biokemi ocn mikrobiologi, Biomedicinska analytikerprogrammet, 14 p.
- Genus *Clostridium*. *Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. Diagnosis and typing*. J. Mainil (Editor). *European Concerted Action QLK2-CT2001-01267*.
- Groseth, P.K., Bjelland, A.M. & Stokstad, M. 2013. *Clostridium chauvoei* påvist med PCR hos friske storfe i Norge. Muntlig innlegg, Husdyrforsøksmøtet, Thon Hotel Lillestrøm Arena 28-29 januar 2013.
- Groseth, P.K, Ersdal, C., Bjelland, A.M. & Stokstad, M. 2011. Large outbreak of blackleg in housed cattle. *Vet Rec.*, 24;169(13),339. doi: 10.1136/vr.d4628. Epub 2011 Sep 2.
- Groseth, P.K., Østerås, O., Tollersrud, T. & Stokstad, M. 2011. Miltbrannsemfysem - ny opptreen av

en gammel sjukdom. NVT 8, 493-501.

Halling, M.A., Rammer, C., Lingvall, P. & Tuveesson, M. 1998. Flytgjødsel till rajgräs/vitklövervall. Fakta Jordbruk 1/1998, SLU Publicationstjänst, Uppsala, Sverige, ISSN 1403-1744, 3 pp.

Hang'ombea, B.M., Isogaib, E., Lungua, J., Mubitaa, C., Nambotac, A., Kirisawad, R., Kimurae, K. & Isogaif H., 2000. Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 23 (4), 277-284.

Haug, I. & Rønningen, O. 2010. Større besetninger og AMS byr på utfordringer når det gjelder melkekvaliteten, *Buskap* 3/2010, 63-64

Hauschild, A. H. W., 1989. *Clostridium botulinum*. In: Doyle, M. P. (ed.), *Food-borne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York. Pp. 111-189.

Heikkilä, T., Saarisalo, E. and Khalili, H. 2012. Effect of different chemical additives on silage quality and aerobic stability. *Proc. Int. Silage Conference (ISC)*, Hämeenlinna, Finland 2-4 July, 388-389.

Heyndrickx, M. 2011. Review Article: The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*, Volume 2011, Article ID 561975, 11 pages. doi:10.1155/2011/561975

Hinderink, K., Lindström, M. & Korkeala, H. 2009. Group I *Clostridium botulinum* strains show significant variation in growth at low and high temperatures. *J Food Prot.* 72(2), 375-83.

Hirsh, D.C.1990. The alimentary canal as a microbial habitat, In: Biberstein, E.L. & Zee, Y.C. (eds), *Review of veterinary microbiology* . Blackwell Publications, 93-97

Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E. & Cutting, S.M. 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol.*, 160(6), 375-9.

Holte, M. 2012. Effekt av ulike ensileringsmidler på kvaliteten av grassurfôr. Masteroppgave ved Inst. for husdyr- og akvaturlurvitenskap, UMB, 71 s.

[http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/IBIZ/FLI\\_Botulismus\\_Informationen\\_20111005en.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/IBIZ/FLI_Botulismus_Informationen_20111005en.pdf).

[http://neulandwirtschaft.agrarheute.com/agrarportal/fleckvieh/inhalt/fleckvieh\\_aktuelles/tierge\\_sundheit/von\\_biogasanlagen\\_geht\\_keine\\_botulismus-gefahr\\_aus.html?redid=466592](http://neulandwirtschaft.agrarheute.com/agrarportal/fleckvieh/inhalt/fleckvieh_aktuelles/tierge_sundheit/von_biogasanlagen_geht_keine_botulismus-gefahr_aus.html?redid=466592)

Huhtanen, P., H. Khalili, J. I. Nousiainen, M. Rinne, S. Jaakkola, T. Heikkila, & J. Nousiainen. 2002. Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 73, 111-130.

Huhtanen, P., J. I. Nousiainen, H. Khalili, S. Jaakkola, & T. Heikkila. 2003. Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analyses of literature data. *Livest. Prod. Sci.* 81(1), 57-73.

Huss, H. H. 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol* 39 (4), 764-769.

Innocente, N. & Biasutti, M. 2013. Automatic milking systems in the protected Designation of Origin Montasio cheese production chain: Effects on milk and cheese quality. *J. Dairy Sci.* 96. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5512>.

Jaakkola, S., Kaunisto, V., & Huhtanen, P. 2006. Volatile fatty acid proportions and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. *Grass and Forage Sci.* 61, 282-292.

Johannsen, A. 1963. *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. *J. Appl. Bacteriol.* 26:43-47.

Johansen, A. & Höglind, M. 2003. Lita handbook I mjølkeproduksjon med skiftebeiting. Elektronisk publikasjon Bioforsk, 42 p.  
[http://www.bioforsk.no/ikbViewer/Content/73191/Bioforsk\\_beitehandbok.pdf](http://www.bioforsk.no/ikbViewer/Content/73191/Bioforsk_beitehandbok.pdf)

Johansen, A. 2006. Sporar i surfôr og mjølk. Foredrag under seminaret «Framtidas surfôr kvalitet» på Kvithamardagane 2006. Plansjeserie.  
<http://grovfor.lr.no/media/ring/5172/Gml%20grovfornett/KVHDGR06-sporer.pdf>.

Johansen, A., Synnes, O.M., & Bakken, A.K. 2010. Hygienisk kvalitet i fortørka surfôr frå breispreidd versus strenglagt gras. *Bioforsk FOKUS* 5 (2), 164-165.

Jonsson, A. 1990. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *Journal of Dairy Science*, 73, 719-725

Jonsson, A. 1991. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. *J. Sci. Food Agric*, 54, 557-568.

Jonsson, A. & Pahlow, G. 1984. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Animal Res Dev* 20, 7-22.

Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyteand, D. & Bobinas C. 2012. Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products. (<http://www.intechopen.com/books/advances-in-applied-biotechnology/fermentation-processes-using-lactic-acid-bacteria-producing-bacteriocins-for-preservation-and-improv>)

Kabir, M., Chotte, J.L., Rahman, M., Bally, R. & Jocteur Monrozier, L. 1994. Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant and Soil*, 163, 243-255.

Kautter, D.A. & Solomon, H.M. 1977. Collaborative study of a method for the detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods. *J Assoc Off Anal Chem.*, 60(3), 541-5.

Kerry, J.B. 1964. A note on the occurrence of *Clostridium chauvoei* in the spleens and livers of normal cattle. *Vet Rec*, 76, 397.

Kirkbride, C.A. 1993. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest.*, 5(1), 64-8.

Klijn, N., Nieuwenhof, F.F., Hoolwerft, J.D., van der Waals, C.B. & Weerkamp, A.H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR-application. *Appl. Environ. Microbiology*, 61 (8), 2919.

Klungel, G.H., Slaghuis, B.A. and Hogeveen, H. 2000. The effect of the introduction of automatic milking systems on milk quality. *J. Dairy Sci.* 83, 1998-2003.

Knicky, M. & Spörndly, R. 2009. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. *J. sci. Food Agric.* 89, 2659-2667.

- Krizsan, S.J. & Randby, Å.T. 2007. The effect of fermentation quality on the voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as sole feed. *J. Animal Sci.* 85, 984-996.
- Krüger, M., Große-Herrenthey, A., Schrödl, W., Gerlach, A. & Rodloff, A. 2012. Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany: prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. *Anaerobe*, 18(2), 221-3.
- Kung, L., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K. & Glancey, J.L. 1998. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81, 1322-1330.
- Kung, L. Jr. 2005. Aerobic stability of silages. Proc. of the Conference on Silage for Dairy Farms. Harrisburg, PA. 2005. <http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/05AerobicStability.pdf>
- Kuske, C.R., Banton, K.L., Adorada, D.L., Stark, P.C., Hill, K.K. & Jackson, P.J. 1998. Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of microbial cells and spores in soil. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (7), 2463-2472.
- Lafreniere, C., 2007. Les ensilages butyriques - Pas dans mon silo. [http://www.agrireseau-qc.ca/agriculturebiologique/documents/Lafreniere\\_Carole.pdf](http://www.agrireseau-qc.ca/agriculturebiologique/documents/Lafreniere_Carole.pdf) (her e. Borreani and Tabacco, 2008a).
- Langó, Z. & Heinonen-Tanski, H. 1995. Occurrence of *clostridium tyrobutyricum* in cattle slurry and fresh forage grasses. *Bioresource technology*, 53 (2), 189-191.
- Laws, J.A. & Pain, B.F. 2000. The potential for improving the utilization of grassland under grazing using alternative slurry spreaders. In: *Grazing in practice* (eds. Rook, AJ & Penning PD). British Grassland Society Occasional Symposium, 34, 239-240.
- Laws, J.A., Smith, K.A., Jackson, D.R., & Pain, B.F. 2002. Effects of slurry application method and timing on grass silage quality. *J.Agric.Sci.*, 139, 371-384.
- Lewerin, S.S., Elvander, M., Westermarck, T., Hartzell, L.N., Norström, A.K., Ehrs, S., Knutsson, R., Englund, S., Andersson, A.C., Granberg, M., Bäckman, S., Wikström, P. & Sandstedt, K. 2010. Antrax outbreak in a Swedish beef cattle herd--1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand.*, 1(52), 7.
- Li, J., Sayeed, S. & McClane, B. A. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (22), 7218-7224, 2007.
- Lilleeng, B. 2010. Er husdyrgjødsel skylda til mye anaerobe sporer i mjølk? RingNytt 2010
- Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Hart, R.A., Dickerson, J.T., Feverherm, A.M., og Aimutis, W.R. 1992. Epiphytic Microflora on Alfalfa and Whole-Plant Corn. *Journal of Dairy Science*, 75 (9), 2484-2493.
- Li, Y. & Nishino, N. 2011. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Letters in Applied Microbiology* 52, 314-321.
- Lindström, M., Myllykoski, J., Sivelä, S. & Korkeala, H. 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Review.Crit Rev Food Sci Nutr.*, 50(4), 281-304.
- Logan, N.A. & De Vos, P. 2009. *Bacillus*. In: (De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.R., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B., eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 3), 2nd edn. New York: Springer, pp. 21-128.



- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2003. Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition. (1991) Pearson Education, Inc. Nordic Committee on Food Analysis Botulinum toxin. Detection in foods, blood and other test materials. Method no. 79, 2<sup>nd</sup> ed. Nordic Committee on Food Analysis, Espoo, Finland.
- Magnusson, M. Christiansson, A. Svensson, B. & Kolstrup, C., 2006. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. J. Dairy Sci. 89, 3866-3875.
- Magnusson, M., Christiansson, A. & Svensson, B., 2007a. Bacillus cereus spores during housing of dairy cows: Factors affecting contamination of raw milk. J. Dairy Sci. 90, 2745-2754.
- Magnusson, M., Svensson, B., Kolstrup, C. & Christiansson, A. 2007b. Bacillus cereus in free-stall bedding. J Dairy Sci.,90(12),5473-82.
- Magnusson, M. 2007. Bacillus cereus in the housing environment of dairy cows. Contamination routes, effect of teat-cleaning, and measures to improve hygiene in the cubicles and alleys. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, 2007:42. ISBN 978-91-576-7341-1.
- Malmquist, O. & Spörndly, R., 1993. Stallgjödsel på slåttervall. Innverkan på djurhälsa och mjölkkvalitet. Aktuell från Lantbruksuniversitetet 417, Husdjur, Uppsala 1993, 26 s.
- Mawhinney, I., Palmer, D., Gessler, F., Cranwell, M., Foyle, L., Otter, A., Payne, J. & Strugnell, B. 2012. Investigation of serology for diagnosis of outbreaks of botulism in cattle. Vet J. 192(3), 382-4.
- McDonald, P., Henderson, A.R. & Heron, S.J.E. 1991. The Biochemistry of Silage. Chalcombe Publications, Marlow, UK. 340 pp.
- Meyer, M. & Tholozan, J.L. 1999. A new growth and in vitro sporulation medium for *Clostridium perfringens*. Lett Appl Microbiol., 28(2), 98-102.
- Müller, 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, 328-338.
- Müller, C.E. & Johansen, A. 201x. Effect of an acid-based additive for grain preservation on conservation and aerobic stability of silage and haylage conserved in laboratory silos. (under publisering).
- Myllykoski, J., Lindström, M., Keto-Timonen, R., Söderholm, H., Jakala, J., Kallio, H., Sukura, A. & Korkeala, H. 2009. Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. Epidemiol Infect., 137(2), 284-93.
- 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.
- Muck, R.E. 2012. Microbiology of ensiling. Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July, 75-86.
- Muck, R.E. and Holmes, B.J. 2000. Factors affecting bunker silo densities. Applied Engineering in Agriculture 16, 613-619.
- Muck, R.E. and Pitt, R.E. 1994. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silage face. Trans ASAE 37, 735-743.
- Nadeau, E., Arnesson, A. og Bengtsson, A. 2010. Investigation of Clostridial spores in Swedish dairy herds. 14th International Symposium on Forage Conservation (ISFC), Brno, March 17-19, p.80-82.

- Nesheim, L. Bakken, I., Jarstad, R., Kval-Engstad, O., Skretting, J., Vagle, A. & Vastveit, K. 2010. Våtsåing av eng- og åkervekstar. Bioforsk Rapport, 5(107), 27 p.
- Nevas, M., Lindström, M., Hörman, A., Keto-Timonen, R. & Korkeala, H. 2006. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environmental Microbiology*, 8 (6), 1085-1094.
- Nicholson, W.L. 2002. Roles of *Bacillus endosporus* in the environment. Review. *Cell Mol Life Sci.*, 59 (3), 410-416.
- NMKL 2009. 5th Ed. *Clostridium perfringens*. Bestemmelse i næringsmidler, fôr og miljøprøver.
- Nordang, L., 1991. Surfôrundersøkelsen 1989-90. FAGINFO Statens fagtjeneste for landbruket Nr. 6, 1991. ISSN 0803-2173, 44 s.
- Oudshoorn, F.W., Kristensen, T., van der Zijpp, A.J., de Boer I.J.M. 2012. Sustainability evaluation of automatic and conventional milking systems on organic dairy farms in Denmark. *Wageningen Journal of Life Sciences* 59, 25- 33.
- Pahlow, G., Muck, R.E. Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E. and Harrison, J.H. (eds) *Silage Science and Technology*, pp. 31-39. Madison, WI, USA: Agronomy Publication No. 42, American Society of Agronomy.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P. & Sarker, M.R. 2011. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.*, 19(2), 85-94.
- Payot, S., Guedon, E., Desvaux, M., Gelhaye, E. & Petitdemange, E. 1999. Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation. *Appl Microbiol Biotechnol.*
- Piggot, P.J. & Hilbert, D.W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. Review. *Curr Opin Microbiol.* 7(6), 579-86.
- Pursiainen, P. & Tuori, M. 2008. Effect of ensiling field bean, field pea and common vetch in different proportions with whole-crop wheat using formic acid or an inoculant on fermentation characteristics. *Grass and Forage Science*, 63, 60-78.
- Rainey, F.A., Hollen, B.J. & Small, A. 2009. *Clostridium*. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.R., Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 3)*, 2nd edition, New York: Springer, 738-828.
- Rammer, C., Lingvall, P. & Salomon, E. 1997. Ensiling of manured crops - Does repeated spreading of slurry increase the hygienic risk? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73 (3), 329-336.
- Randby, Å.T. 1996. Moulding and aerobic stability of roundbale grass silage treated with formic or propionic acid. The XIth International Silage Conference, Wales, UK, pp. 108-109.
- Randby, Å.T. 2002. Effect of acid-based additives on fermentation quality, aerobic stability, and fungal growth in roundbale silage, stored with a tight or perforated plastic cover. *Grassland Science in Europe* 7, 226-227.
- Randby, Å. 2010a. Hvilken effekt har ensileringsmidler? *Buskap* 62 (5), 28-31.
- Randby, Å.T. 2010b. The effect of Na-buffered acid-based additives on wilted roundbale grass silage. *Grassland Science in Europe*, 15, 545-547.

- Rhee K.J., Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D.K. & Knight, K.L. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *Journal of Immunology*, 15; 172(2),1118-1124.
- Rohde, L., Salmon, E. & Rammer, C. 1996. Spreading farm yard manure to ley with different methods. Yield and silage quality. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 26, 43-51.
- Rodhe, L. 2003. Methods for determining the presence of slurry on the crop and in the upper soil layer after application to grassland. *Bioresource Technology*, 90 , 81-88.
- Rodloff, A.C. & Krüger, M. 2012. Chronic Clostridium botulinum infections in farmers. *Anaerobe*, 18(2),226-8.
- Ruppel, K.A., Pitt, R.E., Chase, L.E. & Galton, D.M. 1995. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 78, 141-153.
- Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala H. & Lindstrøm, M. 2012, *Clostridium tyrobutyricum* strains show wide variation in growth at different NaCl, pH and temperature conditions. *J Food Protect* 75, 1791-95.
- Russell, J.B. & Rychlik, J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292(5519), 1119-1122.
- Ryu, C., Lee, K., Yoo, C., Seon, W.K. & Oh, H.B. 2003. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Micobiol Immunol.*, 47, 693-699
- Saarijärvia, K., Virkajärvia, P., Heinonen-Tanskib, H., og Taipalinenc, I. 2004. N and P leaching and microbial contamination from intensively managed pasture and cut sward on sandy soil in Finland. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 104 (3) 621-630
- Sacks, L.E.& Thompson, P.A. 1978. Clear, defined medium for the sporulation of Clostridium perfringens. *Appl Environ Microbiol.*, 35 (2), 405-410.
- Salovu, H., Ronkainen, P., Heino, A., Suokannas, A. and Ryhänen, E. 2005. Introduction of automatic milking system in Finland: effect on milk quality. *Agricultural and Food Science* 14, 346-353.
- Sappälä, A, Heikkilä, T., Mäki, M., and Rinne, M. 2012. The aerobic stability of total mixed ration can be managed by silage additive. *Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July*, p. 416-417.
- Sappälä, A, Heikkilä, T., Miettinen, H., and Rinne, M. 2010. Hygiene is crucial in controlling the heating of total mixed ration. *Grassland Science in Europe*, 15, 560-562.
- Saran, A. 1995. Disinfection in the dairy parlour. *Rev. Sch. tech. off. int. Epiz.* 14(1), 207-224.
- Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Tetsuka, Y., Norimatsu, M. & Tamura, Y. 2000. Rapid and direct detection of clostridium chauvoei by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *J Vet Med Sci.*, 62(12),1275-81.
- Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M. & Tamura, Y. 2000. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Res Vet Sci.*, 69(3):289-94. Erratum in: *Res Vet Sci* 2001, 70(1), 93-4.
- Schei, I., Flittie Anderssen, Å. and Volden, H. 2013. Hygienisk kvalitet i surfôr. *Husdyrforsøksmøtet, Thon Hotel Arena Lillestrøm 28-29 januar 2013.*  
<http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2013/program.pdf>

- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Review. *J Appl Microbiol.*, 101(3),:514-25.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M. & Millard, P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 36 (2007) 147-155
- Slaghuis, B.A., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R. & Andre, G. 1997. Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, 7(4):201-205.
- Smith, L.D. 1975. Common Mesophilic Anaerobes, Including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 Soil Specimens. *Applied Environmental Microbiology*, 29( 5), 590-594
- Spörndly, R., Knicky, M, Pauly, T & Lingvall, P. 2008. Quality and economics of pre-wilted silage made by wide-spreading or by swathing. In: Biodiversity and animal Feed. Future Challenges for Grassland Production (eds: Hopkins, A. *et al.*). EGF 2008, Uppsala, Sweden. *Grassland Science in Europe*, 13,: 645-647.
- Steiner, E., Dago, A.E., Young, D.I., Heap, J.T., Minton, N.P., Hoch, J.A. & Young, M. 2011. Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol.*, 80(3),641-54.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. & Granum, P.E. 2008. Review article. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 (4).
- Stiftelsen Lantbruksforskning, 2008. Slutrapport: Metodik för bedömning av risk för frasbrandsutbrott på besättningsnivå.
- Strong, D.H., Foster, E.F. & Duncan, C.L. 1970. Influence of water activity on the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 19(6), 980-7.
- Spiekers, H., Ostertag, J., Meyer, K., Bauer, J. and Richter, W.I.F. 2009. Managing and controlling silos to avoid losses by reheating of grass silage. Proc. of the XVth International Silage Conference, Madison, Wisconsin 27-29 July, 317-318.
- Spoelstra, S.F. 1983. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. *J. Sci. Food and Agriculture* 34, 145-152.
- Spoelstra, S.F. 1984. Analyse van de gehalten aan sporen van boterzuurbacteriën in praktijkkuilen. Rapport Nr. 172, Lelystad, The Netherlands, Instituut voor Veevoedingsonderzoek, 22 p. (her etter Driehuis 2012).
- Spoelstra, S.F. 1990. Comparison of the content of clostridial spores in wilted grass silage ensiled in either laboratory, pilot-scale or farm silos. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 38, 423-434.
- Stadhouders, J. & Jørgensen, K. 1990. Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 251, 32-36.
- Svensson, B., Ekelund, K., Hiroshi, O. & Christiansson, A. 2001. *Bacillus cereus*-sporer I silomjölk: Variation från dag till dag. *Svensk Mjölk Forskning, Rapport nr 6002, 2001-11-21, 12 p.*
- Svennersten-Sjaunja, K. M. and Pettersson, G. 2008. Pros and cons of automatic milking in Europe. *J. Anim. Sci.* 2008. 86 (Suppl. 1), 37-46.
- Syrjälä, P., Anttila, M., Dillard, K., Fossi, M., Collin, K., Nylund, M. & Autio, T. 2007. Causes of bovine baortion, stillbirth and neonatal death in Finland 1999-2006. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49 (Suppl I), S3, doi:10.1186/1751-0147-49-S1-S3

Tabacco, E., Piano, S., Cavallarin, L., Bernardes, T.F. and Borreani, G. 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1632-1641.

Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A. and Borreani, G. 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94, 5589-5598.

Te Giffel, M.C., Wagendorp, A., Herrewegh, A. and Driehuis, F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 625-630.

Te Giffel, M. C., R. R. Beumer, B. A. Slaghuis, and F. M. Rombouts. 1995. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 125-138.

TINE 2013. TINEs regelverk om bedømmelse og betaling av leverandørmjølke etter kvalitet. Gjeldende pr 1.1.2013.

Tolle, A. 1980. Multiplication of bacteria during farm storage. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 120,4-10.

Torp, M., Holstad, G. & Granum, P.E. 2001. *Bacillus cereus* - for og feces som kilde till høye sporetall i melk i en stofebesetning. (*Bacillus cereus*- feeds and faeces as major contamination sources in milk in a dairy farm). *Norsk veterinær tidsskrift* 113(7), 462-466.

Van Vleet, V. 2007. Muscle and tendon. I: Maxie, M.G., (ed.) *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*. 5th ed. Edinburgh; Saunders, 259-64

von Stetten, F., Mayr, R. & Scherer, S. 1999. Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ Microbiol.*, 1(6),503-15.

Vissers, M.M.M. 2008. Modeling to control spores in raw milk. Thesis Wageningen University, 144 p., ISBN 978-90-8504-673-8

Vissers, M.M.M., Driehuis, F, Te Giffel, M.C. De Jong, P, and Lankveld J.M.G. 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 89,850-858.

Vissers, M.M.M., Driehuis, F, Te Giffel, M.C. De Jong, P, & Lankveld J.M.G. 2007a. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with Aerobic Deterioration. *J. Dairy Sci.* 90, 928-936.

Vissers, M.M.M., Driehuis, F, Te Giffel, M.C. De Jong, P, and Lankveld J.M.G. 2007b. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *J. Dairy Sci.* 90, 3278-3285.

Vissers, M.M.M., te Giffel, M.C., Driehuis, F., De Jong, P. & Lankveld, J.M.G., 2007c. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90 ( 7), 3286-3293.

Voidarou, C., Bezirtzoglou, E., Alexopoulos, A., Plessas, S., Stefanis, C., Papadopoulos, I., Vavias, S., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A. & Skoufos, I. 2011. Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe*, 17 (6), 320-324.

Werner, A. 2003. Hygienisk kvalitet i fullfoder till mjölkkor. Examensarbete 175. Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU, Uppsala, 53 s.

Wilkinson, J.M. 2005. *Silage*. Lincoln, UK: Chalcombe Publications

Wilkinson, J.M. and Davies, D.R. 2013. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. *Grass and Forage Sci.* 68, 1-19.

Wilson, R.B., Boley, M.T. & Corwin, B. 1995. Presumptive botulism in cattle associated with plastic-packaged hay. *J Vet Diagn Invest.*,7(1),167-9.

Wolthusen, E., Weissbach, F. & Derno, M. 1989. Fermentation acid content and aerobic stability of silages. In: Proceedings of an international symposium on production, evaluation and feeding of silage, Rostock, 1989123-132.

Wrigley, D.M., Hanwella, H.D. & Thon, B.L. 1995. Acid exposure enhances sporulation of certain strains of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 1(5), 263-7.

Wong, D.M., Young-Perkins, K.E. & Merson, R.L. 1988. Factors influencing *Clostridium botulinum* spore germination, outgrowth, and toxin formation in acidified media. *Appl Environ Microbiol.*, 54 (6), 1446-1450.

Wyss, U. & Rubenschuh, U. 2012. Efficacy of different silage inoculants on the fermentation quality and aerobic stability of ryegrass ensiled with three different prewilting degrees. Proc. Int. Silage Conference (ISC), Hämeenlinna, Finland 2-4 July, p. 386-387.

Yang, W.W., Crow-Willard, E.N. & Ponce, A. 2009. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *J Appl Microbiol.*,106(1), 27-33.

Östling, C.E. & Lindgren, S.E. 1991. Bacteria in manure and on manured and NPK-fertilised silage crops. *J. Sci Food Agric.*, 55, 579-588

Östling, C. E., & Lindgren, S. E. 1995. Influence of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. *Grass and Forage Sci.* 50, 41-47.