

Att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder för hästar



Mikaela Würtz

Att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder för hästar

Evaluating hygienic quality in roughages for horses

Mikaela Würtz

Handledare: Cecilia Müller, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Examinator: Thomas Pauly, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Omfattning: 15 hp
Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap
Kurskod: EX0553
Program: Agronomprogrammet - Husdjur
Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2017
Serienamn, delnr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 607

Omslagsbild: Mikaela Würtz

Nyckelord: bakterier, jäst, LPS, mykotoxiner, mögel
Key words: bacteria, LPS, mould, mycotoxins, yeast

Sammanfattning

Denna litteraturstudie behandlar ett urval av metoder för att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder för hästar. Mikrobiella och makroskopiska undersökningar tas upp såväl som hur innehållet av mykotoxiner och lipopolysackarider (LPS) i grovfoder kan analyseras. Litteraturstudien belyser främst de mikroorganismer som vanligen förekommer och analyseras i grovfoder vilka är mögelsvampar, jästsvampar och bakterier. Fälttorkat hö har undersökts och visat sig ha en större risk för mögeltillväxt jämfört med skulttorkat hö. Grovfoder har även undersökts makroskopiskt och mikrobiellt och då dessa två metoders resultat jämfördes visade det sig att de inte alltid överensstämde. Innehållet av deoxynivalenol (DON) och LPS undersöktes även i grovfoder med enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) respektive limulus amöbocyt lysat (LAL)-test. I studien kompletterades ELISA-testet med vätskekromatografi-tandem-masspektrometri (LC-MS/MS)-analys och resultaten överensstämde inte alltid mellan de båda analysmetoderna. Då innehållet av mikroorganismer, LPS och mykotoxiner undersöktes i halm och hö visade det sig att halmen generellt var av sämre hygienisk kvalitet än det hö som undersöktes. I en annan studie har även den mikrobiella kompositionen undersökts före och efter konservering i hösilage som skördats vid olika tidpunkter. Hösilage som skördats senare påvisades ha ett högre innehåll av enterobakterier, jästsvampar, mjölksyrabakterier (MSB) samt mögelsvamparter. Valet av substrat och inkubationstemperatur för att detektera mögelsvamparter- och släkten kan dessutom påverka resultatet. I en studie användes fyra olika substrat inkluderande bland annat maltextraktagar (MEA) och dikloran glycerol-agar (DG-18), och inkubationstemperaturerna 37°C respektive 25°C, för att undersöka mögelsvamptillväxt i hösilage. Med MEA och DG-18 som substrat kunde alla de mögelsvamparterna som identifierades med fyra substrat detekteras. Hö, hösilage, ensilage och halm är de grovfoder som inkluderats i denna litteraturstudie.

Nyckelord: bakterier, jäst, LPS, mykotoxiner, mögel

Abstract

This literature review deals with a selection of methods for assessing the hygienic quality in roughages for horses. Microbial and macroscopic examinations are included as well as analyses of mycotoxins and lipopolysaccharides (LPS) in roughage. The literature review highlights the microorganisms that are commonly detected and analysed in roughage which are moulds, yeast and bacteria. Field-dried hay has been investigated and found to be at a greater risk for mould growth compared to hayloft-dried hay. When roughages were examined macroscopically and microbially, and when these methods were compared with each other, it was found that the results did not always correspond. The contents of deoxynivalenol (DON) and LPS in roughage were also investigated with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)- and limulus amebocyte lysate (LAL) assays. The ELISA test was supplemented with an liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, and it was shown that the results of the two analyses did not always correspond. In this study presence of microorganisms and LPS were also investigated in roughage. Straw was generally of worse hygienic quality than the hay examined. In another study, the microbial composition in haylage has been investigated before and after conservation in haylage harvested at different periods in the season. A haylage harvested late in the season has been shown to have a higher content of enterobacteria, yeast, lactic acid bacteria and different species of moulds. The choice of substrate and incubation temperature to detect moulds can also have an impact on the result. In one study, four substrates including *e.g* malt extract agar (MEA) and dichloran glycerol (DG-18) agar were used with the incubation temperatures 37°C and 25°C to investigate mould growth in haylage. With MEA and DG-18 and these incubation temperatures, all of the fungal species identified with all four substrates could be detected. Hay, haylage, silage and straw are the roughages that were included in this literature review.

Keywords: bacteria, LPS, mould, mycotoxins, yeast

1 Introduktion

Att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder är betydelsefullt av olika anledningar. Nedsatt hygienisk kvalitet i grovfoder kan påverka hälsan hos hästar negativt (Wichert *et al.*, 2008). Patogena mikroorganismer kan tillväxa och dessa kan orsaka bland annat respiratoriska och gastrointestinala sjukdomar hos hästar via inandning respektive konsumtion (Kamphues, 2013). Hö, hösilage, ensilage och halm är grovfoder som ofta används till hästar. De mikroorganismer som vanligen förekommer och undersöks i dessa är olika släkten och arter av mögelsvampar, jästsvampar och bakterier (Kamphues, 2013). Det finns olika sätt att bedöma den hygieniska kvaliteten i grovfoder och den analysmetod som används kan ha en inverkan på resultatet. Därför är det relevant att sammanfatta studier där olika analysmetoder använts.

I den här litteraturstudien kommer ett urval av metoder att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder att sammanfattas. De grovfoder som inkluderas är hö, hösilage, ensilage och halm. Syftet med litteraturstudien är att ta reda på hur hygienisk kvalitet i grovfoder för hästar kan bedömas och att få en bättre överblick av vilka mikroorganismer som vanligen förekommer. Den här litteraturstudien omfattar främst mikrobiella och makroskopiska undersökningar men även hur innehållet av mykotoxiner och LPS i grovfoder kan analyseras.

2 Litteraturstudie

2.1 Mikroorganismer i grovfoder

Vanligen förekommande mikroorganismer i grovfoder är olika arter och släkten av bakterier, jästsvampar och mögelsvampar. Då hygienisk kvalitet bedöms är det bland annat förekomsten av dessa som analyseras (Kamphues, 2013). Jästsvampar och mögelsvampar är mikroorganismer som absorberar näring från platsen de växer på. Mögelsvampar kan producera sporer och med dessa nå värden via inhalation (Black, 1996) och de kan även bilda mykotoxiner som kan vara skadliga för hästar (Kamphues, 2013). Jästsvampar och bakterier kan tillväxa under både aeroba och anaeroba förhållanden medan mögelsvampar endast tillväxer i aerob miljö. Till skillnad från bakterier är inte jäst- och mögelsvampar lika känsliga för låga pH-värden (Black, 1996).

För en del mikroorganismer finns så kallade gränsvärden, som finns för att underlätta bedömning av hygienisk kvalitet i foder. Det är den rekommenderade halten av ett ämne som får förekomma i djurfoder. Idag finns gränsvärden för aeroba bakterier (max 10^3 /g prov, gäller ensilage), gramnegativa bakterier (max 10^3 - 10^4 /g prov, gäller ensilage) koliforma bakterier (max 10^2 /g prov), anaeroba sporbildare (klostridier) och *Bacillus* (max 10^3 /g prov), jäst (max 10^5 /g prov) och mögel (max 10^5 /g prov, endast för hö) i vallfoder (Spörndly, 2003).

2.2 Grovfoder

2.2.1 Hö

Hö har länge använts som grovfoder till hästar. Torrsubstanshalten (ts) bör vara minst 86% (Kamphues, 2013) och vattenaktiviteten (a_w) under 0,7 (Hocking *et al.*, 1994) i hö för att minska risken att oönskade mikroorganismer tillväxer under lagringen. Varmgång kan uppstå i nyskördad hö, som packats och lagras, på grund

av växternas enzymatiska aktivitet efter skörd, särskilt om höet bärgas vid en ts-halt under 84%. Uppvärmning av fuktigt hö kan orsaka bildning av osmältbara Maillardprodukter, höet blir då brunt och/eller svart (Sullivan, 1973). Hö skall lagras luftigt och torrt och skyddas från fukt för att undvika att den hygieniska kvaliteten försämras (Müller, 2012).

Mikroorganismer och mykotoxiner i hö

Att undersöka mögelsvampförekomsten i hö som fått torka i fält är relevant då mögelsvampar finns i fält före skörd. Risken för att mögelsvampar tillväxer i höet kan öka om ts-halten är för låg under lagringprocessen (Raymond *et al.*, 2000). I Skandinavien kan denna undersökning vara särskilt viktigt eftersom det skandinaviska vädret kan variera avsevärt och det är sällan torrt och soligt flera dagar i rad. Höet kan då få ligga och torka länge innan det bärgas. Om hö får ligga och torka i fält en längre tid kan risken för mögelsvamptillväxt öka (Müller, 2012).

I en svensk studie av Clevström & Ljunggren (1984) analyserades svampfloran i fälttorkat och skulttorkat hö som lagrats i fyra respektive fyra och en halv månad. I mitten av juni togs totalt tio höprover från en vall bestående av timotej, klöver och ängssvingel. Det hö som undersöktes var skördat från samma vall men bärgat vid olika ts-halter (60, 63, 70, 76 och 80%). I det fälttorkade höet förekom främst *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* och *Rhizopus spp.* Samma släkten återfanns i det skulttorkade höet men förekom i en lägre andel prover. Av de arter av *Aspergillus* som förekom var *Aspergillus flavus* vanligast förekommande vilken minskade med ökad ts-halt. Denna art av *Aspergillus* är relevant att försöka undvika då den kan bilda mykotoxinet aflatoxin. I tabell 1 presenteras antalet delprover innehållande *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* och *Rhizopus spp.* i fälttorkat respektive skulttorkat hö bärgat vid olika ts-halter och efter lagring i fyra respektive fyra och en halv månad. I det fälttorkade höet detekterades dessa släkten på fler höprover jämfört med i det skulttorkade höet vilket kan indikera att fälttorkat hö har en högre risk för ökad mögeltillväxt (Clevström & Ljunggren, 1984).

Tabell 1. Antal delprover av *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* och *Rhizopus spp.* i fälttorkat och skulttorkat hö bärgat vid olika torrsubstanshalter (ts) och efter lagring i fyra respektive fyra och en halv månad (Clevström & Ljunggren, 1984)

Fälttorkat hö	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
63% ts	85	1	209
76% ts	142	42	6
80% ts	115	226	Ej detekterad
Skulttorkat hö			
60% ts	9	9	10
70% ts	37	16	41

I en kanadensisk studie (Raymond *et al.*, 2000) analyserades koncentrationer av utvalda fusariummykotoxiner, kontamination av mögelsvampar, mesofila bakterier och aktinomyceter i fälttorkat hö. De tog 132 höprover totalt från tio häststall (tolv prover från varje stall) och i hälften av proverna påvisades mögelsvampar, mykotoxiner och aktinomyceter. Mesofila bakterier förekom i sju av häststallen där innehållet som högst var $1,6 \times 10^7$ CFU/g. Innehållet av deoxynivalenol (DON), T2-toxin samt zearalenon (ZEN) undersöktes. Halten DON visade sig vara ha ett medelvärde på 2,14 µg/g i hö och de andra två toxinerna, T2-toxin och ZEN, hade medelvärdena 0,33 µg/g respektive 1,36 µg/g (Raymond *et al.*, 2000). Att DON förekommer indikerar ofta att även andra mykotoxiner finns. Det beror på att DON kan finnas kvar i foder även efter torkning, upphettning och malning (Rotter *et al.*, 1996). *Fusarium* är ett mögelsläkte som producerar DON, men även *Cephalosporium spp.*, *Myrothecium spp.*, *Stachybotrys spp.* och *Trichoderma spp.* kan producera mykotoxinet. De arter av aktinomyceter som förekom var *Thermoactinomyces candidus* (förekom i ett häststall) och *Thermoactinomyces vulgaris* (förekom i två häststall) (Raymond *et al.*, 2000). De svamparter/släkten som förekom kan ses i tabell 2.

I en annan studie, utförd i Schweiz, undersöktes höprover för förekomst av mögelsvampar, jästsvampar, DON, LPS och aeroba mesofila bakterier. Då visade sig en ts-halt under 86% i hö korrelera med en hög bakterietillväxt (över 10^5 CFU/g) vilket indikerade att det är viktigt att ts-halten är tillräckligt hög för att minska bakterietillväxten i hö. I denna studie beskrevs det inte vilka arter av bakterier som förekom (Wichert *et al.*, 2008).

2.2.2 Hösilage och ensilage

Hösilage har en ts-halt på 50% eller högre (Müller, 2007), och detta grovfoder klassas som ett mellanting av hö och ensilage (Müller, 2005). Hösilage konserveras inte genom mjölksyrafermentation, som ensilage gör, utan lagras anaerobt för

att förhindra tillväxt av aeroba mikroorganismer. Mjölksyrabakterier (MSB) står för konserveringen av ensilage. För att MSB skall tillväxa bör vattenaktiviteten vara ungefär $\geq 0,93$ (Pitt *et al.*, 1985) och ts-halten ungefär under ca 50% (Müller, 2007). Antalet MSB ökar vid lägre ts-halt vilket leder till produktion av mjölksyra som sänker pH-värdet i ensilage snabbare. Det låga pH-värdet motverkar tillväxt av oönskade mikroorganismer (Jackson & Forbes, 1970).

En risk med hösilage och ensilage i storbal i mindre häststallar kan vara att sådana balar innehåller för mycket foder i förhållande till hästarnas konsumtion av vallfoder. Fodret i den öppnade balen kan då hinna bli förskämt innan balen utfodrats i sin helhet (Müller, 2007).

Mikroorganismer och mykotoxiner i hösilage och ensilage

Hösilage för vuxna hästar skördas ofta sent i växtens botaniska utvecklingsstadium. Tidpunkten för skörd kan påverka den hygieniska kvaliteten i grovfodret. I en svensk studie (Schenck & Müller, 2013) där den mikrobiella kompositionen undersöktes före och efter konservering av hösilage skördat i juni, juli och augusti var halten jästsvampar högre i hösilage som skördats vid de två senare tidpunkterna ($\log \geq 6,3$ CFU/g). I det tidigare skördade hösilaget (juni) var halten jästsvampar istället $\log 5,0$ CFU/g. I det hösilage som skördats i augusti var halten enterobakterier $\log 4,3$ CFU/g och MSB $\log \leq 6,5$ CFU/g efter konservering, vilka var högre än i det hösilage som skördats i juni och juli där halten enterobakterier och MSB var $\log \leq 1,7$ CFU/g respektive $\log \leq 5,7$ CFU/g. Antalet mögelsvamparter var även fler i det hösilage som skördats i augusti efter konservering, jämfört med det tidigare skördade hösilaget. En senare skördetidpunkt kan därmed innebära en risk för ökad halt jästsvampar, enterobakterier samt ett flertal mögelsvamparter. Lagringsstabiliteten hos öppnade hösilagebalar undersöktes genom dagliga temperaturmätningar och den var relativt lika i fodret från de olika skördarna (Schenck & Müller, 2013). De svamparter/släkten som förekom i hösilageproverna efter konservering presenteras i tabell 2.

De enterobakterier som påträffats i ensilage är gramnegativa bakterier (Pahlow *et al.*, 2003). Fermentationsprodukterna från dessa är främst etanol och 2,3-butandiol och dessa är inte önskvärda i grovfoder. Förekomst av enterobakterier skall undvikas i ensilage då de konkurrerar med MSB i ensilage (Pahlow *et al.*, 2003). Antalet enterobakterier kan öka i samband med ökad plantmognad (Spiegelstra, 1987), och även under de första dagarna av ensileringsprocessen men dör oftast av därefter (Heron *et al.*, 1993). *Escherichia coli* är ett exempel på en art som tillhör gruppen enterobakterier och överlever vanligen inte ensileringsprocessen (Byrne *et al.*, 2002). De enterobakterier som brukar förekomma i ensilage är oftast icke-patogena, men de kan innehålla endotoxiner i yttre cellmembranet som visat sig orsaka hälsoproblem hos kor (Lindgren, 1991).

Clostridium botulinum är en sporbildande grampositiv bakterie som tillväxer i anaeroba förhållanden. Den kan producera toxinet botulin som orsakar den neuromuskulära sjukdomen botulism hos hästar. Detta är en allvarlig och dödlig förgiftning (Stratford *et al.*, 2014). *Clostridium botulinum* kan förekomma i fodermedel som t ex hö, hösilage, ensilage och halm (Kamphues, 2013). Antalet hästar som drabbas av förgiftningen i Sverige är svårt att uppskatta eftersom inte alla sjukdomsfall registreras, trots att det är anmälningsplikt. I en retrospektiv undersökning visade det sig att 65 sjukdomsfall på häst anmäldes till försäkringsbolagen mellan år 1995, 1997 eller 1999 fram till år 2005 (Bergold, 2007).

Clostridium tyrobutyricum är en av de vanligaste klostridiearterna som påvisats i svenskt storbalsensilage och denna kan omvandla mjölksyra till smörsyra, vilket är negativt eftersom mjölksyran bidrar till den önskade sänkningen av pH-värdet i ensilage vilket inte smörsyra gör. Denna omvandling kan ske trots att pH-värdet är lågt (Jonsson, 1990).

Ensilage som bedöms vara av nedsatt hygienisk kvalitet innehåller ofta höga koncentrationer av smörsyra och/eller ammoniak. Dessa förekommer ofta som resultat av att klostridier eller enterobakterier finns eller har funnits i ensilaget, och är normalt ofarliga men indikerar att en feljäsning har skett (McDonald *et al.*, 1991). Förekomst av enterobakterier och klostridier kan även indikera att fodret kontaminerats med jord, gödsel eller döda djur- och växtdelar. Dessa bakterier bör undvikas då de kan orsaka exempelvis gastrointestinala sjukdomar hos hästar (Jansson *et al.*, 2011).

Tabell 2. Exempel på förekomst av svamparter/släkten i olika grovfoder

Svampart/släkte	Förekomst i	Referens
<i>Alternaria spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus terreus</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Aureobasidium spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Emicella spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Eurotium spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Mucor spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Mucor circinelloides</i>	Hösilage	Schenck & Müller, 2013
<i>Mucor fragilis</i>	Hösilage	Schenck & Müller, 2013
<i>Mucor hiemalis</i>	Hösilage	Schenck & Müller, 2013
<i>Penicillium carneum</i>	Hösilage	Schenck & Müller, 2013
<i>Penicillium spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Phoma spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizopus spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhodotorula</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Sphaeropsidales spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Scopulariopsis spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Sordaria spp.</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011
<i>Verticillium spp.</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Wallemia</i>	Hö	Raymond <i>et al.</i> , 2000
<i>Zygomycetes</i>	Hösilage	Müller <i>et al.</i> , 2011

2.2.3 Halm

Halm är ett komplement till vallfoder och används främst som strömmaterial till hästar men även som foder. Halm skall ha en ts-halt på minst 86% (Kamphues, 2013). Att den hygieniska kvaliteten i halm analyseras för mögelsvampar, jästsvampar och bakterier är relevant då hästar både konsumerar halmen och kan inhalera mögelsporer från den (Wichert *et al.*, 2008).

Mikroorganismer och mykotoxiner i halm

I en schweizisk studie (Wichert *et al.*, 2008) analyserades halm för förekomst av mögelsvampar, jästsvampar och bakterier. Även koncentrationerna av DON och LPS undersöktes. Halten av LPS hade ett medelvärde på 100 µg/g vilket var över gränsvärdet (20 µg/g enligt Kamphues *et al.*, 2004), och högre än LPS-innehållet i hö (medelvärde: 31,6 µg/g). Det höga LPS-innehållet i halm var korrelerat med en hög bakteriehalt (över 10⁵ CFU/g). Hos halmen analyserades DON-innehållet med enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) och vätskekromatografi-

tandem-masspektrometri (LC-MS/MS) och resultaten av de två analyserna visade medelvärden på 0,47 µg/g respektive 0,42 µg/g. Dock kunde resultaten variera mellan analyserna av samma halmprov. Resultaten från studien visade att halmen generellt hade en sämre hygienisk kvalitet än höet i de stall där foderproverna togs (Wichert *et al.*, 2008).

2.3 Metoder för bedömning av hygienisk kvalitet i foder

Några analysmetoder som använts i studier för att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder till hästar är bland annat makroskopisk bedömning (visuell bedömning) och mikrobiologisk undersökning med kvantifiering (Wichert *et al.*, 2008) och vid vissa tillfällen art/släktesbestämning (Müller *et al.*, 2011).

Innehållet av lipopolysackarider (LPS) kan undersökas i grovfoder med ett limulus amöbocyt lysat (LAL)-test, för att detektera gramnegativa bakterier då LPS finns i deras cellväggar (Kamphues, 1986). Eftersom levande bakterier inte alltid förekommer i de prover som anses ha nedsatt hygienisk kvalitet kan undersökning av LPS-innehållet i grovfoder vara relevant (Kamphues *et al.*, 2004). Att undersöka innehållet av mykotoxinet DON är av vikt då DON ofta indikerar att andra mykotoxiner förekommer i fodret (Rotter *et al.*, 1996). Innehållet av DON kan undersökas med ett ELISA-test och/eller med en LC-MS/MS-analys (Wichert *et al.*, 2008).

Att använda olika kultiveringssubstrat, inkubationstemperaturer samt anaerob eller aerob miljö i den mikrobiologiska analysen kan också vara relevant för att detektera olika arter och släkten av mikroorganismer som kan förekomma i grovfoder (Müller *et al.*, 2011).

2.3.1 Lipopolysackarider och mykotoxiner

I studien som utfördes av Wichert *et al.* (2008) togs totalt 150 grovfoderprover i 46 stall. I dessa undersöktes DON-innehållet med ELISA- och LC-MS/MS-analys och LPS-innehållet med LAL-test. Som tidigare nämnt var LPS-innehållet generellt högre i halm jämfört med i hö. Resultatet från LAL-testet, som påvisade ett högt LPS-innehåll i halm, stämde överens med den höga bakteriehalten. I hö var däremot bakteriehalten låg och LPS-innehållet högt, över 20 µg/g (gränsvärde enligt Kamphues *et al.*, 2004). De halmprover som innehöll DON enligt ELISA-test analyserades på nytt för DON med LC-MS/MS-analys. I åtta halmprover och ett höprov kunde DON detekteras med ELISA-testet, och efter LC-MS/MS-analys påvisades DON-halten vara högre i höprovet (57% högre halt) och fyra av halmproverna (15-51% högre halt), jämfört med ELISA-testets resultat. I de resterande fyra halmproverna var DON-innehållet lägre enligt LC-MS/MS-analysen (82-98% lägre halt) jämfört med vad ELISA-testets resultat påvisat. Som högst var DON-

halten, enligt LC-MS/MS-analysens resultat, 1,24 µg/g i ett av halmproverna. Skillnaden var även högre mellan proverna enligt LC-MS/MS-analysens resultat där DON-halterna varierade mellan 0,01 µg/g och 1,24 µg/g. Enligt ELISA-testets resultat varierade halterna i proverna mellan 0,21 µg/g och 0,88 µg/g. De halmprover och det höprov som hade högst DON-innehåll kom från samma häststall (Wichert *et al.*, 2008).

Även Raymond *et al.* (2000) använde ELISA-test för att analysera förekomsten av DON, T2-toxin och ZEN i totalt 132 höprover från tio stall. Med hjälp av ELISA-test kunde de komma fram till att alla mykotoxiner förekom i alla höprover från de tio olika stallen varav DON-halten hade ett medelvärde på 2,14 µg/g. I studien drogs slutsatsen att DON-halterna som förekom kunde ha en inverkan på hälsan hos de hästar som konsumerade detta hö (Raymond *et al.*, 2000).

2.3.2 Makroskopisk och mikrobiell undersökning

I studien av Wichert *et al.* (2008) undersöktes förekomsten av aeroba bakterier, mögelsvampar och jästsvampar i grovfoder med hjälp av makroskopisk och mikrobiell undersökning. De höprover som ansågs ha en god hygienisk kvalitet i den makroskopiska undersökningen visade sig efter den mikrobiologiska analysen innehålla bakterier från 100 CFU/g upp till $1,9 \times 10^6$ CFU/g. Oberoende av den makroskopiska undersökningens resultat detekterades ett innehåll av jästsvampar (över 1000 CFU/g) i majoriteten av höproverna med hjälp av den mikrobiella undersökningen. I den mikrobiella undersökningen gjordes ingen art/släktesbestämning av bakterier, jästsvampar eller mögelsvampar. I studien kom de fram till att det oftast inte fanns någon korrelation mellan den makroskopiska och den mikrobiella undersökningens resultat. Även om ett grovfoder ansågs ha en god hygienisk kvalitet enligt den makroskopiska undersökningen kunde det påvisas ett innehåll av främst jästsvampar (Wichert *et al.*, 2008).

Makroskopisk bedömning av grovfoder gjordes även i den kanadensiska studien av Raymond *et al.* (2000). Stallägare, tränare eller stallchef fick frågan om hur de makroskopiskt bedömde att den hygieniska kvaliteten i sitt fälttorkade hö var. I sju av häststallen ansågs höet vara av nedsatt hygienisk kvalitet. I de resterande tre häststallen betraktades det vara av bra hygienisk kvalitet, men dessa åsikter överensstämde inte med den mikrobiella undersökningens resultat där mögelsvampar, mykotoxiner och aktinomyceter påvisades i höet. Detta innebär att det generellt inte går att makroskopiskt bedöma om ett grovfoder innehåller mögelsvampar och aktinomyceter (Raymond *et al.*, 2000).

2.3.3 Substrat och inkubationstemperaturer

I en studie av Müller *et al.* (2011) analyserades förekomst av mögelsvampar, jästsvampar, enterobakterier och klostriediesporer i hösilageprover som togs på hösten och den efterföljande våren från samma hösilagepartier. Olika kultiveringsförhållanden för svamp användes; anaerob/aerob inkubation; fyra olika substrat (maltextraktagar (MEA), dikloran bengalrosa kloramfenikol- (DRBC), dikloran glycerol- (DG-18) och Czapek-Dox-agar (Cz)); och tre olika inkubationstemperaturer (15°C, 25°C och 37°C). Hösilageprover togs från 18 olika häststall. Alla de mögelarter som identifierades då alla substrat och inkubationstemperaturer användes kunde också upptäckas genom att använda endast två substrat (MEA och DG-18) och två inkubationstemperaturer (37°C och 25°C). Därför drogs slutsatsen att de två substraten och temperaturerna är lämpliga för att detektera mögelsvamparter/slakten i hösilage (Müller *et al.*, 2011). De svamparter/slakten som förekom i proverna presenteras i tabell 2.

Dessa två substrat användes även i studien av Raymond *et al.* (2000) för detektion av termotoleranta svampar (med MEA) och xerofila svampar, dvs svampar som klarar torra miljöer (med DG-18), i inkubationstemperaturerna 40°C respektive 25°C. För att inhibera tillväxt av bakterier kompletterades MEA-agar med 35 mg/l streptomycin samt 35 mg/l rosbengal för att inhibera tillväxt av svampar (Raymond *et al.*, 2000). De svamparter/slakten som förekom i denna studie, på de två substraten, presenteras även de i tabell 2.

3 Diskussion

I denna litteraturstudie har olika metoder för att bedöma hygienisk kvalitet i grovfoder och vanligen förekommande mikroorganismer sammanfattats. Förekomsten av bakterier, mögelsvampar, jästsvampar och mykotoxiner är vanliga att undersöka och de uppträder i varierande grad i olika grovfoder.

Makroskopisk och mikrobiell undersökning utfördes i studien av Wichert *et al.* (2008) och det fanns ingen korrelation mellan resultatet av den makroskopiska undersökningen och halten mikroorganismer efter den mikrobiella undersökningen. Även om den makroskopiska undersökningens resultat visade god hygienisk kvalitet kunde den mikrobiella undersökningens resultat visa en hög halt av jästsvampar, mögelsvampar och/eller bakterier i proverna (Wichert *et al.*, 2008). Detta kan innebära att en makroskopisk undersökning inte är tillräckligt pålitlig för att bedöma den hygieniska kvaliteten i grovfoder. Detta är inte så konstigt eftersom det inte går att se alla mikroorganismer med blotta ögat. I den här studien (Wichert *et al.*, 2008) nämns det inte vilka bakteriearter det rörde sig om. Det hade varit intressant om detta tagits upp då det finns både önskade och oönskade bakterier. Precis som Wichert *et al.* (2008) tog upp i sin studie kan det även vara möjligt att de personer som deltog i denna studie var noggrannare med att deras hö var av god hygienisk kvalitet jämfört med halmen. Många hästägare lägger kanske generellt störst fokus på att hö, hösilage och ensilage är av god hygienisk kvalitet till skillnad från halm som ofta används som strömaterial.

Enligt resultatet från studien av Raymond *et al.* (2000) stämde inte heller hästägarnas åsikter efter den makroskopiska undersökningen överens med resultaten från den mikrobiella undersökningen för förekomst av mögelsvampar i grovfodret. Den makroskopiska undersökningen kan bero på vem som gör den, då olika människor troligtvis inte visuellt bedömer den hygieniska kvaliteten i grovfoder likadant.

I studien av Wichert *et al.* (2008) undersöktes DON-innehållet i grovfoder med både ELISA- och LC-MS/MS-analys och då visade de två analyserna olika resultat. I en del prover visade ELISA-testet ett högre DON-innehåll jämfört med LC-

MS/MS-analysen och ibland var det tvärtom (Wichert *et al.*, 2008). I hälften av halmproverna visade LC-MS/MS-analysens resultat 82-98% lägre DON-halter än ELISA-testet. Variationerna kan bero på misstag vid analyserna men även andra faktorer kan ha en inverkan på resultatet. Eftersom de halmprover och det höprov med högst DON-innehåll kom från samma häststall kan resultatet bero på att de generellt hade halm och hö av sämre hygienisk kvalitet. Att grovfoder förvaras på rätt sätt är viktigt för att undvika risken för tillväxt av oönskade mikroorganismer. Grovfodret kan även ha utsatts för kontamination av mögelsporer som producerat DON. Precisionen hos de två analyserna kan även ha varierat. Koncentrationerna av DON enligt ELISA-testet varierade inte lika mycket som de gjorde enligt LC-MS/MS-analysens resultat. Det är dock svårt att tolka vilken analys som är lämpligast då DON-halterna varierade ganska mycket mellan de två analyserna. Det kan vara relevant att kombinera dessa två analysmetoder för undersökning av koncentrationen DON för att få ett trovärdigt resultat.

I samma studie undersöktes även LPS-innehållet i hö och halm med LAL-test. Resultatet påvisade ett högt LPS-innehåll och detta stämde bra överens med en hög bakteriehalt i halmproverna. Däremot visade LAL-testets resultat ett högt LPS-innehåll i hö och den mikrobiella undersökningens resultat påvisade en låg bakteriehalt (Wichert *et al.*, 2008).

Studien av Wichert *et al.* (2008) har fått relativt stor plats i den här litteraturstudien eftersom jag tyckte den var intressant då de använt sig av flera olika metoder för bedömning av hygienisk kvalitet i grovfoder.

I studien av Clevström & Ljunggren (1984) analyserades svampfloran i fälttorkat och skulttorkat hö som bärgats vid olika ts-halter efter fyra månaders lagring. *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* och *Rhizopus spp.* förekom i både fälttorkat och skulttorkat hö. I tabell 1 presenteras antalet höprover med förekomsten av dessa släkten. Lägre andel prover av det skulttorkade höet innehöll släktena jämfört med hos det fälttorkade höet. Antalet prover med *Aspergillus flavus*, som kan bilda aflatoxin, minskade med ökad ts-halt i fälttorkat hö. Däremot var *Penicillium spp.* i fälttorkat hö vanligare förekommande vid 80% ts jämfört med i det hö som bärgades vid 63% och 70% ts (Clevström & Ljunggren, 1984), vilket kan indikera att halten mögelsvampar kan öka i fälttorkat hö trots bärgning vid en högre ts-halt som 80%. Att *Penicillium spp.* förekom i 226 prover vid 80% ts kan bero på att detta hö legat ute och torkat i fält längre, för att få en högre ts-halt, vilket kan öka risken för mögeltillväxt. En till anledning till att *Penicillium spp.* förekom på fler prover vid en högre ts-halt kan vara att andra släkten och arter inte överlevt vid 80% ts vilket lett till att *Penicillium spp.* fått mer plats att tillväxa på. I det fälttorkade höet bärgat vid 80% ts fanns *Aspergillus spp.* och *Penicillium spp.* i 115 respektive 226 prover och *Rhizopus spp.* detekterades inte vid denna ts-halt. I det skulttorkade höet bärgat vid 70% ts (den högsta ts-halten som detta hö bärgades

vid) var andelen prover innehållande dessa släkten lägre. Där förekom *Aspergillus spp.* och *Penicillium spp.* i 16 respektive 37 prover. *Rhizopus spp.* förekom i 41 prover vid denna ts-halt. Släktena förekom alltså i större andel höprover av det fälttorkade höet jämfört med det skulttorkade höet. Denna studie gjordes i Sverige och det skandinaviska vädret kan variera mycket. Det är ovanligt att det är torrt och soligt flera dagar i rad. Därför kan vara svårt att undvika mögeltillväxt i fälttorkat hö. Det optimala är därför att kombinera fälttorkning och skulttorkning om möjlighet till det finns. Att undersöka förekomsten av mögelsvampar i fälttorkat hö är relevant då det finns en större risk för mögeltillväxt i detta hö jämfört med i skulttorkat hö. Mögelsvampar finns naturligt i fältfloran och om det fälttorkade höet inte är tillräckligt torrt vid lagring kan dessa få chansen att tillväxa, bilda mögelsporer och producera mykotoxiner.

Raymond *et al.* (2000), som också undersökte innehållet av mykotoxiner och mögelsvampar i fälttorkat hö, kom i sin studie fram till att DON fanns i högst halt av de mykotoxiner som undersöktes. En slutsats i studien var att DON kunde utgöra en fara för de hästar som konsumerade detta hö. Dock är inte T2, ZEN och DON jämförbara då de har olika toxicitet.

I studien av Raymond *et al.* (2000) användes två olika substrat och inkubationstemperaturer, MEA och DG-18-agar med temperaturerna 40°C respektive 25°C, för att detektera mögelsvampar. Ett flertal mögelarter/släkten kunde då detekteras. Dessa substrat användes även i studien av Müller *et al.* (2011) med inkubationstemperaturerna 37°C och 25°C för att undersöka mögeltillväxten i hösilage. Att använda dessa substrat och inkubationstemperaturer kan vara lämpligt för att detektera så många mögelarter/släkten som möjligt i både fälttorkat hö (Raymond *et al.*, 2000) och hösilage (Müller *et al.*, 2011).

I studien av Schenck & Müller (2013), där den mikrobiella kompositionen undersöktes i hösilage skördat vid olika tidpunkter före och efter konservering, visade sig skördetidpunkten ha en inverkan på innehållet av mikroorganismer i hösilaget. Ett senare skördat hösilage visade sig i denna studie ha ett högre innehåll av enterobakterier, jästsvampar och MSB. Dessutom var halten mögelsvampar högre i det sent skördade hösilaget efter konservering. Eftersom att hösilage till häst ofta skördas sent i växtens botaniska utvecklingsstadium är detta en relevant och intressant studie.

En metod för att minska risken att fodret i öppnade höbalar skall hinna bli förskämt kan vara att anpassa storleken på höbalarna till hästarnas konsumtion. I större häststallar passar det bra med storbalar men i mindre stall, där åtgången inte är lika stor kan det vara lämpligt att använda mindre balar.

Det finns, som tidigare nämnt, rekommenderade riktvärden för aeroba bakterier, gramnegativa bakterier, koliforma bakterier, anaeroba sporbildare (klostridier) och *Bacillus*, jäst och mögel i vallfoder (Spörndly, 2003). Om hästägare vill göra en

mikrobiell undersökning av sitt grovfoder är det bra att det finns riktvärden för olika mikroorganismer i vallfoder. Dessa gäller dock inte för halm. Därför borde det även införas riktvärden för dessa mikroorganismer i halm.

Efter att ha läst och sammanfattat de studier som inkluderats i denna litteraturstudie har jag fått mer förståelse för hur bedömning av hygienisk kvalitet i grovfoder kan gå till. Som slutsats är det viktigt att försöka undvika tillväxt av bakterier, jästsvampar och mögelsvampar samt mykotoxiner i grovfoder i den mån det är möjligt eftersom de kan orsaka allvarliga sjukdomar hos hästar, både respiratoriska och gastrointestinala. De bakterier som tagits upp i dessa studier är främst enterobakterier och klostridier. Olika arter och släkten av mögelsvampar verkar vara vanligare att undersöka jämfört med arter och släkten av bakterier och jästsvampar. Det kan bero på att mögelsvampar utgör ett större problem hos hästar och därmed undersöks oftare i studier. Jag anser att det är relevant att fokus läggs på respiratoriska partiklar, som mögelsporer och deras förekomst i grovfoder. Mögelsporer kan inhaleras av hästar och orsaka respiratoriska sjukdomar samt producera mykotoxiner som kan vara skadliga för hästar. Grovfoder kan kontamineras av mögelsporer vilket ofta är ofarligt. Det är då sporer tillväxer från mögelkolonier som det kan bli problematiskt. Antal mögelkolonier som detekterats i ett prov antas korrelera med mögeltillväxt i fodret. Dock bör denna undersökning göras med försiktighet då proven kan vara olika starkt kontaminerade med mögelsporer. Ett foder kan ha en låg halt CFU/g mögelsvampar om provet exempelvis tagits från en färsk mögelfläck med enbart svamphyfer. Att ha i beaktning är att detta foder trots detta kan vara genomväxt av mögel. Därför är inte alltid kvantitativa mögelbestämningar lätta att tyda. Bedömning av hygienisk kvalitet i grovfoder kan vara komplext. Den analysmetod som används kan med stor sannolikhet ha en inverkan på resultatet. Dessutom tror jag att det är viktigast att detektera och försöka minska risken att de farliga av dessa tillväxer och undvika att de förekommer i för hög halt i grovfoder för hästar.

Referenslista

- Bergold, J. (2007). Botulism in Swedish horses. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete 2007:11)
- Black, J.G. (1996). Microbiology – Principles and Applications. *Prentice Hall College*. 3. uppl. 2-3, 151, 232-233, 308-311.
- Byrne, C.M., O’Kiely, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A. & Blair, I.S. (2002). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation. *Journal of Food Protection* 65 (12), 1854-1860.
- Clevström, G. & Ljunggren, H. (1984). Occurrence of storage fungi, especially aflatoxin-forming *Aspergillus flavus* in soil, greenstuff and prepared hay. *Journal of Stored Products Research* 20, 71-82.
- Heron, S.J.E., Wilkinson, J.F. & Duffus, C.M. (1993). Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 13-17.
- Hocking, A.D., Miscamble, B.F. & Pitt, J.I. (1994). Water relations of *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunata* and *Curvularia pallescens*. *Mycological Research* 98 (1): 91-94.
- Jackson, N. & Forbes, T.J. (1970). The voluntary intake by cattle of four silages differing in dry matter content. *Animal Production* 12. 591-599.
- Jansson, A., Lindberg J.E., Rundgren, M., Müller, C.E., Connysson, M., Kjellberg, L. & Lundberg, M. (2011). Utfodringsrekommendationer för häst. Rapport 289. Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU.
- 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.
- Kamphues, J. (1986). Lipopolysaccharide in Futtermitteln – mögliche Bedeutung, Bestimmung und Gehalte. *Übersichten. Tierernährung* 14, 131-156.

- Kamphues, J., Coenen, M., Kienzle, E., Pallauf, J., Simon, O. & Zentek, J. (2004). Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. 10. Aufl., Verlag M. Und H. Schaper, Alfeld, Germany.
- Kamphues, J. (2013). Chapter 20: Feed hygiene and related disorders in horses. *Applied Nutrition – Feeds*. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3422-0.00020-1
- Lindgren, S. (1991). Hygienic problems in conserved forage. In: Pahlow, G. & Honig, H. (Eds.). *Forage conservation towards 2000*. Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 123, Germany. 177-190.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. (1991). *The biochemistry of silage*. 2 uppl. Chalcombe Publications, Marlow, UK. 52, 91-94, 272.
- Müller, C.E. (2005). Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as feed for horses. *Grass and Forage Science*, 60, 109-118.
- Müller, C.E. (2007). Wrapped forages for horses. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Department of Animal Nutrition and Management. Vol 44, 1-57.
- Müller, C.E., Hultén, C., Gröndahl, G. (2011). Assessment of hygienic quality of haylage fed to healthy horses. *Grass and Forage Science*, 66, 453-463.
- Müller, C.E. (2012). Forages and grazing in horse nutrition. Edited by Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S. & Miraglia, N. Wageningen Academic Publishers. EAAP publication No. 132, 237-253.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of ensiling. In: D.R. Buxton, R.E. Muck & J.H. Harrison (Eds.). *Silage Science and Technology*. ASA, CSSA, SSSA Agronomy no. 42, Madison, Wisconsin, USA. 7, 13.
- Pitt, R.E., Muck, R.E., Leibensperger, R.Y. (1985). A quantitative model of the ensilage model process in lactate silages. *Grass and forage science* 40, 279-303.
- Raymond, S.L., Heiskanen, M., Smith, T.K., Reiman, M., Laitinen, S., Clarke, A.F. (2000). An investigation of the concentrations of selected Fusarium mycotoxins and the degree of mold contamination of field-dried hay. *Journal of Equine Veterinary Science*, 20, 616-621.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Petska, J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48, 1-34.
- Schenck, J., Müller, C.E. (2013). Microbial composition before and after conservation of grass-dominated haylage harvested early, middle and late in the season, Journal of equine veterinary science. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 593-601.

- Spoelstra, S.F. (1990). Comparison of the content of clostridial spores in wilted grass silage ensiled either in laboratory, pilot-scale or farm silos. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 38, 423-434.
- Spörndly, R. (2003). Fodertabeller för idisslare. 6. uppl., rapport 257. *Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU*.
- Stratford, C.H., Mayhew, I.G., Hudson, N.P.H. (2014). Equine botulism: A clinical approach to diagnosis and management. *Equine Veterinary Education* 26 (8) 441-448.
- Sullivan, J.T. (1973). Drying and storing herbage as hay. In: G.W. Butler & R.W. Bailey (Eds.). *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Vol.3. Academic Press Inc. Ltd. London, UK. Kapitel 27, 1-31.
- Wichert, B., Nater, S., Wittenbrink, M.M., Wolf, P., Meyer, K., Wanner, M. (2008). Judgement of hygienic quality of roughage in horse stables in Switzerland. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 432-437.