

FORSKNINGSPROGRAM

Förekomst av mögelsvamp i ensilage med hög torrsubstanshalt

SLUTRAPPORT

SLF Projekt nr H0941121

Projektgrupp:

Rolf Spörndly, SLU, inst. för husdjurens utfodring och vård

Cecilia Müller, SLU, inst. för husdjurens utfodring och vård

Dan Funk Jensen, SLU, inst. för skoglig mykologi och patologi

Referensgrupp:

Thomas Pauly, SLU, inst. för husdjurens utfodring och vård

Padraig O'Kiely, Teagasc, Grange Research Center, Dunsany, Co Meath, Ireland

Hans Lindberg, Svenska Husdjur

Bakgrund

Vid ensilering av vallfoder har det i många sammanhang poängterats fördelen med att förtorka grödan till höga torrsubstanshalter. Det blir allt vanligare i takt med användning av rund- och fyrkantsbalar istället för plan- eller tornsilo. En torrare gröda ger högre volymvikt, lägre plastförbrukning och lägre transport- och lagringskostnader. Även behovet av tillsatsmedel minskar. En bättre konservering av grödans proteinfraktion är också en positiv faktor av ensilering vid högre ts-halt.

Mögelsvamp i ensilage med ts-halter mellan ca 50 och 70 % utgör emellertid ofta ett problem som kan medföra hälsorisker för både djur och djurskötare vid utfodring. Området är inte tillfredsställande undersökt och en av anledningarna är problematiken med provtagning och analysmetodik. Institutionen för husdjurens utfodring och vård har långvarig erfarenhet av ensilering av vallfoder. Man har främst arbetat med ensilering inom ts-området 20-50 % ts och har här utvecklat tekniker för ensileringsstudier med tillhörande kemiska och mikrobiologiska analysmetoder. Institutionen för skoglig mykologi och patologi har stor kompetens i molekylära metoder såsom PCR för artbestämning av svamp i biologiskt material som lantbruksgrödor och mark. Tillsammans har dessa två institutioner initierat ett 4-årigt doktorandprojekt med avsikt att utveckla analysmetoder för mögelbestämning i ensilage med ts-halter i området 50-70 %.

En huvuduppgift i projektet är att utveckla applikationer av befintlig avancerad analysmetodik för att finna en lämplig rutinmässig metod för att bestämma den mykologiska sammansättningen, kvalitativt och kvantitativt. Avsikten är således att beskriva svampfloran både med klassisk morfologisk artbestämning och på samma prov genomföra den snabbare och billigare PCR-metoden.

SLF-projektet som redovisas i denna rapport omfattar en del av det gemensamma doktorandprojektet som kommer att avslutas andra halvåret 2013. I denna slutrapport redovisas arbetet som bestod i att samla in prov från hela Sverige för att kartlägga vilka mögelarter som är dominerande i denna typ av starkt förtorkat ensilage. I projektet samlades

även detaljerade uppgifter in för att undersöka samband mellan mögelförekomst och förhållanden för vallfoderproduktionen, konserveringen och hanteringen av ensilaget. Lönekostnaderna för doktoranden finansierades från annat håll så innevarande SLF-projekt avsåg endast analyskostnader och kostnader för provinsamling. Övriga svårigheter uppstod emellertid när det gäller den morfologiska karaktäriseringen av mögelarter. Detta krävde mycket större resurser än planerat när det gäller antal analyser i form av odling på agarplattor. Dessutom bedömdes det viktigt att låta doktoranden genomgå en kurs utomlands samt under 4 månader hyra in extern kompetens. Agr. Dr. Martin O'Brien, som utfört liknande studier i Irland, engagerades för detta arbete. Detta ledde till avsevärt ökade kostnader för projektet som emellertid fick finansieras med egna medel.

Material och Metoder

Hundra platser där balensilage med hög ts-halt producerats identifierades och 50 olika platser per år besöktes, båda åren spridda från södra till norra Sverige. Besöken började i södra Sverige, i april år 1 och i februari år 2 och slutade i norra Sverige, i juni år 1 och i april år 2. I figur 1 är de besökta platserna år 1 markerade och distributionen var ungefär lika år 2.



Första året provtogs tre slumpvis utvalda balar från samma parti per gård med 8 borrhärnor (Ø 40 mm) per bal. På en av balarna per gård utfördes täthetsmätning där antalet sekunder balen kunde motstå ett undertryck av 150 mm Hg mättes (Spörndly m.fl, 2008). Antalet lager film, grad av överlappning samt filmens bredd mättes. Efter öppningen av balen gjordes en okulär bedömning av utbredningen av synligt mögel och prov togs från synliga mögelkolonier och överfördes sterilt till ett provrör. Därefter togs borrhörprov och de åtta borrhörorna blandades och därifrån användes 500 gram för kemisk analys och 150 g för odling av mögel. Prover för kemisk analys lagrades vid -20°C och prover för odling av mögel lagrades vid 4°C upp till 24 timmar. Härmed erhöles 50 prover för kemisk analys (ett prov per gård) och 150 prover för odling av mögel (ett prov per bal) år 1. År 2 upprepades samma provtagningsförfarande men proven från de tre balarna sammanslogs och härmed erhöles 50 prover för både kemisk analys och odling av mögel år 2.

Figur 1. Provtagningsplatsernas fördelning år 1.

Proverna för kemisk analys torkades i 55°C i 18 timmar och maldes därefter på 1mm såll. Torrsubstanshalten bestämdes efter 103°C i 20 timmar och askhalten efter 3 timmar i 550 °C. Den organiska substansens smältbarhet bestämdes med VOS-metoden efter Lindgren (1979, korr. 1983). Råproteinhalten bestämdes med Kjeldahlmetoden enligt Bremner och Breitenbeck, 1983 och vattenlösliga kolhydrater (WSC) enligt Larsson och Bengtsson (1983). Fiberhalten (NDF) bestämdes enligt Chai och Udén (1998). En vätskefas erhöles genom att blanda ett otorkat prov med destillerat vatten (1:1), frysa det och pressa det efter att det tinats. I vätskefasen mättes pH med glaselektrod, ammonium-N med Kjeltec Auto System 1020 (Foss, Höganäs, Sweden) och mjölksyra, propionsyra, ättiksyra, bärnstenssyra, etanol och 2,3-butandiol med HPLC enligt Andersson och Hedlund (1983).

Odling av mögel skedde på tre sätt. Odling för bestämning av totalantalet mögel (CFU) och dominerande arter med ursprung i borrhörprovet (1), odling för bestämning av dominerande arter genom direktutlägg av material från borrhörprovet (2), och odling för bestämning av art av på balens yta synliga mögelkolonier (3). För (1) vägdes 50 gram prov in och blandades med 450

ml steril Ringerlösning av fjärdedels styrka (Merck, KgaA, Darmstadt, Tyskland) med 0.5 ml/l Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) i 30 minuter och behandlades därefter i en Stomacher (Seward 3500, Worthing, West Sussex, United Kingdom) i 2 ggr 60 sekunder. Lösningen späddes i steg om 10^{-2} till 10^{-5} och 100 µl av varje spädning sattes på agarplattor med substraten MEA (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) och DG18 (DG18, 22.05 g L-1 (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany); glycerol, 154 g L-1 (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany)). Plattorna inkuberades dels vid 25°C och dels vid 37°C i tio dagar varefter antalet jästkolonier räknades efter 2 dagar och antalet mögelkolonier räknades efter 5 dagar för respektive medium och temperatur. För (2), direktutlägg från borrhingsproverna, utfördes odlingen också på MEA och DG18 vid 25 C och vid 37°C i tio dagar. För (3), bestämning av art av synligt mögel på balarna, odlades på MEA vid 25°C i sju dagar. Plattor med utväxta mögelkolonier användes för ytterligare analyser. Från varje gård omympades upp till tre mögelisolat som delade makroskopiska kännetecken (färg, sporer, mycel och mediumbuckling) och användes till identifiering. De båda odlingssubstraten och temperaturerna hanterades separat. Omympade mögelkolonier odlades på MEA vid 25°C i sju dagar och lagrades därefter vid 4°C.

Vid arbetet med den morfologiska bestämningen av isolat från proverna anlätades extern kompetens under ett halvårs tid då Agr. Dr. Martin O'Brien från Teagasc, Irland, var engagerad i projektet.

Karaktärisering av mögel

Genera för de omympade mögelkolonierna bestämdes enligt Samson *et al.* (2010). Karaktärisering av släktet *Aspergillus* utfördes med hjälp av macro- och mikrostruktur enligt Klich (2002), och karaktärisering av släktet *Penicillium* enligt Pitt (2000). Identifieringen som skedde enligt mögelkoloniernas makro- och mikrostruktur konfirmerades därefter med molekylärbioologisk karaktärisering enligt följande: Små delar av mögelkolonierna från omympningarna användes för DNA-extrahering enligt Stewart and Via (1993). Det extraherade DNA:t användes till PCR där sekvensamplifieringen utfördes i en total volym av 50 µl innehållande de slutgiltiga koncentrationerna av 50 ng templat DNA, 137.5 mM MgCl₂, 2 mM av varje deoxynukleosidtrifosfat, 10 µM av två primers och 1.25 U av DreamTaq[™] DNA polymeras (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) med inkluderade reaktionsbuffer. Alla reagenter mixades och värmdes enligt följande: 94°C i 5 min, 35 cykler av amplifiering (94°C i 30 sekunder, 55°C i 30 sekunder och 72°C i 30 sekunder) följt av 72°C i 7 minuter.

Mögelisolat från släktet *Fusarium* amplifierades i EF-1α regionen enligt O'Donnell *et al.* (1998). Mögelisolat från släktena *Aspergillus* och *Penicillium* amplifierades i β-tubulin regionen enligt Glass and Donaldson (1995). Okända mögelisolat amplifierades i ITS-regionen enligt Gardes och Bruns (1993) och White *et al.* (1990). Mögelamplikon sekvenserades åt båda hållen och de resulterande två sekvenserna komponerades tillsammans i SeqMan 8.1.2 (DNASar Lasergene, Madison, Wisconsin, USA). GenBank databas, NCBI's hemsida, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, användes för att jämföra mögelisolatsekvenserna med hjälp av BLASTN algoritm (Altschul *et al.*, 1997).

Bearbetning av resultaten

Foderproducenten tillfrågades i samband med besöket för provtagning hur balarna producerats efter en enkät med frågor om hur balarna lagrats, hanterats, ingående gröda och skördeförhållanden (tabell 1).

Tabell 1. Enkätfrågor om produktionen av balarna, noterade i samband med provtagningen

1. För eget bruk/entreprenad	11. Luckor i vallen	21. Tid mellan pressning och plastning
2. Baltyp	12. Gammal förna	22. Ensileringsmedel
3. Skördenummer	13. Körskador, viltskador	23. Antal lager sträckfilm
4. Datum för slåtter	14. Vallen föregående år	24. Färg på film
5. Väderlek vid skörd	15. Slåttermaskin/kross	25. Bredd på film
6. Vallålder	16. Strängläggning eller bredspridning	26. Lagring av balar, stapling
7. Gödsling	17. Stubbhöjd	27. Lagring av balar, underlag
8. Bekämpning	18. Förtorkningstid	28. Lagring av balar, fågelnet
9. Botanisk sammansättning	19. Strängluftning	29. Flyttning av balar under lagringstid
10. Ogräs	20. Presstyp	30. Djurslag som fodret är ämnat för

Totalantalet mögel uttryckt som $_{10}\log$ redovisas för varje odlingsmedium och temperatur och statistiska analyser av korrelationer mellan kemisk sammansättning och mögelförekomst samt de i enkäten registrerade produktionsmetoderna görs med statistikpaketet SAS 9.3 och användandet av Pearson's korrelationskoefficient, stegvis regressionsanalys samt mixed modell.

En jämförelse i syfte att studera om klassisk mikrobiologisk odling kan ersättas av molekylärbioanalytisk analysmetodik med 454-sekvensering för påvisande av den mykologiska florans i ensilageproven kommer också att göras i det kompletta doktorandprojektet, men redovisas inte i denna rapport då den inte omfattas av detta projekt.

Resultat

Produktion av balar samt ensilagens sammansättning

Den genomsnittliga ts-halten var 62 % båda åren. Även den övriga sammansättningen var mycket lik mellan de två åren undersökningen pågick (tabell 2).

Tabell 2. Kemisk sammansättning. Medeltal, standardavvikelse samt minsta och högsta värde.

Variable	Label	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
TS	TS	99	62.4098565	15.4289121	27.8658341	88.4393646
a	a	99	7.0097198	1.7247618	3.6959917	13.1844763
rp	rp	99	10.4059850	3.4636024	5.4735740	27.0603790
NDF	NDF	99	55.8178135	6.1126068	39.9863415	67.2287926
VOS	VOS	99	78.2034343	6.0325468	66.1500000	92.1400000
ME	ME	99	9.8541351	0.8532691	8.0217818	11.6416657
pH	pH	99	5.2985859	0.4281951	4.2200000	6.1100000
AmN	AmN	99	0.0390460	0.0292177	0.0059500	0.1906864
Atal	Atal	99	4.2283725	3.1323919	0.5647258	16.3792006
Lac	Lac	99	1.3661761	1.6010316	0.1820000	7.4462631
Acet	Acet	99	0.3756314	0.4745144	0.0300000	3.3150000
Prop	Prop	99	0.1201644	0.1364441	0.0200000	0.8566163
But	But	99	0.0441051	0.0779300	0.0200000	0.7776987
Form	Form	99	0.0496526	0.0423147	0.0200000	0.2801742
Etanol	Etanol	99	0.6850221	0.6273622	0.0200000	4.1860000
Butandiol	Butandiol	99	0.1127300	0.2508288	0.0200000	1.3440145

Av de besökta gårdarna producerade 70 % rundbalar av normalstorlek och 10 % fyrkantsbalar av normalstorlek. Fyrkantsbalar av mindre storlek producerades vid 10 % av gårdarna medan

dubbla fyrkantsbalar och små rundbalar producerades vid 4 % av gårdarna var. 94 % producerade fodret för egen förbrukning medan 6 % producerade på entreprenad. 74 % av ensilaget utgjordes av 1:a skörd, 21 % av 2:a skörd, 4 % av 3:e skörd och 1 % av 4:e skörd. 41 % kan betraktas som skördat i ett tidigt utvecklingsstadium av 1:a eller 2:a skörd, 55 % av medelsen första eller andraskörd och endast 4 % kan betraktas som en sen 1:a skörd. En överväldigande majoritet, 97 %, använde inget tillsatsmedel. 73 % tillämpade strängläggning efter slätterkrossen medan 27 % bredspredde grönmassan. 46 % vände strängen under förtorkningen medan 54 % lät strängen ligga orörd. En kombinerad press och inplastare användes av 50 %. Som tidigare nämnts pressades ca 75 % till rundbalar, främst av normalstorlek medan ca 25 % utgjordes av olika typer av fyrkantsbalar. Huruvida pressen var av flex- eller fixkammartyp var oklar i enkätsvaren. 86 % uppgav att tiden mellan pressning och inplastning varit högst en timme. Vit färg på plasten användes till 94 %, svart till 2 % och ljusgrön till 4 %. Hur många lager plastfilm man tillämpade var en uppgift som både besvarades i enkäten och som kunde kontrolleras när balen öppnades. En majoritet, 56 %, tillämpade 8 lager och överensstämmelsen mellan uppgivet och kontrollerat antal lager var mycket god (tabell 3).

Tabell 3. Antal lager plastfilm, uppgivet i enkätsvar respektive analyserat vid öppnandet av balar.

	6 lager	8 lager	10 lager	12 lager	14 lager	16 lager	18 lager
Uppgivet	17 %	57 %	10 %	12 %	1 %	0 %	3 %
Analyserat	16 %	56 %	10 %	10 %	4 %	2 %	1 %

Plastbredden på balarna uppmättes till 134 cm i genomsnitt och överlappningen uppmättes till 60 cm vilket ger ca 45 % överlappning. Medeltalen inkluderar både stora och små balar. Tätheten uppmättes till 196 sekunder i medeltal med en variation från 0 till 770 sekunder.

Underlaget där balarna lagrades utgjordes till 53 % av gräsmark varav 17 % var på fältet. 33 % lagrades på sand eller grusplan medan resterande balar lagrades på mer iordningställda underlag som hårdgjorda ytor eller pallar. Endast 15 % täckte lagret med fågelnät. Fodret var avsett för endast häst till 41 % och till bara nötkreatur till 33 % och till bara får till 4 % medan resterande 22 % var avsett för flera av dessa djurslag.

Mögelförekomst

Av det totalt 100 gårdar som besöktes kunde insamlade data användas från 99. På 48 % av dessa gårdar observerades synligt mögel på den bal som öppnades. Hälften av dessa hade endast en eller två mögelkolonier medan hälften hade mellan tre och 14 kolonier. På 52 % av gårdarna påträffades inget synligt mögel.

Borrade prover från de 99 balarna som inspekterats för synligt mögel visade på mögel i 53 % av balarna. Men samstämmigheten mellan att mögel observerats på ytan och att mögel påträffats i de borrade proven i samma bal var låg. Det förekom både höga mögelhalter i borrhovet av balar som inte hade synligt mögel respektive ingen förekomst av mögel i borrhovet från balar som hade synligt mögel på ytan (man borrade avsiktligt inte genom de kolonier som syntes på ytan). Korrelationen (r) mellan påträffat mögel på ytan och i de borrade proven var endast 0,18 och knappt signifikant ($p < 0,07$). De balar med allra största antalet synliga kolonier på ytan hade emellertid ett något bättre samband med borrhov med de högsta halterna totalmögelt ($r = 0,28$, $P < 0,005$).

Vid kartläggningen av mögelarter användes alla 197 borrhov samlats in. Det utgjordes av tre olika balar från var och en av de 49 gårdarna det första året och samlingsprovet från tre balar

per gård det andra året. Med hjälp av morfologisk undersökning och verifikation med PCR kunde 26 olika mögel identifieras (Figur 2). Vanligast förekommande var *Penicillium roqueforti* följt av *Arthriniium spp.* Som tredje vanligaste mögelart fann vi *Aspergillus fumigatus*. Av de 20 balar med *Aspergillus spp.* utgjordes tre av *A. flavus*, 14 av *A. fumigatus* och tre av *A. niger*. Andra arter som fanns på mer än någon enstaka bal var av släktena *Eurotium* och *Mucor*.

Samband mellan mögel och kemisk sammansättning, täthet och annan data om balen

Totalantalet mögel bestämt med de fyra olika kombinationerna MEA 25°, MEA 37°, DG18 25° och DG18 37° var olika framgångsrika beroende på vilken mögelart som dominerade. I följande analys har den kombination som gett högst värde för totalantal CFU mögel använts. Produktionsplats, produktionsmetoder av balarna samt de kemiska variabler som uppvisade en signifikant korrelation med totalantalet mögel redovisas i tabell 4. Mer mögel förekom i norra och östra Sverige. Skörd, dvs om ensilage skördades i första, andra tredje eller fjärde skörden var positivt korrelerat med mögelantalet, d.v.s. fler CFU mögel ju högre skördenumret var. Om gräset lades i sträng istället för att bredspridas efter slåtterkrossen ökade antalet CFU. En tät bal, som kunde hålla ett skapat undertryck längre än 10 sekunder var negativt korrelerad till antalet CFU. Av de kemiska variablerna var det endast halten etanol och 2,3-butandiol som var till viss mån var signifikant korrelerade till totalantalet mögel. Båda var negativt korrelerade, d.v.s. ju mer etanol eller 2,3-butandiol desto mindre antal CFU.

Vid en stegvis regressionsanalys med samtliga variabler i enkäten föll tre variabler ut som signifikanta. Det var skörd, bredspridning och täthet. Dessa variabler inkluderades därför som klassvariabler i en variationsanalys med proceduren MIXED i SAS (2010) tillsammans med de kontinuerliga kemiska variablerna som övriga oberoende variabler. I tabell 5 redovisas medeltalen som minsta kvadratmedeltal av de klassvariabler som har ett signifikant samband med halten av totala CFU mögel. I tabell 6 visas dessa variabler tillsammans med de kemiska variabler som var signifikanta i modellen.

Tabell 4. Signifikanta självständiga korrelationer funna mellan total CFU mögel och kemiska variabler samt variabler från enkäten. Pearsons korrelationskoefficient och signifikansnivå.

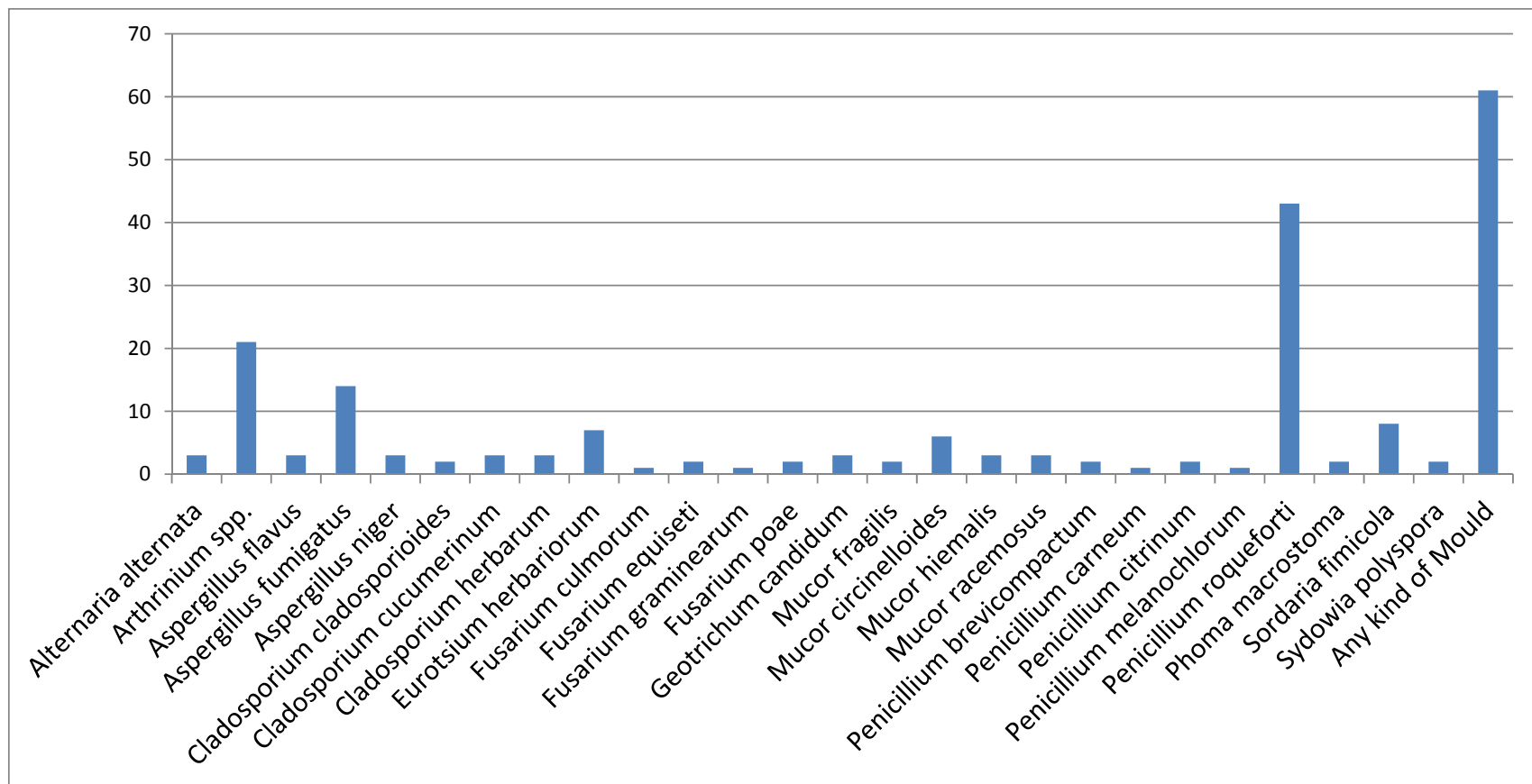
Latitud, nordlig	Longitud, ostlig	Skörd,	Stränglagt/ Bredspridet	Täthet	Etanol	2,3-Butandiol
+0,19	+0,27	+0,22	+0,31	-0,31	-0,18	-0,21
p<0,056	p<0,008	p<0,03	p<0,02	p<0,002	p<0,082	p<0,036

Tabell 5. Signifikanta effekter på mögel. Minsta kvadratmedeltal av log CFU

	Mögel 10log		Mögel 10log		Mögel 10log
Skörd 1	1,9	Bredspridet	3,2	Täthet <10 sek	4,6
Skörd 2	2,9	Stränglagt	4,8	Täthet >10 sek	3,7
Skörd 3	3,3				
Skörd 4	8,1				
Sign.	p<0,039		p<0,002		p<0,089

Tabell 6. Signifikanta effekter av både klassvariabler och kontinuerliga variabler i modellen (MIXED procedure, SAS, 2010)

Skörd	Bredspritt	Råprot	Am-N	A-tal	Ättiksyra	Smörsyra	Etanol
p<0,039	p<0,002	p<0,001	p<0,012	p<0,013	p<0,007	p<0,014	P<0,068



Figur 2 Mögelarter funna i 197 borrhov i förtorkade balar från 99 gårdar i Sverige under 2010 och 2011. Frekvensen utgör antalet balar där respektive mögel identifierats.

Diskussion

Data baserade på enkätsvar ger ofta en känsla av osäkerhet. Det var därför glädjande att samstämmigheten var så god mellan den av enkätuppgifterna som kunde kontrolleras genom analys. Att uppgiften om antal lager plastfilm stämde så väl med det verkliga utfallet stärker förtroendet för övriga uppgifter i enkäten. Det stärker därmed även förtroendet över det för oss förvånande utfallet att endast två av alla uppgifter om produktionen hade en signifikant korrelation med mögelförekomsten; när på året skörden togs (skördenummer) och ifall det slagna gräset legat i sträng eller bredspridits under förtorkningen. Iakttagelsen stämmer med tidigare studier där mögelförekomsten ökar i takt med tiden grödan står på fältet (Kroulik *et.al.*, 1955; Pahlow, 1991; Müller, 2009; Schenck och Müller, 2010) även om det i de två senare fallen varit fråga om att samma skörd stått kvar en längre tid på fältet innan skörd. Anledningen till att strängläggning gav en högre mögelhalt än bredspridning kan också ha en förklaring i att bredspridning ger en snabbare upptorkning efter skörd och att det slagna fräset ligger kvar på fältet kortare tid.

Penicillium roqueforti är en välkänd mögelart och den vanligaste förekommande mögelarten i ensilage. Både Martin O'Briens (O'Brien m.fl., 2008) kartläggning av mögel i ensilagebalar på Irland och Ida Skaars (Skaar, 1996) kartläggning av mögel i ensilagebalar i Norge visade att *P. roqueforti* var den vanligast förekommande mögelarten. Att detta skulle vara fallet även på dessa förhållandevis torra balar var inte självklart. I de irländska och norska studierna var ts-halten i fodret närmare 25 % och det har påvisats att ts-halten kan inverka på mängden mögel i foder (O'Brien m.fl., 2008). I denna studie var den genomsnittliga ts-halten 62 % med en variation mellan 27-88 % (min-max). Denna studie visar således att *P. roqueforti* är vanligast även i torrare ensilage. Korrelationen mellan ts-halten och antalet *P. roqueforti* var -0,14 ($p=0,0523$) vilket kan tyda på att torrare ensilage är hämmande för *P. roqueforti*. *P. roqueforti* kan producera mögelgifterna roquefortin och PR toxin och är därför av intresse ur djurhälsosynpunkt.

Mögel av släktet *Arthrimum spp.* var de näst mest förekommande i denna studie. *Arthrimum* är inte känd för att vara vare sig allergen eller toxinbildande.

Mest uppseendeväckande är att vi fann 20 balar med *Aspergillus spp.* Tre med *A. flavus*, 14 med *A. fumigatus* och tre med *A. niger*. *Aspergillus* är känd för att vara allergen och även cancerframkallande genom toxiner som aflatoxin (*A. flavus*) samt gliotoxin och fumigaclaviner (*A. fumigatus*). Speciellt allvarligt är den relativt höga förekomsten av *A. fumigatus* som, förutom att den kan skapa toxin i fodret, avger sporer som via luftvägarna kan invadera lungorna hos både djur och människor. *A. fumigatus* uppvisar inte någon korrelation alls med ts-halten i ensilaget.

Fynden av *Fusarium culmorum* och *Fusarium gramineum* var få. De kan bilda toxinerna zearalenon och deoxinivalenol bland annat, och normalt betraktas de som fältflora. De återfinns ofta i majs och spannmål som står länge på fältet innan skörd. Fynden skedde följdriktigt också på balar som skördats medelsent till mycket sent och vid mycket hög ts-halt, 85 %.

Det fanns en positiv korrelation mellan ostlig breddgrad och ökat antal CFU mögel och även en tendens till mer mögel ju längre norrut balarna producerats. Det gällde den totala mögelförekomsten och inget samband alls kunde ses mellan den geografiska placeringen och de individuella mögelarterna *P. roqueforti*, *Arthrimum* och *A. fumigatus*.

Publikationer

Schenck, J., Spörndly, R., Müller, C., Djurle, A. and Funck Jensen, D. 2010. Molecular methods for detection of fungi in silage. Proceedings of the 1st Nordic Feed Science Conference. Report 274. Dep. Animal Nutr. Management. Swedish Univ. Agric. Sci. <http://publikationer.slu.se/Filer/ProceedingsSchencketalNFSC2010.pdf>

Schenck J. and Müller, C., 2010. Harvest dates affect fungal counts and fungal composition of baled haylage. In: Grass in a changing World. Grass Science in Europe, 2010, vol 15. pp 416-418 http://www.europeangrassland.org/fileadmin/media/EGF2010_GSE_voll15.pdf

Müller, C.E. 2012. Undersökning av svampflora och mykotoxiner i inplastat vallfoder för hästar. Svenska Vallbrev nr 1/2012. Sid. 1-2.

Schenck J., Müller, C. and Spörndly, R., 2012. Composition of fungi in wrapped forages of high dry matter content in Sweden and Norway. Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland, 2-4 July. pp 334-334. https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/artturi_web_service/xvi_international_silage_conference/ISC2012_Proceedings_5July2012.pdf

Övrig resultatförmedling till näringen

SLU:s hemsida : <http://www.slu.se/sv/fakulteter/nl/om-fakulteten/institutioner/institutionen-for-skoglig-mykologi-och-patologi/kontakt/personliga-hemsidor/jessica-schenck/>

Kursavsnitt i Jordbruksverkets kurs Företagsutveckling och Djurens välfärd för husdjursrådgivare, kontaktpersoner och djurskyddschefer vid länsstyrelserna. Uppsala 11-13 september 2012.

Lunchföredrag om mögel i grovfoder för medlemmar i föreningen Ultuna hästens vänner. Uppsala 28 februari 2012.

Kursavsnitt om foderkonservering och djurhälsa i kursen djurhälsa för husdjursagronomstudenter. Uppsala 23 april 2012.

Kursavsnitt om fodersäkerhet i kursen Infektionssjukdomar för veterinärstudenter årskurs 4 och uppåt. Uppsala 21 maj 2012.

Lunchföredrag om mögel och mykotoxiner i inplastad vallfoder i Sverige och Norge för anställda vid SLU och SVA. Uppsala 6 februari 2013.

Under 2013 kommer Jessica Schencks doktorsarbete att presenteras i vilket detta projekt varit en del. I samband med detta kommer tre referee-granskade artiklar att publiceras samt därtill hörande resultatförmedling.

Litteratur

Andersson, R. & Hedlund, B. 1983. HPLC analysis of organic acid in lactic acid fermented vegetables. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 176. 440-443.

- Altschul, S.F, Madden, T.L, Schäffer, A.A, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402
- Bremner. J.M. & Breitenbeck. G.A., 1983. A simple method for determining ammonium in semi-micro Kjeldahl analysis of soil and plant materials using block digester. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 14. 905-913.
- Chai. W, Uden. P., 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology* 74: 281-288
- Schenck J. and Müller, C., 2010. Harvest dates affect fungal counts and fungal composition of baled haylage. In: *Grass in a changing World. Grass Science in Europe, 2010*, vol 15. pp 416-418
- Gardes M, Bruns TD., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118
- Glass N.L. and Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- Klich M.A., 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands
- Kroulik J.T., Burkey, L.A., Wiseman, H.G. 1955. The microbial populations of the green plant and of the cut forage prior to ensiling. *Journal of Dairy Science* 38, 256-262.
- Larsson. K.. Bengtsson. S., 1983. Bestämning av lätt tillgängliga kolhydrater i växtmaterial. Metodbeskrivning no. 22. Statens lantbrukskemiska laboratorium. Uppsala
- 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.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P.D. and Fuller, H.T., 2008. Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: predominant mould and yeast species and features of bales and silage. *Grass and Forage Science*, 63, 121–137
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E. and Ploetz R.C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044-2049..
- Pahlow, G. 1991. Role of microflora in forage conservation. In: Pahlow, G. and Honig H. (Eds.) *Forage conservation towards 2000*, pp.26-36. Braunschweig, Germany: Landbauforschung Völkenrode.
- Pitt J.I., 2000. *A laboratory guide to common Penicillium species*. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane, U, Frisvad JC, Andersen B., 2010. *Food and Airborne Fungi*. [CBS Laboratory Manual Series no. 2.] Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- SAS 9.3, 2010. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Skaar, I., 1996. Mycological survey and characterisation of the mycobiota of big bale grass silage in Norway, PhD thesis. Norwegian College of Veterinary Medicine, Norway.
- Spöndly R., Nylund R., Hörndahl T., Algerbo P-A., 2008. Handling round bale silage after stretch-film application *Grassland Science in Europe*, volume 13 vol 13 681-683
- Stewart C.N. and Via L.E., 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14: 748-749
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. New York: Academic Press.