



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap

Grovfodrets påverkan på mjölkens bakterieflora – En delstudie inom projektet ”Integrerad kvalitetsstyrning för ökad lönsamhet i produktion av norrländsk långlagrad ost”

How forage can affect raw milk bacterial flora – a substudy within the project “Integrated quality control for increased profitability in production of hard cheese”

Emelie Eriksson

Examensarbete • 30 hp
Husdjursagronom
Examensarbete 2020:1
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap
Umeå 2020

Grovfodrets påverkan på mjölkens bakterieflora – en delstudie inom projektet ”Integrerad kvalitetsstyrning för ökad lönsamhet i produktion av norrländsk långlagrad ost”

How forage can affect raw milk bacterial flora – a substudy within integrated quality control for increased profitability in production of hard cheese

Emelie Eriksson

Handledare: Gun Bernes, SLU, Norrländsk Jordbruksvetenskap
Handledare: Annika Höjer, Norrmejerier
Examinator: Mårten Hetta, SLU, Norrländsk Jordbruksvetenskap

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: A1E
Kurstitel: Examensarbete Husdjursagronom
Kursansvarig inst.: Norrländsk Jordbruksvetenskap
Kurskod: EX0657
Program/utbildning: Husdjursagronom

Utgivningsort: Umeå
Utgivningsår: 2020
Serietitel:
Delnummer i serien: 2020:1
ISSN:
Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bakteriefloa mjölk, bakteriefloa grovfoder, mjölksyrabildande bakterier, ensileringsmetoder,

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap
Enheten för husdjurskötsel

Sammanfattning

Detta examensarbete är gjort inom ett större forskningsprojekt rörande kvalitetsstyrning för ökad lönsamhet vid produktion av långlagrad ost, initierat av Norrmejerier och SLU. Examensarbetet berör mjölkens bakterieflora på gårdarna och hur den kan påverkas av grovfodret som produceras och utfodras.

Under hösten 2017 inleddes arbetet med en litteraturstudie rörande vilka bakterier som finns i mjölk och hur de kommer dit. Vidare har sammanfattande beskrivning gjorts av befintligt data från 43 gårdar i norra Sverige rörande foderhantering och mjölkningsrutiner vintern 2015/2016. Befintliga mikrobiologiska analysresultat från mjölkprovtagningar februari 2016 har sammanställts för att ge en bild av den mikrobiologiska floran i mjölken hos dessa gårdar. I materialet finns även åtta foderprov från juni/juli 2016 vilka inom examensarbetet har jämförts mot mjölkprover tagna vid samma tillfälle, för att se vilka bakterier som kan ha följt med från grovfodret till mjölken. Telefonintervjuer har genomförts med 17 av gårdarna i samband med foderprovtagning i november 2017. Detta för att kartlägga hur grovfodret som de mjölkande korna givits har hanterats och utifrån hygieniska provresultat på grovfoderproverna se hur de påverkats av ensileringsmetod.

Resultaten från de hygieniska analyserna visar att det fanns mer mjölksyrabildande bakterier, mer jäst och mindre mögel i rundbalar utan ensileringsmedel, jämfört med ensilage från tornsilos och plansilos. Mest mögel fanns i foder från tornsilos och foder där syratillsats använts. Det är svårt att veta om effekten beror på konserveringsmetod eller förekomst av tillsatsmedel, då alla rundbalar (utom ett prov) saknade tillsatsmedel och alla tornsilos behandlats med syratillsats.

Resultaten från den mikrobiologiska studien av totalt åtta foderprov och tillhörande mjölkprov, indikerar att ett flertal bakterier kan ha sitt ursprung i fodret. Även om bakterierna har sitt ursprung i fodret är det svårt att veta om mängden av dessa bakterier i fodret kan påverka mängden mikrober i mjölken. Vi kan anta att en högre mängd mikrober i fodret ge en ökad sannolikhet för kontamination av mjölken. I mjölkproven kan vi utgå ifrån att bakterier av exempelvis släktena *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea* och *Pseudomonas* ha sitt ursprung i fodret.

Abstract

This master thesis has been done within a larger research project concerning quality control for increased profitability in the production of hard cheese, initiated by Norrmejerier and SLU. This master's thesis pertains the microbiota of raw milk, and how it can be affected by forage.

During the fall of 2017 the thesis work started with a literature overview concerning the bacterial flora in raw milk and its origin. Next, a summative description was made with existing data from 43 farms located in northern Sweden, regarding forage handling and milking procedures during the winter of 2015/2016. Existing analysis results of raw milk microbiota taken in February 2016 was summarised to depicture the collected raw milk microbiota of these farms. Also, eight forage samples from June/July 2016 was compared to eight raw milk samples from the same farms taken during the same time period. This was done to identify which raw milk bacteria that may have their origin in the forage given to the lactating cows. Apart from this, forage samples have been taken at 17 farms in November 2017. A telephone interview was carried out before sampling in order to map the on-farm forage handling. The hygienic test results of these 17 forage samples was then analysed to see if they were affected by ensiling method.

Results of the hygienic analyses showed more lactic acid bacteria and yeast, but less mould, in round bales without additives, compared to silage samples from tower silo or bunker silo. Tower silos inoculated with acid had the highest concentration of mould. The reason for these differences is hard to elucidate, as all samples taken from tower silos were treated with acid and only one sample taken from round bales was treated with additives.

Results from the microbiological study of eight forage samples and eight raw milk samples, together with available literature, indicated that some of the bacteria in raw milk can originate from the forage. Even if the origin is feed, it is however difficult to know if the quantity of a bacteria in forage affects the quantity of the same bacteria in raw milk. A larger quantity of microbes in the forage anyhow increases the likeliness of contamination of the raw milk. In our raw milk samples for instance the genera *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea* and *Pseudomonas* may have their origin in the forage given to the dairy cows.

Speciellt tack

Jag vill tacka mina två handledare Gun Bernes på SLU och Annika Höjer från Norrmejerier, för hjälp och vägledning genom arbetets alla delar.

Jag vill också tacka Li Sun och Johan Dicksved på SLU. Li för att jag fått tagit del av hans resultat från DNA-sekvenseringen av foder -och mjölkprover och hjälp att förstå metoden som använts. Johan för korrekturläsning och viktiga inspel i de mikrobiologiska delarna.

Regional Jordbruksforskning för norra Sverige, Stiftelsen Lantbruksforskning samt Familjen Kamprads Stiftelse har finansierat de projekt som arbetet är en del av.

Jag vill avsluta med att tacka Mårten Hetta, prefekt på institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap, och alla mjölkproducenter som visat mig och Gun sina gårdar, låtit oss ta prover och svarat på alla mina frågor!

SAMMANFATTNING	3
ABSTRACT	4
SPECIELLT TACK	5
INLEDNING	1
LITTERATURSTUDIE	2
KLASSIFICERING AV BAKTERIER.....	2
BAKTERIELL TILLVÄXT	2
BAKTERIER I GROVFODER	3
<i>Bakterier på den levande växten</i>	3
<i>Hur påverkar ensileringen bakterierna?</i>	5
<i>Ensileringsmedel</i>	6
<i>Effekt av ensileringsmetod</i>	6
<i>Effekt av torrs substans</i>	7
MJÖLKENS BAKTERIOLOGISKA SAMMANSÄTTNING.....	7
<i>Vanligaste bakterierna</i>	7
<i>Bra och dåliga bakterier</i>	9
<i>Varifrån kommer bakterierna?</i>	9
<i>Bete</i>	10
HÅRDOST – VIKTIGA BAKTERIER	11
<i>Bakterier viktiga för ostens mognad</i>	11
<i>Gramnegativa bakterier</i>	12
MATERIAL OCH METOD	13
KOKONTROLLEN	14
TELEFONINTERVJU	14
PROVTAGNINGAR.....	14
<i>Foder, Etapp 1 och 2</i>	14
<i>Mjolk, Etapp 1</i>	15
BERÄKNINGAR OCH STATISTIK.....	16
ANALYSER.....	16
<i>DNA-sekvensering foder och mjolk</i>	16
<i>Hygieniska analyser grovfoder</i>	16
RESULTAT	18
ETAPP 1 – BESKRIVNING AV 43 GÅRDAR.....	18
<i>Mjölkningsrutiner</i>	19
<i>Inhysning</i>	19
<i>Grovfoder</i>	19
<i>Vattenförsörjning</i>	20
<i>Utfodring</i>	20
<i>Kraftfoderförsörjning</i>	21
MJÖLKENS MIKROBIOTA.....	21
<i>Mikrobiota i foder och mjolkprov</i>	22
ETAPP 2 – BESKRIVNING AV 17 GÅRDAR.....	25
<i>Mjölkningsrutiner och inhysning</i>	25
<i>Utfodring</i>	25
<i>Grovfoder</i>	26
HYGIENISK KVALITET FODERPROV	27
DISKUSSION	28
ETAPP 1	28
<i>Gårdsbeskrivningar</i>	28
<i>Mjölakens mikrobiota, februariprover</i>	28
<i>Mikrobiota i foder- och mjolkprov, sommarprover</i>	31
ETAPP 2	34
<i>Hygienisk kvalitet i grovfoder</i>	34
<i>Enterobakterier och klostridiesporer</i>	35

<i>Jäst och mögel</i>	35
<i>Mjölksyrabakterier</i>	35
<i>Påverkas mjölkens mikrobiota av ensileringsmedel?</i>	36
<i>Påverkas fodrets mikrobiota av lagringsmetod?</i>	36
SAMMANFATTNING	36
REFERENSLISTA	37
BILAGA 1	40
FRÅGOR TILL LANTBRUKARE, TELEFONINTERVJU	40
<i>Grovfoder</i>	40
<i>Kraftfoder</i>	40
<i>Utfodring</i>	40
<i>Djuren</i>	40

Inledning

Produktionen av ost är en komplicerad process som omfattar bland annat ystning och lagring där många faktorer inverkar, bland annat mjölkens kvalitet. Långlagrade hårdostar är kostsamma att producera då de upptar plats i lagret under lång tid, men de har också ett relativt högt försäljningsvärde. Mjölakens kvalitet påverkar ystningsegenskaperna, mognadstiden och den sensoriska kvaliteten på den färdiga osten. Även mjölkens mikrobiologiska flora har stor inverkan på nämnda egenskaper, vilket är det övergripande temat i det här examensarbetet.

Bakterierna i tankmjölken tros främst komma från mjölkmaskinen samt huden på juvret och spenarna (Machado *et al.*, 2017). Juvret kan i sin tur kontamineras av luft, vatten, liggbås / strömedel, avföring, foder, jord samt växter på betet (Machado *et al.*, 2017; Quigley *et al.*, 2013). Dessa bakterier ska avdödas vid pastörisering av mjölken. Det är dock visat att en rad bakterier endast kraftigt minskar i antal för att sedan växa till under lagring av osten och så småningom ha betydelse för resultatet. Ett viktigt exempel på en sådan grupp av bakterier är mjölksyrabakterier (Quigley *et al.*, 2013).

För att få bättre förståelse för vilka faktorer från gården och därefter som kan påverka mjölkråvarans kvalitet, har flera forskningsprojekt startat i samarbete mellan Norrmejerier och SLU. Det här examensarbetet är en del inom dessa projekt och syftar till att undersöka om, och i så fall hur, den mikrobiologiska floran i mjölken kan påverkas av det grovfoder som ges till de mjölkande korna. För att svara på det ställdes två hypotetiska frågor:

1. Vilka bakteriesläkten i tankmjölken kan ha sitt ursprung i fodret?
2. Hur kan hanteringen av grovfoder påverkar dess bakterieflora?

Litteraturstudie

Vid tillverkning av ost är bakteriefloran avgörande för ostens smakutveckling, struktur och utseende. De mjölksyrabakterier som är viktigast vid tillverkningen av ost ingår ofta i mjölkens bakterieflora. Man tror att denna flora i sin tur bland annat kan påverkas av det foder som ges till de mjölkande korna (Quigley *et al.*, 2013).

Klassificering av bakterier

Bakterier är ett av de taxonomiska rikena och kännetecknas som encelliga organismer utan cellkärna. Under bakterier finns en rad divisioner, såsom Proteobacteria och Firmicutes. Dessa kan i sin tur delas upp i klasser, ordningar, familjer, släkten och till slut arter (Artdatabanken, 2016). Bakterieceller är mindre än djur- och växtceller och kan ha olika former. Vissa är runda (kocker), andra stavformade (stavar) eller spiralformade. Kockerna kan sitta i par, kluster eller kedjor och även stavarna kan bilda kedjor (KI, 2008).

Till följd av tillgänglig teknik har man historiskt sett klassificerat bakterier efter för tiden kända kriterier. På 1870-talet klassificerades bakterier efter utseende, i början på 1900-talet började man klassificera bakterier efter deras egenskaper. Idag klassificeras de efter släktskap baserat på DNA-sekvensering. Det är dock fortfarande relevant att i vissa sammanhang dela upp bakterier utifrån deras egenskaper, till exempel när man pratar om mjölksyrabildande bakterier, sporbildande bakterier eller bakterier som växer i olika temperaturer och miljöer (Dworkin *et al.*, 2006e).

Ett vanligt sätt att klassificera bakterier efter egenskap är genom gramfärgning. Principen är att bakterierna fixeras vid ett objektglas och färgas violetta. Man tvättar sedan glaset med aceton/etanol varpå bakterierna färgas röda. De gramnegativa bakterierna har då tvättats rena från den första färgen och antar en röd färg och de grampositiva bakterierna behåller den violetta färgen. Gemensamt för de gramnegativa bakterierna är att de har en tunnare cellvägg än de grampositiva bakterierna, ca 10 nm jämfört med 20 – 80 nm. De har också ett extra yttre membran av fosfolipider, vilket de grampositiva bakterierna saknar. Vissa egenskaper kopplas till dessa skillnader i cellväggen mellan de två grupperna av bakterier. Två exempel är att grampositiva bakterier är mer känsliga mot lysozym (nedbrytande enzym som bland annat finns i saliv och tarmsekret) och att gramnegativa bakterier har värmestabila endotoxiner som frigörs då bakterien dör (KI, 2008).

Ett annat sätt att dela in bakterier är efter deras fermentationsprodukter. När det gäller mjölksyrabildande bakterier kan de delas upp i homofermentativa och heterofermentativa bakterier. De homofermentativa producerar huvudsakligen mjölksyra och de heterofermentativa producerar mjölksyra, ättiksyra och koldioxid. I bland annat ensileringsprocessen av vallfoder är detta viktigt då de homofermentativa bakterierna mer effektivt sänker pH i grönmassan (Pahlow *et al.*, 2003).

Bakteriell tillväxt

Bakterier förökar sig genom celledelning. I en ny miljö går de först igenom en anpassningsfas. Om miljön är fördelaktig med rätt temperatur, tillgång på vatten och rätt näringsämnen går de in i en logaritmisk uppförkningsfas. Vissa bakterier kan under gynnsamma förhållanden dela sig var 30e minut. Tillväxten kommer att uppnå en stationär fas, då lika många bakterier dör som nya delas. Detta kan bero på att näringsämnen eller syre förbrukats, eller på en ökad halt toxiska metaboliter producerade av bakterierna själva. Om förhållandena inte förändras minskar bakterierna så småningom i antal (KI, 2008).

Istället för att dö vid svåra förhållanden kan bakterier av släktena *Bacillus* och *Clostridium* bilda endosporer. Det gör de genom att kapsla in sin arvs massa och viktiga proteiner innanför en kraftigare cellvägg som tål värme, uttorkning och en rad för bakterien giftiga ämnen. På det viset kan sporen vila i flera årtionden i väntan på vatten och näringsämnen, varpå de kan gro och åter bli en bakterie (KI, 2008).

Bakterier i grovfoder

I ensileringsprocessen sker stora förändringar i proportion av de bakterier som fanns på den levande växten, vissa arter gynnas och andra missgynnas av den anaeroba miljön (Pahlow *et al.*, 2003). För att spåra ursprunget till de bakterier som finns i mjölken, och som kan ha inverkan på ystningsprocessen, är det därför intressant att veta vilka som kan finnas på den levande växten, i jorden runt växterna och vad som sedan händer vid ensilering.

Bakterier på den levande växten

På växter utgör bladen den största ytan och det tros leva $10^6 - 10^7$ bakterier per cm^2 (Vorholt, 2012). För bakterierna är bladet ett kortlivat ekosystem med karga förhållanden som skyddas av ett vaxlager som begränsar närings- och vattentillgång samt då bakterierna ständigt utsätts för UV-strålning. Detta ger en ojämn fördelning och tillväxt av bakterier över växtens yta. Därför bildas aggregat av minst 1000 bakterier som bland annat kan befinna sig i kopplingarna mellan yttre lagret av växtens celler och andra ojämnheter (Vorholt, 2012).

I sin review-artikel menar Vorholt (2012) att det finns stora likheter i vilka bakteriesläkten som koloniserar växterna, oavsett geografiskt läge. Samma släkten av bakterier återkommer men i olika proportion. Två närliggande växter kan ha stora skillnader i sin mikrobiota och man har kunnat konstatera att skillnaden är större mellan växtarter än inom en växtart.

I Tabell 1 ses en jämförelse gjord av Knief *et al.* (2011). De har provtagit odlad ris (*Oryza sativa*) i Filippinerna och jämfört mikrobiotan i dessa prover mot mikrobiotan i fältodlad vitklöver (*Trifolium repens*), sojaböna (*Glycine max*) och vildväxande backtrav (*Arabidopsis thaliana*), vilka hade provtagits av Delmotte *et al.* (2009) i en schweizisk studie. De såg att divisionerna Proteobacteria, Actinobacteria och Bacteroidetes dominerade hos alla fyra växtarter, men att de förekom i olika förhållanden. I Tabell 1 redovisas de bakterier som återfanns i högst proportion ($\geq 1\%$) på de fyra växtarterna. På vitklöver och sojaböna utgjorde Proteobacteria 81 % av mikrobiotan. Backtrav och ris hade runt 45 % Proteobacteria och en högre mängd Actinobacteria. De bakterier som fanns i störst andel i de schweiziska proven var *Methylobacterium*, *Pseudomonas* och *Sphingomonas*. De som fanns i högst proportion i de filippinska proven var *Agrobacterium*, *Methylobacterium* och *Mycobacterium*.

Bland de bakterier som nämns i Tabell 1 finns kända växtpatogener inom släktena *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* och *Xantomonas*. Av dessa är *Agrobacterium* och *Pseudomonas* vanliga kring växter. Släktena *Bradyrhizobium* och *Rhizobium* är kvävefixerande och ses ofta tillsammans med baljväxter. Bakterierna inom *Erythrobacter* och *Rhodopseudomonas* är fotosyntetiserande och ses vanligtvis i marina och fuktiga miljöer. Släktena *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* och *Acinetobacter* ses i jord där de bryter ner organiskt material. *Rhodococcus* är ett mer djurassocierat släkte där bland annat *Rhodococcus coprophilus* finns i avföring från idisslare och ofta ses på beten där idisslare vistats (Dworkin *et al.* 2006a; Dworkin *et al.* 2006b; Dworkin *et al.* 2006c; Dworkin *et al.* 2006d).

Tabell 1. Släkten av bakterier som förekommer i Schweiz på odlad vitklöver, sojaböna och vild backtrav samt på odlat ris i Filippinerna

Division	Släkte	Division	Släkte
Actinobakterier	<i>Arthrobacter</i>	Proteobakterier	<i>Acidovorax</i>
	<i>Clavibacter</i>		<i>Agrobacterium</i>
	<i>Leifsonia</i>		<i>Bradyrhizobium</i>
	<i>Mycobacterium</i>		<i>Burkholderia</i>
	<i>Nakumurella</i>		<i>Caulobacter</i>
	<i>Nocartioides</i>		<i>Erythrobacter</i>
	<i>Streptomyces</i>		<i>Methylobacterium</i>
	<i>Rhodococcus</i>		<i>Novospingobium</i>
Proteobakterier	<i>Sinorhizobium</i>		<i>Rhizobium</i>
	<i>Sphingobium</i>		<i>Rhodopseudomonas</i>
	<i>Sphingomonas</i>	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>
	<i>Sphingopyxis</i>		<i>Chitinophaga</i>
	<i>Acinetobacter</i>		<i>Cytophaga</i>
	<i>Pantoea</i>		<i>Dyadobacter</i>
	<i>Pseudomonas</i>		<i>Flavobacterium</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>		<i>Pedobacter</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Spirosoma</i>		

Källa: Delmotte *et al.* (2009); Knief *et al.* (2011)

Hur dessa bakterier kommer till växterna är inte känt, men bakteriefloras sammansättning är liknande från år till år vilket indikerar att en lokal bakterieflora etableras. Skillnader mellan växternas bakterieflora i ett geografiskt område tros bero på att växterna själva påverkar vilka bakteriearter som koloniserar dem, bland annat genom att skapa olika kemiska förhållanden på bladen eller via hormonell utsöndring (Vorholt, 2012).

I jorden kring plantorna finns en rad för växterna tillväxtfrämjande jordbakterier vilka är viktiga inom jordbruket. Bakterier som finns kring växternas rötter tillhör exempelvis släktena *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Vibrio* och *Rhizobium* (Bashan & de-Bashan, 2005).

På den levande växten finns släkten av bakterier som är avgörande för ensileringsprocessen; mjölksyrabildande bakterier och enterobakterier. De förekommer på delar som i mindre grad exponeras av UV-strålning, under blad och lågt ner på växten, och i låg proportion, <1 % av mikrobiotan. Dessa tros hjälpa växterna genom att producera syror och på så vis inhibera patogener (Daeschel *et al.*, 1987).

I Tabell 2 ses en lista över mjölksyrabildande bakterier som isolerats från både växter och ensilage. Arter av mjölksyrabildande bakterier som ofta isoleras från växter ses som fetmarkerade och de som är av vikt i ystningsprocessen har markerats med stjärna. Av de stjärnmärkta är *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* och *Lactobacillus delbrückii* vanlig i starterkulturer och övriga stjärnmärkade bakterier är kända non-starter LAB (lactic acid bacteria) (se mer under Hårdost – viktiga bakterier) (Quigley *et al.*, 2013).

Tabell 2. Mjölksyrabakterier isolerade från levande växter och/eller ensilage med de vanligast förekommande bakterierna fetmarkerade

Släkte	Art	Släkte	Art	
Lactobacillus	La. arabinosus	Lactobacillus	<i>La. pentosus</i> *	
	<i>La. acidophilus</i> *		La. plantarum *	
	<i>La. brevis</i> *		<i>La. reuteri</i> *	
	La. buchneri *		<i>La. salivarius</i>	
	La. casei *		<i>La. viridescens</i>	
	<i>La. collinoides</i>		Pediococcus	Pc. acidilactici
	<i>La. confusus</i>			<i>Pc. damnosus</i>
	<i>La. coryniformis</i>			<i>Pc. inopinatus</i>
	<i>La. delbrüeckii</i> *			Pc. pentosaceus
	<i>La. divergens</i>			<i>Pc. parvulus</i>
	La. fermentum *		Streptococcus	<i>Sc. bovis</i>
	<i>La. fructosus</i>			Ec. faecalis
	<i>La. graminis</i>		Enterococcus	Ec. faecium
	<i>La. helveticus</i> *			Leuconostoc
<i>La. homohiochii</i>	<i>Le. oenos</i>			
<i>La. jensenii</i>	<i>Le. paramesenteroides</i>			
<i>La. paracasei</i>	Lactococcus	Lc. lactis *		

De bakterier som förekommer i ost är markerade med *. Icke fetmarkerade hämtade från Pahlow *et al.* (2003). Fetmarkerade hämtade från Daeschel *et al.* (1987). Stjärnmärkta hämtade från Quigley *et al.* (2013).

Hur påverkar ensileringen bakterierna?

I ensileringsprocessen eftersträvas en snabb uppförkningsfas av mjölksyrabildande bakterier. Detta uppnås genom att skapa en syrefri miljö som gynnar dessa bakterier vilka fermenterar glukos till främst mjölksyra men också ättiksyra. Effekten blir en pH-sänkning i grönmassan som inhiberar tillväxt av oönskade bakterier (Pahlow *et al.*, 2003).

Under de första timmarna av ensileringsprocessen förbrukas syret i grönmassan av mikrober och växtdelarnas respiration. Vartefter syrehalten sjunker avstannar aktiviteten hos de aeroba mikroberna varpå mjölksyrabakterierna går in i en uppförkningsfas och deras metaboliter sänker pH i grönmassan (Pahlow *et al.*, 2003).

Även enterobakterier växer till när syrehalten sjunker under ensileringsprocessen och kommer följaktligen att konkurrera med mjölksyrabakterierna om tillgänglig glukos (Heron *et al.*, 1993). I en engelsk studie undersöktes vilka arter av enterobakterier som växer till under ensileringsprocessen och när detta sker. De såg att *Erwinia herbicola* och *Rahnella aquitilis* dominerade de första två dagarna varpå *Hafnia alvei* och *Escherichia coli* tog över. Om pH i ensilaget sjönk snabbt kunde även *Serratia fonticola* växa till. Dessa bakterier konkurreras normalt ut inom 10 dagar, vilket är viktigt då de bildar ättiksyra som ger otillräcklig sänkning av pH i grönmassan (Heron *et al.*, 1993).

Vanligtvis initieras ensileringsprocessen av *Enterococcus faecalis* och *Leuconostoc mesenteroides*. Efter det tar *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* och *Lactobacillus buchneri* över, vilka tål ett lägre pH (Daeschel *et al.*, 1987). Den stationära fasen uppnås vanligtvis efter en vecka till en månad då de mjölksyrabildande bakterierna uppnått ett antal på omkring 10^{10} cfu (colony forming units) per gram ensilage. Antalet mjölksyrabakterier

kommer sedan att minska till ca 10^7 cfu per gram ensilage till följd av lågt pH och brist på glukos (Pahlow *et al.*, 2003).

Ensileringsmedel

Ensileringsmedel används för att uppnå en snabb och effektiv ensileringsprocess och få ett lagringsstabilt foder. I dagsläget finns tre typer av ensileringsmedel; syrabaserade medel, kemiska medel och bakteriella tillsatsmedel. De bakteriella tillsatsmedlen kan innehålla både heterofermentativa och homofermentativa mjölksyrabakterier. Vanliga homofermentativa är *La. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* och *Enterococcus faecium* och vanliga heterofermentativa är *Lactobacillus rhamnosus* och *La. buchneri* (Sundberg *et al.*, 2003; Oliviera *et al.*, 2017).

I en metaanalys av Oliviera *et al.* (2017) sammanställdes studier där tillsatsmedel innehållande homo- och heterofermentativa mjölksyrabakterier använts för att undersöka påverkan på ensilagens kvalitet. Metaanalysen innefattade 130 artiklar från 1996 och framåt och rörde en mängd grödor, såsom lusern, övriga baljväxter, majs och gräsblandningar. De bakterier som studerats var *La. plantarum*, *Pc. pentosaceus*, *Ec. faecium*, *La. rhamnosus* eller en mix av mjölksyrabakterier. Vid jämförelse mellan att ha tillsatt bakteriellt ensileringsmedel eller ej i ensilage sågs ingen generell skillnad i mängden mjölksyrabakterier i det färdiga ensilaget. Däremot sågs effekter när en uppdelning gjordes på typ av gröda eller tillsatt bakterieart. Ensilerat vallgräs som behandlats med bakteriell tillsats innehöll mer mjölksyrabakterier än en kontroll som inte behandlats, + 0,49 cfu/g på en logaritmisk skala. Ingen effekt sågs i ensilage med hög andel baljväxter. Tillsats av arterna *La. plantarum* och *Pc. pentosaceus* gav en signifikant minskad mängd mjölksyrabakterier jämfört med obehandlad kontroll, - 0,28 cfu/g respektive - 0,58 cfu/g på en logaritmisk skala. Tillsats av *Ec. faecium* eller en mix av mjölksyrabakterier gav mer mjölksyrabakterier i ensilaget jämfört med kontroll, + 0,55 cfu/g på en logaritmisk skala (Oliviera *et al.*, 2017).

I syrabaserade tillsatsmedel är myrsyra och propionsyra vanliga (O'Kiely *et al.*, 2009). Myrsyra används för att förhindra tillväxt av klostridier och förbättra den aeroba stabiliteten. En hög dos av myrsyra kan hämma tillväxt av mjölksyrabakterier. Dock påverkas de oönskade mikroberna mer än de syratåliga mjölksyrabakterierna vilket tar bort konkurrensen och hämningen kan ses som försumbar. Propionsyra används ofta till spannmål och till ensilage med hög torrsustanshalt för att förhindra tillväxt av mögel och jäst. Vid utfodring utsätts ensilaget för syre och blir känsligt för mögeltillväxt, vilket till viss del kan undvikas med tillsats av propionsyra vid inläggningen (O'Kiely *et al.*, 2009).

Kemiskt baserade tillsatsmedel består vanligtvis av kaliumsorbat, natriumbensoat och/eller natriumnitrit. Dessa är konserveringsmedel som ursprungligen är avsedda för livsmedelsproduktion. De hämmar tillväxt av jäst, mögel och bakterier, natriumnitrit hämmar främst tillväxt av klostridier (O'Kiley, 2009).

Effekt av ensileringsmetod

Få studier har publicerade rörande hur vallensilagens mikrobiota påverkas av ensileringsmetod och de som finns fokuserar på oönskade mikrober. Vissa generella skillnader i mikrobiota mellan ensilagebalar och plansilo/limpa/korv kan ändå ses. Ensilagebalar anses ha större risk för skador på plasten då de har stor kontaktyta i förhållande till volym. Dessa skador ger en lokal påverkan på mikrobiotan, vilket ses som ytliga fläckar av jäst/mögel. Jäst anses vara det som initialt växer till, följt av mögel (Sundberg *et al.*, 2003). På dessa fläckar finns risk för tillväxt av *Bacillus* och *Clostridium* samt ett antal sjukdomsframkallande bakterier. Å andra sidan finns en risk vid inläggning i plansilos om denna pågår länge. När silon ligger öppen

förbrukar enterobakterierna tillgänglig glukos i grönmassan, vilket senare missgynnar mjölksyraproduktionen och kan leda till otillräcklig pH-sänkning (Pahlow *et al.*, 2003). Enterobakterierna bryter dessutom ner nitrat som senare i ensileringsprocessen är en viktig inhibitor av klostridietillväxt (Heron *et al.*, 1993). Enligt Sundberg *et al.* (2012) ses en negativ effekt på ensileringsförloppet redan vid 5 timmars inläggningsuppehåll.

Även torrsiloensilage riskerar tillväxt av både jäst och mögel om inte fodret håller rätt torrsubstanshalt. I en torrsilo packas fodret av sin egen vikt, vilket innebär att den översta delen bör hålla högst 30 % ts för att ha tillräcklig tyngd. Om ett alltför torrt foder läggs in blir packningen otillräcklig, med inblandning av syre som följd. Både jäst och mögel är okänsliga för lågt pH och kan metabolisera både glukos och mjölksyra. Jäst klarar av att leva både med och utan tillgång på syre, men klarar inte av att bryta ner mjölksyra i en syrefattig miljö. Mögel däremot kräver syre för reproduktion (Sundberg *et al.*, 2003).

Effekt av torrsubstans

Torrsubstanshalten kan påverka den mikrobiologiska floran i ensilaget. Enligt Sundberg *et al.* (2003) är ett ensilage med hög torrsubstanshalt (över 35 %) mindre känsligt för bakteriell tillväxt. De mjölksyrabildande bakterierna är mindre känsliga för högre torrsubstanshalt jämfört med många andra bakterier, men när halten överstiger 40 – 50 % kommer även mjölksyraproduktionen att begränsas i fodret. Andra bakterier, till exempel klostridier, hämmas av det torra fodret, men jäst och mögel kan växa till vid skada på plasten. Lägre torrsubstanshalt än 30 % gör fodret mer känsligt för tillväxt av klostridier och enterobakterier.

I en japansk studie av Parvin & Nishino (2009) ensilerades en typ av vipphirs (*Panicum maximum*) vid två olika torrsubstanshalter, ett blötare på 28,6 % och ett torrare på 44,3 % och man gjorde provtagningar efter 15, 30, 90 och 180 dagars ensilering. Arterna *Lc. lactis* och *La. brevis* förekom i hög proportion under hela ensileringsprocessen vid båda torrsubstanshalterna. Arten *La. plantarum* var aktiv under hela processen i det torrare ensilaget, men kunde nästan inte detekteras alls i det blötare ensilaget. *Lactobacillus pentosus* tillväxte från dag 30 i det torrare ensilaget och från dag 180 i det blötare ensilaget.

Mjölakens bakteriologiska sammansättning

Mjölk erbjuder ett brett sortiment av näringsämnen i form av fett, proteiner, kolhydrater samt vitaminer och mineraler. Mjölk håller också en hög vattenaktivitet och neutralt pH, vilket gör den till en ideal tillväxtplats för mikrober (Quigley *et al.*, 2013).

Vanligaste bakterierna

De vanligaste bakterierna i komjölk är mjölksyrabildande bakterier. De släkten som förekommer oftast är *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* och *Enterococcus*. Förutom mjölksyrabildande bakterier är släktena *Pseudomonas* och *Acinetobacter* vanliga i mjölk (Quigley *et al.*, 2013).

För att kartlägga de vanligaste bakterierna i mjölk utförde Vacheyrou *et al.* (2011) en studie på 16 franska gårdar. Prover av tankmjölk odlades på agarplattor. Då specifika medium användes kan ett begränsat antal bakterier odlas fram, metoden tillåter även att endast de bakterier som finns i störst antal identifieras. Både uppbundna och lösgående system fanns representerade bland gårdarna i studien. De vanligast förekommande bakterierna var av divisionerna Actinobacteria, Firmicutes och Proteobacteria. De identifierade släktena inom dessa divisioner presenteras i Tabell 3.

Tabell 3. Släkten av bakterier identifierade i tankmjölk från 16 franska gårdar

Division	Släkte	Division	Släkte
Actinobacteria	<i>Brachybacterium</i>	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Corynebacterium</i>		<i>Streptococcus</i>
	<i>Dermacoccus</i>	Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>
	<i>Kocuria</i>		<i>Enterobacter</i>
	<i>Leucobacter</i>		<i>Escherichia</i>
	<i>Microbacterium</i>		<i>Ochtobacterium</i>
	<i>Pseudoclavibacter</i>		<i>Pantoea</i>
Firmicutes	<i>Aerococcus</i>		<i>Paracoccus</i>
	<i>Bacillus</i>		<i>Pseudomonas</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>Psychrobacter</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Sphingomonas</i>	
	<i>Lactococcus</i>		

Källa: Vacheyrou *et al.* (2011)

I en annan studie kartlades bakterierna i silomjolk på ett danskt mejeri i syfte att följa bakterierna genom mognaden av ost gjord på opastöriserad mjölk (Masoud *et al.* 2011). Genom så kallad PCR-amplifiering (Polymerase Chain Reaction) och sekvensering av 16S rRNA genen hos bakterierna identifierades totalt 211 bakteriearter. Av dessa redovisades de 47 arter som fanns i en proportion motsvarande 0,1 % eller högre. De två arter som fanns i högst proportion var *Streptococcus thermophilus* och *Lc. lactis*, vilka fanns i en genomsnittlig proportion på ca 45 % respektive 21 %. I Tabell 4 redovisas de arter som fanns i en proportion på >0,2 % i den provtagna silomjölken.

Tabell 4. Bakteriearter i proportion över 0,2 %, förekommande i dansk silomjolk på mejeri

Division	Släkte	Division	Släkte	
Firmicutes	<i>Aerococcus sp. *</i>	Proteo- bacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Aeromonas popoffii</i>	
	<i>Facklamia tabacinasalis</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>		<i>Escherichia coli *</i>	
	<i>Lactobacillus casei *</i>		<i>Marinomonas *</i>	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Methylobacterium extorquens</i>	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Methylobacterium sp. *</i>	
	<i>Lactobacillus rhamnosus *</i>		<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	
	<i>Lactobacillus sakei</i>		<i>Pseudoalteromonas</i>	
	<i>Lactococcus lactis **</i>		<i>agarivorans</i>	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Pseudomonas gessardii *</i>	
	<i>Staphylococcus sparophyticus *</i>		<i>Pseudomonas sp. *</i>	
	<i>Staphylococcus succinus *</i>		Actino- bacteria	<i>Actinomyces radidentis</i>
	<i>Streptococcus thermophilus **</i>			<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
<i>Weisella hellenica</i>	<i>Bifidobacterium sp. *</i>			
Proteo- bacteria	<i>Acinetobacter sp. *</i>	<i>Brevibacterium linens *</i>		
	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Corynebacterium casei *</i>		
		<i>Rothia mucilaginoso *</i>		

Källa: Masoud *et al.* (2011).

** - Proportion på över 6 %.

* - Proportion på 1 – 6 %.

Bra och dåliga bakterier

Mjölksyrabildande bakterier tros vara hälsosamma för människor genom att bland annat stärka vårt immunförsvar (Hibberd *et al.*, 2017). I forskning på tjocktarmscancer har man sett att patienter som givits bakterierna *Bifidobacterium lactis* och *Lactobacillus acidophilus* under 28 dagar uppvisar förändrad mikrobiota på tarmslemhinnan och i avföringen. Bland annat minskade mängden fusobakterier som kopplats till ökad tillväxt av tumörer, samtidigt som mängden smörsyrabildande bakterier ökade, vilka är viktiga för uppbyggnaden av tarmslemhinnan (Hibberd *et al.*, 2017).

Mjölken kan via fodret kontamineras av både patogena och produktförstörande bakterier. Vid syrepåverkan av ensilage, till exempel vid skada på siloplast, finns risk för tillväxt av exempelvis *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* och *Listeria monocytogenes*. Dessa är sjukdomsframkallande både för djur och människor och främst *L. monocytogenes* anser man kunna spridas från foder till mjölk (Pahlow *et al.*, 2003).

Mjölk kan även kontamineras av endosporer från bakteriearterna *Clostridium tyrobutyricum* och *Bacillus cereus*. De tillhör de två sporbildande släktena *Bacilli* och *Clostridia* och kan växa till i ensilage vid förhöjt pH. Vid vanlig pastörisering dör bakterien, men sporerne förblir intakta och kan gro vid senare tillfälle. *C. tyrobutyricum* är känd för att kunna gro i hårdostar och ge gasutveckling och starka smakfel. *B. cereus* kan gro och växa i kylskåpslagrad mjölk och orsaka koagulering och smakfel (Pahlow *et al.*, 2003).

Varifrån kommer bakterierna?

I ett franskt försök av Monsallier *et al.* (2012) undersöktes hur såväl inhysning som individuella kors egenskaper påverkade vilka bakterier som återfanns på juvret, dels före rengöring i samband med mjölkning, dels under själva mjölkningen. De såg att en god juverhygien i samband med mjölkningen minskar mängden bakterier på juvret då bakterier inte hinner återkolonisera juvret mellan mjölkningarna. De fann koliforma bakterier på spenarna hos kor där vissa moment i juverhygien sänkades, såsom tvätt före eller spray efter mjölkning. Även *Lactobacillus* och *Enterococcus* fanns i högre grad på kor på gårdar med färre hygienåtgärder kring mjölkning. Fler *Lactobacillus* och *Enterococcus* sågs hos äldre kor samt kor med långa och tjocka spenar. En högre mängd *Lactobacillus* identifierades på juvret på de gårdar som utfodrade med ensilage jämfört med de som utfodrade med hö.

I studien av Vacheyrou *et al.* (2011) togs prover på tankmjölk från 16 gårdar tillsammans med prover på luft i stall, luft i mjölkgrup (på de 9 gårdar som mjölkade i grop), hö som fodrades till mjölkande kor, damm i stalluften och på spenarna efter förmjölkning gjord av lantbrukaren. Identifierade släkten av bakterier i mjölk och i omgivningsfaktorer redovisas i Tabell 5.

Tabell 5. Släkten av bakterier funna i mjölk och var de återfunnits i omgivningen

Mjölk	Luft i stall	Luft mjölktrum	Damm	Hö	Spenar
<i>Aerococcus</i>	X	X	X		X
<i>Bacillus</i>	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus</i>	X	X	X	X	X
<i>Acinetobacter</i>	X			X	X
<i>Enterobacter</i>	X		X	X	
<i>Pantoea</i>	X	X	X	X	X
<i>Pseudomonas</i>			X	X	
<i>Psychrobacter</i>	X	X	X	X	
<i>Ochrobacterium</i>			X		
<i>Sphingomonas</i>			X		
<i>Brachybacterium</i>	X	X			
<i>Corynebacterium</i>	X	X	X		X
<i>Kocuria</i>	X			X	X
<i>Microbacterium</i>	X	X	X	X	
<i>Pseudoclavibacter</i>	X			X	

Källa: Vacheyrou *et al.* (2011).

Släkten tillhörande divisionen Firmicutes ses i det blåa fältet, Proteobacteria ses i det rosa fältet och Actinobacteria i det gröna fältet.

Vacheyrou *et al.* (2011) fann släktet *Lactobacillus* i mjölk, men inte i några av de omgivningsfaktorer som undersöktes. Troligen på grund av att de fanns i för litet antal och därför konkurrerades ut på agarplattorna. Författarna ansåg att vissa arter inom släktet *Lactobacillus* är intressanta ur ystningssynpunkt och identifierade därför dessa via PCR. I mjölken fann de *La. amylovorus*, *La. curvatus*, *La. delbrueckii ssp. lactis*, *La. paracasei*, *La. paraplantarum*, *La. plantarum* och *La. rhamnosus*. Ingen av dessa arter kunde identifieras i damm eller luft, men arterna *La. curvatus*, *La. paracasei*, *La. paraplantarum* och *La. plantarum* fanns på spenarna och i hö. Arterna *La. amylovorus*, *La. delbrueckii spp. lactis* och *La. rhamnosus* kunde inte identifieras i någon av de undersökta omgivningsfaktorerna.

Bete

Tillgången till bete har visat sig påverka mjölkens mikrobiella sammansättning. Hagi *et al.* (2010) studerade den mikrobiella floran i mjölken från kor som endast gick inomhus och observerade hur den förändrades när de fick tillgång till antingen fyra eller sju timmars dagligt bete. Bakteriesläktet *Lactobacillus* fanns i högst proportion både under stallperioden och vid betestillgång. Redan efter åtta dagars bete uppmättes en procentuell ökning av andelen *Staphylococcus* i mjölken, vilket berodde på att det totala antalet bakterier minskade samtidigt som antalet *Staphylococcus* var konstant. Det sågs ingen skillnad i celltal jämfört med stallperioden, vilket tyder på att de arter av *Staphylococcus* som förekom i mjölken inte var mastitrelaterade. Antalet timmar på bete per dag påverkade inte mjölkens mikrobiota.

Frétin *et al.* (2018) studerade mikrobiotan på spenar, i mjölk och i ost (gjord på opastöriserad mjölk) från betande kor i Frankrike. Prover på spenar och mjölk, samt vidare på osten, gjordes i juli och september på kor uppdelade i två grupper. Ena gruppen bestod av 24 kor på 60 ha stort extensivt bete med en rik botanisk flora, 86 olika arter, vilket enbart gödslades med organiskt kväve. Dessa kor gavs inget kraftfoder. Den andra gruppen bestod av 24 kor på 30 ha stort semi-extensivt bete med en mindre rik botanisk flora, 36 olika arter, vilket gödslades

med både organiskt kväve och mineralgödsel. Dessa kor gavs även 4 kg pelleterat spannmål per ko och dag. Resultaten från studien visade att mikrobiotan på spenarna skiljde sig åt, både beroende på månad för provtagning och betesstrategi. Skillnaden i mikrobiota var tydligast på spenarna, men sågs även i mjölken och sedan i osten. Familjen *Lachnospiraceae* fanns i större proportion i mjölken från det extensiva betet än från det semi-extensiva. Skillnader sågs också i ostens mikrobiota där den extensiva gruppen hade mer *Lactobacillus* och mindre *Lactococcus* än den semi-extensiva. Arter från släktena *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Macroccoccus*, *Staphylococcus* och *Streptococcus* fanns både på spenar, i mjölk och i ost. Inga skillnader sågs hos dessa släkten beroende på bete eller årstid i mjölk och ost.

Hårdost – viktiga bakterier

Traditionellt sett har långlagrad ost gjorts på obehandlad mjölk genom spontan fermentering av ostmassan (Monsallier *et al.*, 2012). Vanligare idag är att göra ost på pastöriserad mjölk och tillsätta en starterkultur bestående av utvalda bakterier. Bakterierna i starterkulturen ger osten dess smak och konsistens och är avgörande för den långlagrade ostens kvalitet.

Vid ystning av hårdost tillsätts först starterkulturen till mjölken i syfte att bland annat sänka pH genom att bakterierna fermenterar laktos till mjölksyra. Därefter tillsätts löpe vilket gör att mjölkproteiner koagulerar tillsammans med det fett och vatten dessa proteiner binder varpå en ostmassa bildas. Därefter avlägsnas vasslen, och med den de vassleproteiner som inte koagulerat och ostmassan pressas till önskad form och storlek. Efter det saltas osten i saltbad och läggs sedan på lagring för att mogna. Under lagringen fortsätter fermenteringen av laktos till mjölksyra, vatten/alkohol och koldioxid. Det sistnämnda ger karakteristiska bubblor i olika ostsorter. Mjölkfetter bryts ned till fria fettsyror och kan bland annat fermenteras till estrar vilka är viktiga för smakutvecklingen. Proteiner bryts ner och ger såväl smak som önskad textur (Legg *et al.*, 2017; McSweeney, 2017).

Bakterier viktiga för ostens mognad

Quigley *et al.* (2013) nämner några vanliga släkten av bakterier som är viktiga för ostens mognad; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* och *Streptococcus*. Två arter som ofta används i starterkulturer är *Lc. lactis* och *Sc thermophilus*, deras främsta uppgift är att sänka pH i ostmassan. *Lc. lactis* är även proteolytisk och bryter ner aminosyror till alkoholer, ketoner och aldehyder vilka är viktiga för ostens smak. *Sc. thermophilus* avger metaboliter som är viktiga för smakutvecklingen och producerar exopolysaccarider som ger osten en viskös textur.

Inom de två släktena *Lactococcus* och *Streptococcus* finns också andra bakterier som kan ha betydelse vid ystning. Av släktet *Lactococcus* kan arterna *Lc. raffinolactis*, *Lc. garvieae* och *Lc. piscium* ha viss roll vid pH-sänkning och smakutveckling i ostar gjorda på opastöriserad mjölk. Dessa används vanligtvis inte i starterkulturer. I släktet *Streptococcus* finns arterna *Sc. uberis*, *Sc. agalactiae* och *Sc. dysagalactiae* som är mastitassocierade och därför oönskade. Den sistnämnda spjälkar mjölkproteiner innan mjölkning och ger ostmassan försämrade koaguleringsgenskaper (Quigley *et al.*, 2013).

Inom släktet *Propionibacterium* finns fyra arter som associeras med mjölk och ost; *Pb. freudenreichii*, *Pb. acidipropionici*, *Pb. jensenii* och *Pb. thoenii*. Den förstnämnda används i starterkulturer i vissa schweiziska ostar. Släktet *Leuconostoc* associeras främst med växter, men arterna *Le. mesenteroides* och *Le. pseudomesenteroides* finns också i mjölk (Quigley *et al.*, 2013).

Lactobacillus är ett stort släkte på 174 arter vilka spelar en viktig roll i tillverkning av hårdostar. Bland annat *La. helveticus* minskar bitterhet och ökar smaken hos hårdostar, den är proteolytisk och frigör även fettsyror via lipolys vilket bidrar till smakutvecklingen. *La. delbrueckii* finns i två viktiga underarter, ssp. *bulgaricus* och ssp. *lactis* vilka är starkt proteolytiska och har påvisats i flera ursprungsskyddade ostar. Utöver dessa finns en rad laktobaciller vilka ingår i gruppen non-starter LAB och har betydelse för smak- och strukturutveckling hos osten. De överlever pastöriseringen och är anpassade för klimatet i osten; låg mängd näringsämnen, lågt pH och låg vattenaktivitet och växer därför till under lagringstiden. Dessa bakterier är: *La. acidophilus*, *La. brevis*, *La. buchneri*, *La. casei*, *La. crispatus*, *La. curvatus*, *La. fermentum*, *La. gasseri*, *La. johnsonii*, *La. paracasei*, *La. pentosus*, *La. plantarum*, *La. reuteri*, *La. rhamnosus* och *La. sakei*. Non-starter LAB finns även inom släktena *Leuconostoc* och *Carnobacteria* (Quigley et al., 2013).

Gramnegativa bakterier

Generellt ses gramnegativa bakterier som negativa för ystningsprocessen. För att få en bredare bild av vilka som förekommer i ostar gjordes en kartläggning av gramnegativa bakterier i ett flertal franska ostsorster. Där fann man att nära hälften av dem tillhörde familjen Enterobacteriaceae. Ostarnas yta dominerades av släktena *Halomonas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* och *Serratia*. Inuti ostarna fann man *Cryseobacterium*, *Enterobacter* och *Stenotrophomonas* vilka inte anses ha någon stor inverkan på konsistens och smakutveckling. Tre förekommande arter av bakterier som däremot tros påverka smakprofilen var *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris* och *Psychrobacter celer* (Quigley et al., 2013).

Bakterier inom släktet *Pseudomonas* är extra intressanta i mjölken då de växer vid låga temperaturer under mjölkens lagring. De bildar enzymer som bryter ner proteiner och lipider. Bakterierna dör vid pastörisering men enzymerna påverkas inte utan fortsätter att vara verksamma även efter pastörisering. Vanliga arter av *Pseudomonas* är *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* och *P. lundensis* (LRF, 2014).

Material och metod

Detta arbete är en del i ett större projekt. Vid huvudprojektets början rekryterades 43 av Norrmejeriers mjölkleverantörer, varav fem ekologiskt certifierade, till studien.

Huvudprojektet är uppdelat i två etapper där man i Etapp 1 provtagit och analyserat mjölken från alla gårdar under ett års tid. Man har även samlat in data om rutiner på gårdarna och om det foder som givits till de mjölkande korna, såsom arter, skördeteknik och lagringsmetod. I Etapp 2 har tre mindre grupper inom dessa 43 gårdar identifierats, en kontrollgrupp som ska representera ett medel av alla gårdar avseende mjölkens bakterieflora, samt två grupper av gårdar där bland annat mikrobiotan i tankmjölken skiljer sig åt. Syftet var att göra ystningar från dessa grupper vid tre olika tidpunkter för att se om ystningsresultaten påverkas av mjölkens bakterieflora och processegenskaper innan pastörisering. Vid tillfällena för ystningarna samlas också grovfoderprover in i ett försök att med hjälp av mikrobiotan i grovfodret förklara en del av de skillnader som ses i mikrobiotan i mjölken. I tabell 6 ses vilka delar av huvudprojektet som ingår eller inte ingår i examensarbetet. Inom Etapp 2 har fler prover tagits än de som står med i tabellen men de är inte relevanta för examensarbetet.

Tabell 6. Åtgärder som utförts inom huvudprojektet och vilka som utförts, alternativt bearbetats, inom examensarbetet

Huvudprojektet		Examensarbete
Etapp 1	Gårdsbesök samtliga gårdar	Nej
	Analys mjölk: koagulering, fria fettsyror mm.	Nej
	Analys mjölk: mikrobiota	Bearbetat analysresultat från 8 gårdar provtagna sommaren 2016, samt resultat från alla gårdar februari 2016
	Sammanställning data, kokkontrollen	Ja
	Fermentationskvalitet grovfoder	Nej
	Mikrobiota från 8 foderprover	Bearbetat resultat
Etapp 2	Telefonintervju inför ystningstillfälle	Ja, 1 av 3 tillfällen
	Gårdsbesök vid ystningstillfälle	Ja, 1 av 3 tillfällen
	Hygienisk analys, grovfoder	Bearbetat resultat från 2 av 3 tillfällen
	Analys av mikrobiota i foder, mjölk och ost	Nej
	Fermentationskvalitet grovfoder	Nej
	Näringsanalys grovfoder	Nej

Merparten av Etapp 1 utfördes före examensarbetets början. För att beskriva de 43 gårdarna skickades en enkät ut vintern 2015/16, med frågor rörande foder, strö och mjölkkningsrutiner mm. Denna enkät refereras fortsatt till som ”Enkät 2016”. Kompletterande information om aktuella förhållanden samlades i samband med de båda gårdsbesöken då även grovfoder provtogs (se nedan). Dessutom togs kokkontrolldata ut för kontrollåret 2015/2016 rörande mjölkparametrar såsom fett, protein och celltal samt koparametrar såsom juverhälsoklass, ras, laktationsnummer och laktationsstadium. Av de 43 gårdarna saknades helårsmedeltal från fem gårdar. Månatliga mjölkprover togs från alla gårdar februari 2016 – februari 2017.

I Etapp 2 av projektet är syftet att göra provystningar från tre grupper av gårdar som i Etapp 1 skiljde sig ifrån varandra beroende på egenskaper i mjölken och dess bakterieflora. I Grupp A ingår tre större gårdar som en kontrollgrupp. Från och med den andra av de tre provtagningarna ingår ännu en gård i Grupp A. I Grupp B ingår nio gårdar vilka valdes ut då deras mjölk bland annat hade bättre koaguleringsegenskaper. I Grupp C ingår fem gårdar som hade större mängd mjölksyrabakterier i mjölken vilket var intressant att undersöka. Totalt ingår alltså 17 gårdar vid det första ystningstillfället och 18 gårdar vid de båda andra.

Vid tiden för provystningarna hämtas mjölk från varje grupp vid tre olika tillfällen under en veckas tid och en ystning görs på varje hämtning, vilket ger totalt nio ystningar från de tre grupperna. Detta upprepas tre gånger med första hämtningen i november 2017, andra i mars 2018 och den tredje i september 2018. I samband med dessa tre tillfällen för provystningar tas foderprov från varje gård på det grovfoder som ges till de mjölkande korna den aktuella veckan. Novemberprovtagningen 2017 skedde inom examensarbetet och tillsammans med SLU-handledare togs foderprov från de 17 gårdarna.

Kokontrollen

Inom examensarbetet beräknades koparametrar tagna från provmjölkningar i kokontrollen. Detta för att på gårdsnivå få mer kunskap om de kor som givit mjölk till tanken för varje enskilt mjölkprovstillfälle februari 2016 – februari 2017. Beräkningar gjordes av den procentuella rassammansättning, andelen förstakalvare och andelen nykalvade kor, vilket fördes in i ett större dokument där fler mjölk- och juverhälsoparametrar ingick.

För att bestämma ras användes jordbruksverkets raskoder. I sammanställningen förenklades det till viss del genom att kalla samtliga raskoder 3 (SKB), 40 (rödkulla) och 41 (fjällko) för raskod 3. En korsning av två olika raser, där båda föräldrarna är renrasiga betecknades med raskod0raskod, till exempel 102 för (SRB*SRB). I det fall en av föräldrarna är renrasig SJB, Montbeliård eller Brown Swiss, men den andra föräldern är en korsning markerades det som raskod x, till exempel 4x (SJB*korsning). En egen kolumn gjordes också för de kor som är korsade mjölkras*köttrras samt en kolumn för övriga korsningar.

Med stöd av enkätsvar och kokontrolldata har en sammanfattande beskrivning av de 43 gårdarna i Etapp 1 gjorts rörande mjölkningsrutiner, inhysning, grovfoderhantering och utfodringssystem. Vissa svar är exakta, men andra kan vara uppskattningar av lantbrukaren.

Telefonintervju

Innan den första foderprovtagningen i Etapp 2 genomfördes ingick det i examensarbetet att utforma och utföra en telefonintervju med de 17 gårdarna. Intervjun syftade till att få information om det foder som gavs till de mjölkande korna vid tillfället för foderprovtagning och mjölkhämtning november 2017. Frågor ställdes om hur fodret hanterats i samband med skörd och ensilering, vilket kraftfoder som gavs, hur utfodringssystemet såg ut på gården samt mjölkningsrutiner och något om korna. Alla intervjufrågor ses i Bilaga 1. Kompletterande frågor ställdes i samband med gårdsbesöken. Med stöd av denna information gjordes en sammanfattande beskrivning av mjölkningsrutiner, grovfoderhantering och utfodringssystem.

Provtagningar

Foder, Etapp 1 och 2

Foderprover i Etapp 1 togs vid två gårdsbesök, i februari/mars samt juni/juli 2016, av det foder som för tillfället gavs till de mjölkande korna. Åtta grovfoderprover från sommarprovtagningen på åtta gårdar sändes för DNA-sekvensering. Detta gjordes i syfte att testa och

utvärdera metoden inför den sekvensering som skulle komma att göras av samtliga foderprover tagna i samband med provystningarna inom Etapp 2. Inom examensarbetet har resultaten från dessa analyser sammanställts, liksom från mjölkprov inskickade på DNA-sekvensering från juni och juli 2016 från samma gårdar, för att se om några bakterier fanns både i foder och i mjölk. Sammanställningarna har gjorts i Excel.

De åtta grovfoderproverna delades av mikrobiologen på laboratoriet på Ultuna upp i flera delprov (upprepningar) för att höja säkerheten i analysvaren. De prov som här benämns som Foderprov 1 – Foderprov 8 representerar genomsnittliga värden av respektive delprov. För att bredare beskriva mikrobiota valdes proverna ut så att innehåll och konserveringsmetod skiljde mellan dem. Foderprov 1 togs från plansilo, andraskörd av vall med bakterietillsats. Foderprov 2 togs från rundbal, förstaskörd av vall med kentillsats. Foderprov 3 togs från hölada med löshö. Foderprov 4 togs från en hög utanför ladugården med grönmassa skördad dagen innan (förstaskörd utan ensileringsmedel). Foderprov 5 togs från rundbal öppnad dagen innan, helsädsensilage utan tillsatsmedel. Foderprov 6 togs från rundbal öppnad två dagar tidigare, sen förstaskörd av vall. Foderprov 7 togs från plansilo, andraskörd av vall utan tillsatsmedel. Foderprov 8 togs från rundbal, förstaskörd av vall utan tillsatsmedel.

Grovfoderproven från Etapp 2 tagna inom examensarbetet i november 2017 togs så nära grovfoderlagret som möjligt. Om det inte har gått att provta direkt från silo eller bal har provet tagits från fodervagn el dyl. Av de fyra gårdar som lagrade i tornsilo blåstes prover ut ur silon vid provtagning på två gårdar och på två gårdar hade lantbrukaren tagit ut proverna strax innan besöket. På de fyra gårdar som hanterade plansilo/limpa togs foderproven direkt från snittytan på silon. På de nio gårdar som hanterade ensilagebalar togs fem prov direkt från nyuppskuren bal, två prov togs från foderbord, ett prov från rivare och ett prov från bal öppnad dagen innan. Proverna togs ut med nitrilhandskar och placerades i plastpåse för att minska risken för kontamination av andra mikroorganismer än de ursprungliga. Luften pressades sedan ur påsen varpå den förslöts med tre varv knutet balsnöre. För de gårdar som använde egen/inköpt spannmål togs även ett prov av detta med nitrilhandskar och förslöts på samma sätt som grovfoderproven.

Från varje gård skulle analyser göras av ett samlat grovfoderprov. Proven bereddes så att de motsvarade den blandning som gavs till korna; om de fick en del helsädsensilage och två delar vallensilage var förhållandet i provet som skickades på analys detsamma. Alla prov hanterades hygieniskt med nitrilhandskar. Vissa prov som på grund av lång strållängd blev svåra att blanda, klipptes till kortare längder, ca 5 – 10 cm. Varje prov delades sedan in i fyra delar. Första delen skickas färsk för hygienisk analys, dvs för att bestämma mögel, jäst, enterokocker, klostridier samt mängden LAB. Resterande prover frystes ner. Andra delen har sänts för analys av näringsinnehåll, fermentationskvalitet samt mineraler och på den tredje delen ska en DNA-sekvensering göras av de bakterier som ingår. Den fjärde delen sparas som reserv på Röbbäcksdalens forskningsstation tillsammans med reservprover av varje enskild grovfoderingrediens, om det rör sig om en blandning.

Mjölk, Etapp 1

Mjölkprover hämtades från de 43 gårdarna månadsvis från februari 2016 – februari 2017. Dessa prover analyserades av Eurofins på bland annat näringsinnehåll (fett, protein och laktos), totala mängden bakterier och termoresistenta bakterier samt celltal och urea. Vidare skickades mjölkprover till Ultuna (institutionen för molekylära vetenskaper) för olika analyser, bl.a. DNA-sekvensering för att se förhållanden mellan olika familjer av bakterier.

För att ge en bild av mikrobiotan i mjölken hos de 43 gårdarna sammanställdes inom examensarbetet resultatet av DNA-sekvenseringen från mjölkprover inhämtade under februari 2016 från totalt 37 gårdar. Mjölkproverna delades upp beroende på om korna vid tillfället fått foder från plansilo, tornsilo, rundbal eller hö. Vidare räknades ett procentuellt medeltal ut av de familjer av bakterier som fanns inom dessa grupper.

Beräkningar och statistik

Vid telefonintervjuerna inför novemberbesöket 2017 inom Etapp 2 beräknades den procentuella andelen grovfoder till de mjölkande korna på var och en av de 17 gårdarna. Grovfodret är räknat som kg ts av den totala foderstaten och mängd utfodrat baseras på uppgifter från lantbrukarna. På sex gårdar hade lantbrukarna uppgifter om mängden kraftfoder korna åt, men inte mängden grovfoder. För dessa gårdar estimerades mängden grovfoder korna konsumerade vid fri giva med hjälp av fodervärderingsprogrammet Norfor, tillhandahållet av Växa Sverige. En rad parametrar lades till i programmet: lantbrukarnas uppgifter om genomsnittligt kraftfoderintag samt sort av kraftfoder, kornas ras, avkastning i ECM (energikorrigerad mjölk), andel förstakalvare, uppskattad vikt på kvigor och äldre kor utifrån ras, samt antagandet att kvigornas mjölkproduktion motsvarar 85 % av äldre kor.

Inom examensarbetet studerades resultaten av de hygieniska analyserna av grovfoder från provtagningarna i november och i mars inom Etapp 2. Detta för att undersöka inverkan av olika lagringsmetoder eller tillsatsmedel. Den statistiska modellen $y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$ användes, där μ är medelvärdet för hela provet, α_i representerar effekten av behandlingen i (till exempel bal/plansilo) och e_{ij} representerar den slumpmässiga variationen inom observationerna. Genom beräkning med hjälp av Excel avgjordes om signifikanta skillnader fanns mellan lagringsmetod och förekomst av tillsatsmedel i samband med lagring av grovfodret. I de fall signifikans förekom gjordes parvisa jämförelser, även kallat Tukey's test, för att se vilka behandlingar som skiljde sig ifrån varandra.

En statistisk analys av sammanställningen av mjölkens mikrobiota från februariprovtagningen 2016 utfördes av handledare från Norrmejerier. Beräkningarna gjordes i programmet Minitab för att se eventuella skillnader i mjölkens mikrobiota beroende på lagringsmetoden för det foder korna ätit vid tillfället.

Analyser

DNA-sekvensering foder och mjölk

Sekvensering användes för att identifiera sammansättningen av bakteriefloran i proverna. Detta gjordes genom att PCR-amplifiera 16S rRNA- genen, vilket är en gen som finns i alla bakterier och som vanligen används för taxonomisk klassificering och artbestämning av bakterier. Erhållna PCR-produkter sekvenserades med så kallad Illumina sekvensering och sekvensdata som genererades kvalitetsjusterades genom att sekvenser med låg kvalitet rensades bort. Resterande sekvenser klassificerades taxonomiskt och från varje sekvenserat prov erhöles därmed vilken bakteriell sammansättning ett prov hade. Såväl levande som försvagade och döda bakterier detekterades i analysen (Illumina 2016; Müller *et al.* 2016).

Hygieniska analyser grovfoder

Hygienisk analys av grovfoderprov från Etapp 2 utfördes vid institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU, i enlighet med Kasmaei *et al.* (2014), genom att isolera bakterier ur 50 gram foderprov. Dessa odlades på agarplattor efter tiofaldig spädningsserie av provet. Efter odling räknas antalet cfu manuellt och antalet levande bakterier per gram i det ursprungliga provet beräknades på en logaritmisk skala. För mjölksyrabakterier sattes det

lägsta detekterbara antalet till 3,7 log cfu/g prov, i enstaka fall sattes de till under 2,7 log cfu/g prov. För övriga mikrober sattes lägsta detekterbara värdet till 1,7 log cfu/g prov. Vid min bearbetning räknades dessa värden som 3,5, 2,5 respektive 1,5.

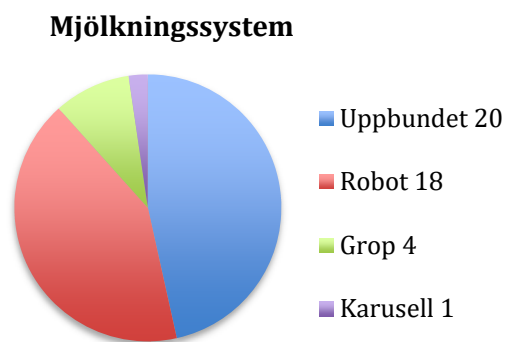
Enterobakterier och mjölksyrabildande bakterier odlades fram genom ingjutningsmetoden, vilket innebär att en definierad mängd av bakteriesuspensionen blandas med flytande odlingsmedium som sedan tillåts stelna i en petriskål. Efter att blandningen stelnat täcks det av ännu ett lager agar. Mjölksyrabakterierna odlades i två olika selektiva medier. För att odla fram mjölksyrabildande *Enterococcus* användes Slanets-Bartley (S-B) agar och för att odla fram *Lactobacillus*, *Pediococcus* och *Leuconostoc* användes Rogosa agar. Jäst, mögel och *Clostridium* odlades fram genom ytspridningsmetoden, vilket innebär att lösning från de olika spädningarna droppas på stelrad agar varpå det sprids ut i ett jämnt lager över plattan.

Resultat

Etapp 1 – Beskrivning av 43 gårdar

Av de 43 gårdarna har den minsta gården ett medelkoantal på 6,8 och den största har ett medelantal på 220 årskor. Medelvärdet för alla gårdar är 66,5 kor vilket är lägre än det nationella medelvärdet som låg på 87,9 år 2016 (Växa, 2016).

Uppbundet system och robot är de vanligaste mjölkningssystemen bland de 43 gårdarna (Figur 1). De uppbundna gårdarna har ett medelkoantal på 34 kor och de två grupper av gårdar som mjölkar i robot eller i grop har båda ett medelantal på 96 kor. Det vanligaste hos robotgårdarna är att ha bara en robot vilket ses på 14 gårdar. Två gårdar har två robotar och två gårdar har tre robotar. Antal mjölkningar per dag varierar mellan 2,3 – 3,0 på robotgårdarna. Övriga gårdar har två mjölkningar per dag, oavsett mjölkningssystem. Bland de 43 gårdarna finns en gård med karusellmjölkning, hädanefter räknas den i gruppen med gropmjölkning.



Figur 1. Mjölkningssystem hos de 43 gårdarna i Etapp 1. Källa: Enkät, (2016).

I Tabell 7 ses en jämförelse mellan de 43 gårdarna i projektet och gårdar i kokontrollen, kontrollåret 2015/2016. Celltalen för gårdarna är räknat på Norrmejeriers månatliga mätningar av tankmjölk februari 2016 – februari 2017. En viss skillnad kan ses i tabellen där gårdarna i projektet har lägre celltal än riksmedelvärdet men högre fett- och proteinhalt i mjölken. Under perioden februari 2016 – februari 2017, var avkastningen i medeltal 30,2 kg ECM/ko/dag för de mjölkande korna på de 43 gårdarna. Andelen förstakalvare var 30 % och andelen nykalvade kor var i genomsnitt 9 % av de mjölkande korna.

Tabell 7. Mjöltparametrar, uppgifter om de 43 gårdarna jämfört med rikssnitt, från kokontrollen

	Medel 43 Gårdar	Medel Kokontroll Nord	Medel Kokontroll
Fett %	4,40	4,31	4,24
Protein %	3,60	3,54	3,50
Celltal, celler/ml	173 200	173 000	212 000

Källa: Halt fett och protein på 43 gårdar från Kokontrollen (2016). Övrig statistik från Växa (2017).

I Tabell 8 ses en jämförelse av rasfördelning, räknat i medeltal per gård. De 43 gårdarna har i snitt lägre andel av raserna SLB och SRB och högre andel SKB och SJB jämfört med gårdarna i kokontrollen.

Tabell 8. Procentuell rasfördelning, uppgifter om de 43 gårdarna jämfört med rikssnitt, från kokontrollen

	Medel 43 Gårdar	Medel Kokontroll
SLB	52,4	54,8
SRB	31,5	36,6
SKB	5,4	0,4
SJB	4,3	0,8
Övrigt	6,4	7,3

Källa: Kokontrollen (2016); Växa (2017).

Mjölkningsrutiner

DeLaval är det vanligaste märket på mjölkningsanläggning och finns på 27 gårdar, varav sju robotgårdar. Näst efter det kommer Lely på elva gårdar, där alla är robot med fri kotrafik. Två mindre märken är Sac (två båsladugårdar) och Fullwood (en grop och två båsladugårdar).

På alla gårdar sker förmjolkning av antingen robot eller skötare. Lely-robotarna borstar av spenarna innan förmjolkning och borstarna desinficeras efter varje ko. DeLaval-robotarna har en tvättkopp som rengör spenarna med vatten och eventuellt medel varpå den blåser spenarna torra innan förmjolkning. Efter mjolkning doppas eller sprayas spenarna av roboten.

Utöver DeLaval-robotarna rengörs spenarna med endast vatten innan mjolkning på 10 gårdar. Utöver Lely-robotarna torkas spenarna endast torra med torrt papper på fyra gårdar. På sju gårdar rengör man med mjölksyrabaserat medel, på tre gårdar med vatten och såpa och på en gård används vatten och barnolja. Efter avslutad mjolkning används på tio gårdar varken spray eller dipp, på 21 gårdar används jodbaserat medel, på elva gårdar används medel med mjölksyra/citronsyra, på en gård örtpreparat och en gård ett medel innehållande klorhexidin.

Inhysning

I Tabell 9 redovisas inhysningsform på de 43 gårdarna, tillsammans med underlag i liggbåsen och strömaterial i liggbåsen. På en gård används fiberströ, vilket framställs genom att skilja bort och torka fiberfraktionen från kornas gödsel (Greppa, 2014).

Tabell 9. Inhysningsform, underlag i liggbås samt strömedel hos 43 gårdar

Inhysningsform	Antal	Underlag liggbås	Antal	Strömedel liggbås	Antal
Varm lösdrift	19	Gummimatta	25	Sågspån	40
Kall lösdrift	4	Fylld madrass	10	Torvströ	1
Varm och kall lösdrift	1	Betong	7	Halm	1
Båsladugård	19	Sågspånslåda	1	Fiberströ	1

Källa: Enkät (2016).

Grovfoder

Gårdarna i studien brukar i snitt 66 ha egen mark och 97 ha arrenderad mark. De flesta skördar sitt eget grovfoder med undantag för fyra gårdar vilka lejer in skörden. Liggtid för vallarna varierar mellan 3 – 6 år med 3,5 år i medelvärde och en viss inomgårdsvariation. Antalet skördar per år varierar mellan 1 – 3 skördar med ett genomsnitt på 2,2 skördar med viss inomgårdsvariation, ofta beroende på fältets avstånd till gården.

Baljväxtandelen varierar mellan gårdarna och endast tre gårdar saknar helt baljväxter i utsädet. Eko-gårdarna har 20 – 25 % klöver i utsädet medan de flesta konventionella gårdar har 10 – 15 % klöver. Två konventionella gårdar har mindre och en gård mer.

Vallensilage utfodrades som enda grovfoder på 22 gårdar. Övriga 21 gårdar hade i snitt 70 % vallensilage i grovfoderblandningen. Utöver ensilage använde fem av gårdar hösilage (definierat som ts högre än 50 %), nio gårdar använde hö, tio gårdar blandade in en liten mängd halm och tolv gårdar använde ensilage av helsäd eller grönfoder. De sistnämnda bestod av vete/ärt, vete eller korn. Helsädsensilage utfodrades som enda grovfoder på en gård.

I Tabell 10 ses den huvudsakliga ensileringsmetoden av det grovfoder som givits till de mjölkande korna vid vinter- och sommarbesöken 2016. Med finns också de tillsatsmedel som

använts, i de fall det förekommer. På tre gårdar kombineras foder från tornsilo och rundbalar till mjölkorna. På en av dessa gårdar används inget tillsatsmedel alls, på en gård används syratillsats i tornsilos och inget i rundbalarna, på den tredje gården används bakterietillsats i tornsilos och inget i rundbalarna. De tillsatsmedel som används kan variera inom gården, på två gårdar används kemiskt medel eller syra i rundbalarna, beroende på skörd.

Tabell 10. Typ av tillsatsmedel vid de olika lagringsmetoderna

	Inget	Bakterier	Syra	Kem
Bal	25	0	1	1
Tornsilo	3	1	5	2
Plansilo	0	2	6	0

Källa: Enkät (2016).

Vattenförsörjning

I Tabell 11 ses vattenförsörjningen i de olika inhysningssystemen. Naturligt nog används uteslutande vattenkoppar i båsladugårdar och i system med robotmjölkning är det vanligt att kombinera vattenkopp och vattenkar.

Tabell 11. Vattenförsörjning i de olika inhysningssystemen

	Bås	Grop	Robot
Vattenkopp	20	3	4
Vattenkar	0	1	2
Vattenkopp och vattenkar	0	1	12

Källa: Enkät (2016).

Utfodring

Ett antal utfodringsstrategier finns representerade på de 43 gårdarna vilket visas i Tabell 12. Fullfoder innebär att allt kraftfoder och grovfoder utfodras blandat. Blandfoder innebär att en del av kraftfodret eller spannmålen blandas med grovfodret och en individanpassad mängd kraftfoder ges på annat ställe. Vidare finns den lösning där grovfoder ges separat på foderbordet och allt kraftfoder individanpassas.

Tabell 12. Utfodringsystem på de 43 gårdarna

Utfodringsystem	Uppbundet	Robot	Grop
Fullfoder	1		2
Blandfoder + krf i robot		4	
Blandfoder + krf i automat		1	
Blandfoder + krf i robot och automat		2	
Grovfoder och krf separat på fb	19		
Grovfoder på fb + krf i automat			2
Grovfoder på fb + krf i grop/robot		1	1
Grovfoder på fb + krf i automat och i robot		10	

Källa: Enkät (2016).

Krf = Kraftfoder. Fb = Foderbord.

Antal grovfodergivor varierar mellan 1 – 12 per dag med ett medelvärde på 3,9 givor. Antalet kraftfodergivor per dag varierar mellan 2 – 15 och medelvärdet är 5,7 per dag. Varje utfodring av fullfoder/blandfoder har räknats som både en kraftfodergiva och en grovfodergiva. Korna antas äta åtta gånger per dag i kraftfoderautomat.

Kraftfoderförsörjning

Den vanligaste spannmålssorten är korn, vilket man på 22 gårdar använder som enda spannmålsslag. På två gårdar blandas korn och havre. Av dessa gårdar odlar man på 16 st spannmålen själv och åtta köper in. Spannmålen blandas på gården med koncentrat. Övriga 19 gårdar köper helfoder.

Mjölakens mikrobiota

För att se eventuella skillnader i mjölakens mikrobiota beroende på fodrets lagringsmetod redovisas mjölakens mikrobiota från februariprovtagningen i Tabell 13. Resultaten gäller 37 sekvenserade mjölkprov tagna februari 2016. I tabellen har de bakterier tagits med vars familj finns i en proportion på minst 1 % i minst två prov. Dessutom har familjerna Lactobacillaceae, Leuconostocaceae och Enterobacteriaceae inkluderats då de är av teknologisk relevans vid osttillverkning (Quigley *et al.*, 2013).

Tabell 13. Relativ proportion av mikrobiota i mjölkprover, uppdelat på huvudsaklig lagringsmetod av det grovfoder de mjölkande korna givits

Klass	Familj	Bal (20)	Plansilo (7)	Tornsilo (8)	Hö (2)	P- värde
Firmicutes	Aerococcaceae	6,1	8,3	6,5	9,8	>0,1
	Clostridiaceae	2,6	3,1	2,6	5,7	0,099
	Lacnospiraceae	5,3	5,5	5,8	7,5	>0,1
	Lactobacillaceae	0,6	0,3	0,9	1	>0,1
	Leuconostocaceae	0,4	0,3	0,5	0,8	>0,1
	Mogibacteriaceae	1	1	1,2	1,3	>0,1
	Peptostreptococcaceae	1,3	2	1,4	4,6	0,014
	Ruminococcaceae	12,2	13,1	14	12,2	>0,1
	Staphylococcaceae	4,2	3,3	3,4	3,3	>0,1
	Streptococcaceae	4,9	4,4	4,8	2,4	>0,1
	Turicibacteriaceae	1,2	1,6	1,3	1,8	>0,1
Actinobacteria	Corynebacteriaceae	3,9	4,6	4,9	7,6	>0,1
	Micrococcaceae	3,4	2,1	3,8	2,5	>0,1
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	2,6	2,9	2,8	2,3	>0,1
	Paraprevotellaceae	1,1	1,2	1,4	1	>0,1
	RF16	0,9	1,2	1,4	1	>0,1
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	1,9	0,8	0,1	0,5	>0,1
	Moraxellaceae	14	18,5	8,7	4,3	>0,1
	Pseudomonadaceae	10,7	3,4	7,7	6,8	>0,1

Mjölkprover tagna februari 2016 från tankmjölk på 37 gårdar. Antal prov per lagringsmetod anges inom parentes. Inkluderingskriterier: Minst 1 % i minst två prov, utöver teknologiskt relevanta bakterier.

Trots stora procentuella skillnader i mikrobiota mellan de fyra lagringsmetoderna finns få signifikanta skillnader efter statistisk analys. Detta på grund av att variationen inom respektive lagringsmetod är stor. De skillnader som går att se är att familjen Peptostreptococcaceae finns i större proportion i de två proverna från gårdar som utfodrades med hö. En tendens till skillnad ses också hos familjen Clostridiaceae där det verkar finnas högre andel i proverna från högårdar. De familjer som förekom i störst proportion i mjölken var

Ruminococcaceae och Moraxellaceae. Vidare fanns också Lacospiraceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Corynebacteriaceae och Pseudomonadaceae i en hög proportion.

Mikrobiota i foder och mjölkprov

Av de grovfoderprov som togs i juni/juli 2016 i Etapp 1 valdes åtta partier ut för DNA-sekvensering av mikrofloran. I Tabell 14 specificeras de familjer och släkten av bakterier som fanns i mjölkproven tagna samma period, och jämförs mot de som fanns i fodret. Det som redovisas är den procentuella andelen av totala antalet bakterier i varje prov. De släkten som står nämnda är de där minst 2 % funnits i minst ett prov. I de fall ett släkte funnits i både mjölk- och grovfoderprov, nämns även dessa i tabellen i de fall där minst ett prov har en högre andel än 0,5 %. Endast värden över 0,1 % visas. Posten ”Övrigt” i Tabell 14 innefattar de bakterier som förekom i för låg andel för att inkluderas i tabellen, samt de bakterier som inte sekvenserats ner till familjenivå, utan bara sekvenserats till division/ordning etc. Parti 2 innehöll en stor andel Cyanobakterier, vilka gör posten Övrigt stor.

I Tabell 14 ses vissa släkten återkomma i både mjölk och foder på samma gård. Till exempel *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, och *Pseudomonas*. Vidare uppträder en rad släkten mer oregelbundet, de finns i både foder- och mjölkprover, men inte på samma gård; exempel är *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* och *Rhodococcus*. Vissa bakterier förekom endast i mjölk, såsom *Facklamia* och vissa endast i foder, såsom *Serratia*.

De två prover som bestod av hö respektive grönmassa skiljer sig från de ensilerade proverna genom att de i det närmaste saknar mjölksyrabakterier och har betydligt större andel enterobakterier. De sticker också ut genom att ha större andel *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* och *Sphingomonas*. Grönmassaprovet sticker också ut genom att vara det enda som innehåller *Staphylococcus* och genom att ha hög andel *Arthrobacter*.

Tabell 14. Procentuell andel av bakterier i åtta grovfoderprover jämfört med andelen av bakterier i åtta mjölkproven från samma åtta gårdar, juli 2016

Familj	Släkten	M1	P1	M2	P2	M3	P3	M4	P4	M5	P5	M6	P6	M7	P7	M8	P8
			2sk, ps bakt		1sk, bal, kem		Löshö		Grönma ssa		Helsäd bal		Vall, bal		2sk, ps syra		1sk, bal
Aerococcaceae	<i>Facklamia</i>	2,5				0,2								0,3			
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>			0,1				0,1		2,6							0,2
Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	0,6	0,4	0,1				0,4		5,5		0,1		0,1	8,3		
	<i>SMB53</i>	2,2				0,1		0,1		0,4		0,3		0,3	3,1	0,1	
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	0,1				2,0				0,1	0,1	0,1					
Lachnospiraceae	<i>Oidentifierad</i>	1,9	0,3							0,1		0,1		0,1	0,2	0,1	
Lactobacillaceae	<i>Oidentifierat</i>	0,1	2,9		53					0,1		0,1	25				39
	<i>Lactobacillus</i>	0,7	39		1,2	0,3		0,7		0,3	0,6	0,1	3,9		76,6		38,5
	<i>Pediococcus</i>	0,2			0,4						5,9		10,7				1,6
Leuconostocaceae	<i>Oidentifierad</i>	1,7				0,1		7,9		2,1	62		8,6				1,1
	<i>Leuconostoc</i>	0,3			4,7			1,6		1,1	7,6	0,1	4				3,9
Listeriaceae	<i>Brochothrix</i>							71									
Peptostreptococcaceae	<i>Oidentifierat</i>	1,7								0,1		0,4		0,2	3,1	0,1	
Planococcaceae	<i>Oidentifierat</i>	0,5	0,6							0,2					0,4		
Ruminococcaceae	<i>Oidentifierat</i>	8,4				0,5				0,5		0,4		0,9		0,2	
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	2,0		0,2		4,6		5		5,4							
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	3,5		0,2		0,5		1,4		17,6		0,1		0,4			
	<i>Streptococcus</i>	10,9		3,3		12,6				1,3		0,1		0,8		0,1	
Andel Firmicutes		46,1	45,4	3,7	66,3	22,9	0,8	72,4	18,2	34	84,4	2,2	72,1	4,5	99,8	0,7	86,1
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	8,1				1,5				2,0		1,4		0,7		0,2	
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	0,2	0,1				0,1	2,3									
	<i>Kocuria</i>	1,2				0,8				2,4		0,3					
Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	0,1				1,8	0,1	0,1		0,1							
Andel Actinobacteria		9,6	0,2	0	0,2	5,4	1,5	0	8,0	4,5	0	1,7	1,0	0,7	0	0,2	0,1

Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	0,1	1,1														
Cytophagaceae	<i>Hymenobacter</i>					0,6	2				0,1				0,1		
Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	0,1	1,8			0,4	0,4				1				0,7		
Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,2	1,3														
Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>		0,1			1,8	1,9				2,2				0,5		
Weeksellaceae	<i>Cryseobacterium</i>	0,1				0,1	0,7	1,3	0,1		0,1	0,6			0,1	1,1	
Andel Bacteroidetes		2,1	5,8	0	0	0,2	4,3	0	8,9	0,1	0	0,1	5,1	0	0	0,1	2,8
Acetobacteriaceae	<i>Acetobacter</i>	0,1	1,7														
Campylobacteriaceae	<i>Arcobacter</i>	0,1	9,4								0,1						
Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>		4,5								0,1		0,1				
Enterobacteriaceae	<i>Oidentifierad</i>	0,1	0,3		0,2	0,2	26		12,3	0,1	3,6		1			0,3	4,5
	<i>Pantoea</i>	1,1	0,4			0,5	6,5	1,3	5,5	0,1	0,2		0,2				
	<i>Serratia</i>				0,7		0,2				10						0,7
	<i>Yersinia</i>				0,2		0,1	4,7	0,2	2,5	1,1						0,1
Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	0,3				3,0				0,9							
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	1,0	15			0,3	0,3	19,2	0,9	0,5		0,8		6,0		0,4	
	<i>Enhydrobacter</i>		3,4			1,2				0,2		0,2					
Oxalobacteriaceae	<i>Janthinobacterium</i>		0,4				17		3,2	1,0		0,7					2,4
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	3,7	3,7	96		59	16	2,4	10,2	51		89	0,4	83	0,1	94	0,2
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>		0,1		0,1		6,3		9,9	0,2		9,4					1,3
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>		0,1				1,2		0,2			0,2	3			0,5	0,2
Andel Proteobacteria		11,8	48,1	96	2,9	65,3	83,5	27,6	57,6	57,2	15,4	90,5	20,3	89,3	0,2	95,1	10,7
Övrigt		42,4	16,2	0,3	39,3	10,7	22,5	0	33,6	7,1	3,5	6,1	28,6	7,1	8,2	3,9	3,9

Färgkodning: Ljusblått: Firmicutes. Ljusbrun: Actinobacteria, Ljusgrön: Bacteroidetes. Rosa: Proteobacteria.

Förkortningar: sk: Skörd. ps: plansilo. Bakt: ensileringsmedel, bakterietillsats. Kem: ensileringsmedel, kemtillsats. Syra: Ensileringsmedel, syratillsats.

P1= Grovfoderprov 1. M1= Mjölksprov 1, tagna från samma gård och vid samma tillfälle som Foderprov 1.

Inkluderingskriterier: släkten som utgör mer än 2 % i minst ett prov, alternativt finns i både mjölk och foder på samma gård och utgör minst 0,5 % i minst ett prov.

Etapp 2 – Beskrivning av 17 gårdar

I Etapp 2 valdes tre grupper ut med totalt 17 gårdar. Nedan följer en beskrivning av dessa baserat på bland annat de telefonintervjuer som gjordes inför gårdsbesöken i november 2017.

Medelkoantalet på de 17 gårdarna är 75 kor, med en spridning från 20 – 185 kor. Vanligast är rasen SLB vilken utgör majoriteten på nio gårdar. En majoritet av SRB, SKB eller en jämn fördelning av SRB/SLB fanns på två gårdar vardera. En gård har en majoritet av SJB och en har ungefärlig lika stor fördelning av SLB, SRB och SJB.

Mjölkningsrutiner och inhysning

Korna mjölkas i robot på sju gårdar, på bås på sex gårdar och i grop på fyra gårdar. Av gårdarna med robot har fyra gårdar märket Lely och tre har märket DeLaval. Gårdarna med robotmjölkning har i snitt 2,6 mjölkningar per dag och de andra gårdarna har två mjölkningar per dag, oavsett system.

På alla gårdar mjölkas spenarna ur före mjölkning och torkas rena. I Tabell 15 ses de medel som används för rengöring av spenar innan mjölkning i de olika mjölkningssystemen. På fem gårdar torkas spenarna endast torra, på sex gårdar rengörs de med vatten, på två gårdar med såpa och på fyra gårdar används mjölksyrabaserat medel. Efter avslutad mjölkning används jodpreparat på elva gårdar, på två gårdar används mjölksyrabaserat medel och på den sista gården används ett örtpreparat i form av en tjockare dipp vilket ska fungera som en skyddande barriär och påskynda förslutningen av spenkanalen.

Tabell 15. Mjölkningssystem samt rengöringsmedel som används före mjölkning (överst) och behandling av spenar/juver efter mjölkning (underst)

Innan påbörjad mjölkning				
Mjölkningssystem	Torkar torrt	Torkar vått	Såpa	Mjölksyra
Robot	4	3		
Uppbundet	1	2	1	2
Grop		1	1	2
Efter avslutad mjölkning				
Mjölkningssystem	Jod	Mjölksyra	Örtpreparat	Inget
Robot	6			1
Uppbundet	4	1		1
Grop	1	1	1	1

Utfodring

På alla gårdar finns rutiner för att hålla foderbordet rent. På tre gårdar sopas foderbordet två gånger per dag, på tio gårdar sopas foderbordet dagligen och på två gårdar sopas foderbordet vid behov. I Tabell 16 ses utfodringssystemen på de 17 gårdarna. På de sex gårdarna med uppbundet system ges grovfoder och kraftfoder separat på foderbordet. De gårdar som utfodrar med fullfoder mjölkar i grop. Av robotgårdarna ges korna kraftfoder i roboten på sex av sju gårdar. På en gård ges inget kraftfoder i roboten utan endast i kraftfoderautomat.

Den genomsnittliga grovfoderandelen i foderstaten ligger på 61 %, med lägsta andelen på 50 % och högsta på 77 %. På gårdarna ges i snitt 4,4 givor av grovfoder varje dag. Som grovfodergiva räknas varje utfodring av rent grovfoder, fullfoder samt blandfoder. På åtta gårdar är foderbordet så brett att korna inte når allt foder. Av den anledningen ingår ett antal ”tillputtningar” av foder i de dagliga rutinerna. Det kan ses som en extra giva då även

lantbrukarna upplever att det stimulerar korna till att gå och äta en extra gång. Det gäller även de kor som står uppbundna. Om även dessa tillputtningar av foder räknas in blir antalet grovfodergivor per dag i medeltal 5,8.

I medeltal ges korna 6,7 givor kraftfoder per dag. Som kraftfodergiva räknas varje giva av kraftfoder på foderbordet, i kraftfoderautomat, grop eller i robot. Då både fullfoder och blandfoder innehåller kraftfoder räknas också varje giva av detta som en kraftfodergiva, eftersom det kraftfodret också torde påverka aktiviteten i vommen.

Tabell 16. Antal berättningar med respektive utfodringsystem

Utfodringsystem	Antal
Fullfoder	2
Blandfoder + kraftfoder i robot	3
Grovfoder och kraftfoder separat på foderbord	6
Grovfoder på foderbord + kraftfoder i automat	2
Grovfoder på foderbord + kraftfoder i grop	1
Grovfoder på foderbord + kraftfoder i automat och i robot	3

Grovfoder

Vid tidpunkten för novemberprovtagningen lagrades det grovfoder som då utfodrades i rundbal på nio gårdar, i tornsilo på fyra gårdar, i plansilo på tre gårdar (varav en gav 6 % av grovfodret från rundbalar) och på en gård lagrades grovfodret i limpa. Rundbalarna på alla gårdar pressades i en så kallad kombimaskin vilken pressar och nätar balarna varpå de omedelbart plastas. Plansilos tog 2 – 3 dagar att fylla och ingen tillfällig täckning utfördes vid inläggningsavbrott på natten.

På fem gårdar gavs en andel på mellan 25 och 67 % helsädsensilage i grovfoderblandningen. På tre av dessa gårdar lagrades helsädsensilaget i rundbal, på en gård i tornsilo och på en gård i plansilo. Våren 2017 var torr vilket resulterade i dålig tillväxt och låg förstaskörd. Hösten däremot gav ovanligt stor nederbörd med blött foder och svårighet att tröska torr spannmål som följd. Därför valde flera av de intervjuade att oplanerat ta helsädsensilage istället för att tröska.

På åtta av de 17 gårdarna användes tillsatsmedel i ensilaget (fyra plansilo/limpa och fyra tornsilor), varav sju hade syra och en hade kemiskt tillsatsmedel. Syratillsatsen innehåller vanligtvis propionsyra och myrsyra. Det grovfoder som gavs vid novemberprovtagningarna höll i snitt en torrsbstanshalt på 35 % i vallensilaget och 31 % i helsädsensilaget (baserat på telefonintervju). Klöverandelen i vallensilaget låg i snitt på 15 %, från runt 5 – 30 %, vilket är uppskattad andel av lantbrukarna och inte räknat på andelen i utsädet.

Av de 17 gårdarna gavs de mjölkande korna vid novemberbesöket endast förstaskörd på fem gårdar, endast andraskörd på fyra gårdar och endast tredjeskörd på en gård. På sju av gårdarna blandades första och andra skörd, sex av dessa lagrade fodret som rundbalar och en i plansilo. Det är en stor spridning i skördedatum mellan gårdarna. Första skörden är tagen mellan 25 juni och 25 juli, andra skörden är tagen mellan 30 juli och 15 september. Skördedatum för helsädsensilaget varierar mellan 11 augusti och 2 oktober.

Medelåldern på vallarna där foder togs till de mjölkande korna var 2,4 år och varierade mellan första till fjärdeårsvall.

Hygienisk kvalitet foderprov

Vid foderprovtagningarna i november 2017 och februari 2018, på 17 respektive 18 gårdar, togs prover bland annat för hygienisk analys, vilka skickades färska till Ultuna. I Tabell 17 och 18 ses medelvärden av analysresultaten angivet i log cfu/gram prov. I de fall signifikans förekom gjordes Tukey's test för att se vilka behandlingar som skiljde sig ifrån varandra, vilket i tabellerna illustreras med olika bokstäver; abc.

I Tabell 17 delas provsvaren upp efter lagringsmetod där minst 80 % av provet ska ha lagrats med angiven metod. Tabellen antyder att mängden enterobakterier, klostridiesporer samt de mjölksyrabildande bakterierna *Lactobacillus*, *Pediococcus* och *Leuconostoc* (odlade på rogosa-medium) inte påverkats av lagringsmetod. Däremot ses en skillnad i halt av jäst, mögel och *Enterococcus* (odlade på s-b medium). Rundbalarna innehåller en högre halt jäst och *Enterococcus* än ensilaget från tornsilo och plansilo/limpa och har mindre mängd mögel. Ensilaget från tornsilos har störst mängd mögel.

Tabell 17. Medelvärden från hygienisk analys av färska foderprov tagna november och februari, uppdelat på lagringsmetod (log cfu/gram prov)

	Jäst	Mögel	Enterobakterier	Klostridiesporer	LAB (rogosa)	LAB (s-b)
Rundbal (19)	4,3 ^a	1,6 ^c	1,6	1,6	7,7	5,6 ^a
Tornsilo (8)	2,7 ^b	2,9 ^a	1,5	1,8	7,2	4,1 ^b
Plansilo/limpa (8)	2,8 ^b	2,0 ^b	1,5	2,1	6,9	3,9 ^b
p-värde	<0,01	<0,001	>0,1	>0,1	>0,1	<0,01

Källa: Resultat från hygieniska analyser utförda vid Inst. för husdjurens utfodring och vård, SLU, 2017. Inom parentes anges antalet prov inom gruppen. Signifikanta skillnader anges med olika bokstäver: abc.

I Tabell 18 delas provsvaren upp mellan de gårdar som använde olika ensileringsmedel i en eller flera delar av sin grovfoderblandning. Liksom i Tabell 17 ses ingen skillnad i förekomst av enterobakterier och klostridiesporer. De grovfoderpartier som behandlats med syratillsats hade mindre jäst men mer mögel än de obehandlade partierna. De obehandlade proverna har också större mängd *Enterococcus*.

Av de prov av ensilage som behandlats med kemiskt tillsatsmedel kom ett prov från rundbal och två från plansilo. Av de syrade proven kom åtta från tornsilo och sex från plansilo/limpa. De 18 prov som inte blivit behandlade med ensileringsmedel kom alla från rundbalar.

Tabell 18. Medelvärden från den hygieniska analysen av färskt foderprov angivet i log cfu/gram prov, uppdelat på förekomst av ensileringsmedel i mer än 60 % av grovfodret

	Jäst	Mögel	Enterobakterier	Klostridiesporer	LAB (rogosa)	LAB (s-b)
Utan (18)	4,3 ^a	1,6 ^b	1,6	1,6	7,7	5,6 ^a
Syra (14)	2,9 ^b	2,6 ^a	1,5	1,9	6,9	4,1 ^b
Kem (3)	2,6 ^b	1,7 ^b	1,5	1,7	7,6	4,3 ^b
p-värde	<0,01	<0,001	>0,1	>0,1	0,05 – 0,1	<0,01

Källa: Resultat från analyser utförda vid Inst. för husdjurens utfodring och vård, SLU.

Inom parentes anges antalet prov inom gruppen. Signifikanta skillnader anges med olika bokstäver: abc.

Diskussion

Det är svårt att dra några absoluta slutsatser med det begränsade underlag som inhämtats inom examensarbetet, men med hjälp av litteraturstudien kan resultaten från Etapp 1 och Etapp 2 diskuteras.

Etapp 1

Gårdsbeskrivningar

Medeltalen från de 43 gårdar som ingick i Etapp 1 skiljer något jämfört med riksmedeltalet. Gårdarna är generellt mindre med ett medeltal på 66,5 årskor jämfört med 87,9 som var medelvärdet för kokontrollen 2016. Snittet dras ned av det relativt stora antalet små gårdar med uppbundna kor som ingår, vilka har en genomsnittlig besättningsstorlek på 34 kor.

Rasfördelning

Enlig rasfördelningen som ses i Tabell 8 har våra gårdar i snitt lägre andel SLB och SRB men betydligt högre andel SKB och SJB än rikssnittet. Detta kan delvis bero på att många har äldre båsladugårdar vilket kan tillåta en mer extensiv mjölkproduktion där korna får lägre mängd kraftfoder och följaktligen mjölkar mindre. Ett sådant system har större möjligheter att använda raser med lägre mjölkproduktion, men som kan anses ha andra fördelar för den enskilda lantbrukaren. Gårdar där man byggt nytt har vanligtvis höga fasta byggnadskostnader vilket kräver en hög mjölkproduktion som raserna SLB och SRB kan erbjuda.

Mjöltparametrar

Skillnaderna i mjöltparametrar jämfört med riksgenomsnittet (Tabell 7) kan också delvis härledas till rasfördelningen. De 43 gårdarna har lite högre fett- och proteinhalt än rikssnittet vilket troligen bland annat beror på den större andelen Jerseykor.

Jämfört med riksmedelvärdet har de 43 gårdarna, i linje med det nordliga distriktet i kokontrollen, betydligt lägre celltalsmedelvärde. Enligt Växas sammanställning (2017) ses att uppbundna båsladugårdar i medeltal har något lägre celltal än lösgående system. Även gårdar med ett medelkoantal under 49,9 har lägre celltal än de större gårdarna inom samma mjölkningssystem (robotgårdar borträknade), enligt Växas översikt av alla kokontrollens gårdar. Det relativt stora antalet små uppbundna gårdar kan vara en del av förklaringen till de lägre celltalen i norr. En annan anledning kan vara att Norrmejerier sedan länge har premierat låga celltal i mjölken.

Mjölakens mikrobiota, februariprover

Den procentuella fördelningen av familjer av bakterier i mjölken inom de olika lagringsmetoderna för foder ses i Tabell 13. En signifikant skillnad mellan lagringsmetoder sågs i familjen *Peptostreptococcaceae* där de två höproverna hade något högre värden än proverna med ensilage. Arter från familjen finns vanligtvis i gödsel och jord (Slobodkin, 2014) vilket kan vara ursprunget till dessa bakterier. Släktet *Peptostreptococcus* har tidigare isolerats från mjölk (Quigley *et al.*, 2013). Orsaken till att inte fler skillnader sågs beror på de stora variationerna med många höga och låga värden inom samma lagringsmetod.

Anledningen till den stora variationen är troligen att betydligt fler faktorer påverkar mjölakens mikrobiota än hur det foder som korna äter har lagrats. Fodrets mikrobiota påverkas också av torrsbstanshalt, ensileringsmedel, artsammansättning etc (Heron *et al.*, 1993; Oliviera *et al.*, 2017; Sundberg *et al.*, 2003). Flera omgivningsfaktorer i stallet kan också påverka, Vacheyrou *et al.* (2011) såg att vissa bakterier som fanns i mjölken även fanns på juret, i

fodret, damm och luft. Även individuella kors egenskaper, såsom ålder och juvrets form, kan ha inverkan på vilka bakterier som finns på juvret, liksom hygienrutiner kring mjölkning (Monsallier *et al.*, 2012). Även betets egenskaper kan påverka (Frétin *et al.*, 2018).

Trots att signifikans saknas går det att se vissa procentuella skillnader inom vissa familjer i Tabell 13. Tre av familjerna är Enterobacteriaceae, Moraxellaceae och Pseudomonadaceae där släktena *Pantoea*, *Acinetobacter* respektive *Pseudomonas* ingår. Dessa tre släkten ses både i foder och mjölk på samma gårdar i Tabell 14, de isolerades också både från mjölk och hö av Vacheyrou *et al.* (2011) och är identifierade som vanliga släkten på den levande växten (Knief *et al.*, 2011) och vanliga i mjölk (Quigley *et al.*, 2013). *Acinetobacter* och *Pseudomonas* är köldtoleranta bakterier, vilket kan förklara den höga andelen av dessa i mjölkproverna då de växer till under kylagring. Enligt Quigley *et al.* (2013) verkar köldtåliga bakterier vara vanligare i mjölken vid kallare årstider, vilket kan vara en bidragande orsak till att *Acinetobacter* fanns i högre proportion i Tabell 13 (februariprover) jämfört med Tabell 14 (juliprover). Mycket tyder alltså på att dessa bakterier kommer från fodret och med ett större underlag är det möjligt att signifikanta skillnader beroende på lagringsmetod skulle kunna ses.

Jämförelse med litteratur

I våra prov amplifierades 16S rRNA- genen hos bakterierna via PCR, varpå den sekvenserades för att identifiera art. I denna metod amplifieras arvsmassa från såväl levande som försvagade och döda bakterier. I studien av Masoud *et al.* (2011) användes en liknande metod, vilket gör att denna studie direkt kan jämföras mot våra data. I studien av Vacheyrou *et al.* (2011) odlades bakterierna däremot på agarplatta, vilket innebär att de bara identifierat de bakterier som är i gott skick, även bakterier i lågt antal riskerar att falla bort då de kan bli utkonkurrerade av de som finns i stort antal. Vid jämförelse mellan våra prov och de två studierna går det därför att jämföra fördelning av bakterier med Masoud *et al.* (2011), men det går bara att nämna att samma bakterier även hittats i studien av Vacheyrou *et al.* (2011).

Våra mjölkprover skiljer sig från bland andra Masoud *et al.* (2011) genom att många olika bakterier är representerade i en jämnare fördelning. Två familjer finns i en genomsnittlig proportion på över 10 %; Moraxellaceae och Ruminococcaceae. Familjen Moraxellaceae består i våra prov av släktena *Acinetobacter* och *Psychrobacter*. Vacheyrou *et al.* (2011) odlade fram båda dessa släkten från sina mjölkprov medan Masoud *et al.* (2011) uppmätte 2 % *Acinetobacter sp.* men inga *Psychrobacter* i silomjölken. Familjen Ruminococcaceae är intressant då den finns i så hög andel i våra prov, men i låg mängd i de referenser jag funnit. Quigley *et al.* (2013) nämner arten *Ruminococcus flavifaciens* vilken också fanns i 0,1 % proportion i den danska silomjölken (Masoud *et al.*, 2011). Släktet *Ruminococcus* kommer troligen inte från fodret utan är vanlig i vommen där de bryter ner cellulosa (Krause & Russell, 1996). Varför de utgör en så stor andel av februariproverna hos de 37 gårdarna går bara att spekulera i. Kanske är det en konsekvens av hög grovfodergiva och att korna står tillsammans inomhus vilket gör att dessa bakterier ackumuleras i stalluften.

Några generella skillnader går att se mellan mikrobiotan i våra mjölkprover och i den franska och danska mjölken (Tabellerna 3, 4 och 13). Flera av de släkten som sågs inom divisionen Actinobacteria i den franska mjölken saknas i våra prov, eller finns i mycket låg proportion, under 0,1 %. Beträffande den divisionen liknar våra prov mer den danska mjölken (Masoud *et al.*, 2011; Vacheyrou *et al.*, 2011). Inom divisionen Bacteroidetes finner vi en rad bakterier i våra prov vilka saknas både i den danska och franska mjölken, alternativt finns i mycket låg proportion. Vissa av dessa bakterier, såsom släktena *Bacteroides* och *Prevotella*, återfinns liksom *Ruminococcus* i vommen (Krause & Russell, 1996).

Inom divisionen Firmicutes ses flera likheter men också vissa övergripande skillnader mellan mikrobiotan i våra prov och i de franska och danska (Tabellerna 3, 4 och 13). De franska proven uppmätte en viss del *Bacillus*, vilket fanns i mycket liten andel i våra prov (Vacheyrou *et al.*, 2011). De danska proven hade betydligt högre andel mjölksyrabildande bakterier. Halten *Lactobacillus* låg där på knappt 10 %, jämfört med 0,5 % i våra prov. Släktena *Lactococcus* och *Streptococcus* (inom familjen Streptococcaceae) hade en sammanlagd proportion på knappt 5 % i våra prov och utgjorde totalt 66 % i den danska mjölken (Masoud *et al.*, 2011). Vidare fanns en rad bakterier i vår mjölk som tycks saknas i den franska och danska mjölken, såsom Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Peptostreptococcaceae och Turicibacteraceae.

Att klostridier saknas i de franska proverna bör kunna bero på att de fodrade med hö (Sundberg *et al.*, 2003). Något motsägande är att våra två mjölkprover från gårdar som utfodrat med hö (Tabell 13) hade något högre mängd klostridier än de prover som kom från ensilageutfodrade kor. Möjliga orsaker till klostridier i dessa två prover kan vara sporer i fodret, exempelvis på grund av låg stubbhöjd/sorkhål på åker. De kan också komma från strömedlet i båsen (Quigley *et al.*, 2013). Att den danska mjölken innehåller så mycket större andel mjölksyrabildande bakterier kanske delvis också kan förklaras med fodret. Monsallier *et al.* (2012) såg att de gårdar som utfodrade med ensilage hade mer *Lactobacillus* i mjölken än de som utfodrade med hö, vilket kan vara förklaringen till att de danska proverna hade mer än de i studien av Vacheyrou *et al.* (2011). Det förklarar dock inte varför våra mjölkprover hade lägre andel *Lactobacillus*.

Inom divisionen Proteobacteria ses både skillnader och likheter i vår mjölk jämfört med den danska och franska (Tabell 3, 4 och 13). Andelen *Pseudomonas* stämmer överens, liksom andelen Enterobacteriaceae. Däremot skiljer sig fördelningen av släkten inom familjen Enterobacteriaceae; våra prov utgörs av *Pantoea*, *Serratia* och *Yersinia*, samt en mindre andel *Escherichia* och *Citrobacter*. De franska mjölkproven innehåller *Pantoea* och *Yersinia*, och de danska proven innehåller endast *E. coli*, men i mycket högre andel.

Effekt på ostproduktion

Innan ystning är det vanligt att pastörisera mjölken, vilket kraftigt reducerar antalet bakterier. Vissa bakterier kan däremot överleva och ha möjlighet att påverka smak- och strukturutvecklingen i osten. En känd sådan kategori av bakterier är non- starter LAB vilka till stor del finns inom släktet *Lactobacillus* (Quigley *et al.*, 2013). Detta släkte fanns i låg proportion i våra mjölkprover, vilket kan betyda att dessa jämförelsevis kommer att ha begränsad effekt på smakutvecklingen under lagringen. Två andra släkten av bakterier som kan tänkas påverka ystningsresultatet är *Pseudomonas* och *Clostridium*. Den förstnämnda bildar värmeresistenta enzymer som fortsätter att vara verksamma efter pastörisering och den sistnämnda bildar sporer som kan gro i osten och påverka smaken (Pahlow *et al.*, 2003; Quigley *et al.*, 2013).

Utöver dessa har våra mjölkprover bland annat relativt hög proportion av släktena *Ruminococcus*, *Psychrobacter* och *Serratia*. Släktet *Ruminococcus* är inte känt för att ha någon påverkan på ostens mognad, vilket bör bero på att det främst fermenterar cellulosa. Resterande släkten har däremot identifierats i franska ostar, men endast *Psychrobacter* tros ha någon betydande påverkan på smakutvecklingen (Quigley *et al.*, 2013). Även om släktet kan påverka smakutvecklingen är det osäkert om bakterierna överlever pastöriseringen.

Mikrobiota i foder- och mjölkprov, sommarprover

I Tabell 14 ses bakteriefloran i mjölk och foder vid provtagning i juni/juli från åtta av de 43 gårdar som medverkade i Etapp 1. Urvalet av foderprov gjordes med det ursprungliga syftet att endast testa metoden med DNA-sekvensering av arvs massa i foder. Trots det låga antalet grovfoderprover går det ändå att jämföra dem mot de mjölkprover som sekvenserats från motsvarande gårdar samma månad för att se vilka bakterier som finns i båda proven.

I Tabell 14 förekommer sammanlagt 35 släkten. Av dessa finns tre endast i grovfoderprover och åtta släkten endast i mjölkprover. Sammanlagt tolv släkten uppträder mer oregelbundet i mjölk- och foderprover utan något samband inom gårdar och nio återfinns i både mjölk- och foderprov på minst två gårdar. På gård 1 finns tre släkten både i mjölk- och foderprov, vilka helt saknas på de övriga gårdarna.

Köldtoleranta bakterier

I Tabell 14 ses att två släkten verkar dominera i sju av åtta prov, vilket inte ses i Tabell 13. Mjölkproverna från gård 2, 3 och 5 – 8 innehåller en hög andel *Pseudomonas* och mjölkprovet från gård 4 håller en hög andel av släktet *Brochothrix* (det enda prov som innehåller detta släkte). Båda dessa släkten av bakterier lever naturligt i jord och gräs. *Pseudomonas* är känd för att växa i mjölk under låga temperaturer och enligt Quigley *et al.* (2013) kan de snabbt nå en proportion på 80 – 90 % i kylgrad mjölk. Även *Brochothrix* kan växa vid temperaturer nedåt 0 °C (Stackebrandt & Jones, 2006). Kylagringen är den troliga förklaringen till dessa mätvärden då den provtagna mjölken hämtas från gårdarna med två dagars mellanrum varpå proverna transporteras till Uppsala för analys. En del av tankmjölken har då lagrats i tre dygn innan sekvensering vilket ger tid för de köldtåliga bakterierna att växa till. *Brochothrix* finns som sagt i jord och gräs, men ses inte i foderproven från samma period. Det kan tyda på att bakterien spridits till juvret direkt från betet eller att det redan finns i mjölkkningslokalen/maskinen (Quigley *et al.*, 2013).

Bakterier endast närvarande i foder eller mjölk

Av de släkten som endast fanns i foderproven är *Pedobacter* och *Serratia* vanliga på växter (Knief *et al.*, 2011). Av de släkten som endast fanns i mjölk har *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Lactococcus* och *Streptococcus* tidigare isolerats i mjölk (Masoud *et al.*, 2011; Vacheyrou *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2013). I studier av Daeschel *et al.* (1987) och Vacheyrou *et al.* (2011) har släktena *Kocuria*, *Lactococcus* och *Streptococcus* isolerats både på levande växter och i foder, vilket tyder på att fodret ändå är ett möjligt ursprung till dessa, även om så inte verkar vara fallet i våra prov. Mer troligt är att spenarnas egen bakterieflora är ursprunget till *Corynebacterium* och *Kocuria* i våra prov (Machado *et al.*, 2017).

Hö och nyskördat foder

Bland de åtta foderproven finns ett prov av hö och ett prov av färskt gräs, skördat dagen innan. Den mikrobiella floran i dessa två prov skiljer sig tydligt från övriga sex prov genom att de innehåller betydligt lägre andel bakterier tillhörande divisionen Firmicutes och högre andel från divisionen Proteobacteria (Tabell 14). Detta beror på att ingen ensileringsprocess ägt rum och dessa två prov har därmed mycket lägre andel mjölksyrabildande bakterier inom divisionen Firmicutes. Istället har proverna på hö och grönmassa högre andel enterobakterier, *Pseudomonas* och *Sphingomonas*. Provet på hö har också en hög andel *Janthinobacterium* (17 %) och grönmassaprovet är det enda grovfoderprov som innehåller *Staphylococcus* (5 %).

Mikrobiotan i grönmassaprovet (grovfoderprov 4) liknar i viss mån mikrobiotan hos klöver och sojaböna i den schweiziska studien av Vorholt (2012). Både klöver och sojaböna hade där

låg andel Actinobacteria (6 – 7 %) och Bacteroidetes (9 – 11 %), vilket kan jämföras med 8 respektive 8,9 % i grönmassaprovet. Vårt grönmassaprov hade dock lägre andel Proteobacteria än klöver och sojaböna i Tabell 1, 57,6 % jämfört med 81 %. Däremot ses likheten i att både *Pseudomonas* och *Sphingomonas* finns i hög andel i alla tre prov.

Man kan också se att grönmassaprovet skiljer sig från de schweiziska proven genom att det innehöll totalt 18 % enterobakterier och 5 % *Staphylococcus* (Tabell 1 och 14). Enterobakterier finns på den levande växten, men i lågt antal, och växer till under ensileringsprocessen (Heron *et al.*, 1993). Dock bör ingen ensileringsprocess ha kommit igång då fodret inte plastats, ändå har grönmassaprovet betydligt högre andel enterobakterier än vad som förväntas finnas på en levande växt. Eftersom fodret låg i en hög utanför ladan kan en förklaring vara att det i de inre delarna av högen skapats ett fördelaktigt habitat för enterobakterierna, med minskad mängd syre och begränsad mängd UV-strålning från solen. Den förhållandevis höga andelen *Staphylococcus*, som inte finns i proverna i Tabell 1, kan tyda på en inblandning av jord i fodret (Bashan & de-Bashan, 2005), vilket exempelvis skulle kunna bero på låg stubbhöjd eller många sorkhögar. Å andra sidan innehåller provet låg andel klostridier och inget spår av *Bacillus*, vilket tyder på att ingen kontaminering av jord ägt rum.

Även mikrobiotan i provet med löshö (grovfoderprov 3) liknar proverna av klöver och sojaböna. Detta med i stort sett lika mycket Proteobacteria (83,5 %) med hög andel *Pseudomonas* och *Sphingomonas*, men med lägre andel Actinobacteria och Bacteroidetes. Höprovet har dock 32,8 % enterobakterier och 17 % *Janthinobacterium*. Anledningen till att dessa bakterier finns i högre andel kan vara att det totalt sett är färre bakterier i höet och att just dessa överlevt bättre än övriga bakterier. *Janthinobacterium* finns i jord och vatten och har en optimal tillväxttemperatur på 25° C (Dworkin *et al.*, 2006b). Då Vorholt (2012) inte nämnt den bland bakterier på den levande växten är det möjligt att denna bakterie tillkommit via inblandning av jord varpå den växt till under torkningstiden.

Vissa skillnader i mjölkens bakterieflora hos de här båda gårdarna kan eventuellt ses jämfört med de sex gårdar som utfodrat de mjölkande korna med ensilage. Mjolkprov 3, från gården där löshö utfodrats, har hög andel *Halomonas* och *Enterococcus* och förhållandevis hög andel av *Streptococcus* och *Staphylococcus*. Inga av dessa släkten sågs dock i fodret. I Mjolkprov 4, där grönmassa utfodrats, dominerade släktet *Brochothrix*, vilket troligen inte har att göra med fodret (se under rubrik "Köldtoleranta bakterier"). Andelen enterobakterier är förhållandevis hög och andelen *Acinetobacter* sticker ut. Dessa bakterier tros kunna spridas från foder till mjölk (Vacheyrou *et al.*, 2011) men det finns inget i Tabell 14 som tyder på att grönmassa eller hö skulle ge högre proportion av dessa bakterier i mjölken.

Oregelbundet förekommande bakterier

I mjölk- och foderproven finns tolv släkten av bakterier som uppträder mer oregelbundet (Tabell 14). Dessa isolerades i både mjölkprov och foderprov, men inte på samma gård, eller tillsammans på högst en gård. De förekommer ofta antingen i flera mjölkprover och ett foderprov eller vice versa.

Flera släkten förekommer i både mjölk- och foderprov från gård 1, men inte i andra prov, vilket kan tyda på att dessa bakterier spridits från foder till mjölk. Av dessa finns *Acetobacter* i jordbruksjord (Bashan & de-Bashan, 2005) och *Bacteroides* på levande växter (Vorholt, 2012). Enligt Quigley *et al.* (2013) har man också funnit *Bacteroides* och *Prevotella* i irländsk mjölk och där dragit slutsatsen att det spridits från träck, då de associeras med tarmfloran.

Arthrobacter, *Flavobacterium* och *Sphingomonas* förekommer i flera av de åtta foderproven och enstaka mjölkprov. De är även vanliga i jord och på levande växter (Vorholt, 2012; Bashan & de-Bashan, 2005). Enligt Quigley *et al.* (2013) förekommer också dessa släkten i komjölk. *Sphingomonas* och *Staphylococcus* isolerades även i mjölk och hö i studien av Vacheyrou *et al.* (2011).

Släktena *Carnobacterium* och *Comamonas* finns i både mjölk- och foderprov i Tabell 14 och de finns med i mjölkproven i Tabell 13. Även Quigley *et al.* (2013) anger att de finns i komjölk. Ursprunget till dessa släkten har inte diskuterats i de nämnda referenser, men då *Carnobacterium* påvisades i tre av åtta foderprov i Tabell 14 är fodret ett möjligt ursprung.

Släktena *Enterococcus*, *Pediococcus* och *Rhodococcus* finns alla på den levande växten och arterna *Ec. faecalis* och *Pc. pentosaceus* har identifierats både på växter och i dansk silomjölk (Daeschel *et al.*, 1987; Masoud *et al.*, 2011; Vorholt, 2012). På en gård isolerades släktet *Rhodococcus* i både foder och mjölk, vidare isolerades det i foder eller mjölk på olika gårdar. Enligt Dworkin *et al.* (2006a) är det ett djurassocierat släkte som bland annat finns i tarmens mikrobiota hos idisslare och därför ofta återfinns på beten. Detta tyder på att både träck och foder kan vara kontaminationskälla.

Återkommande bakterier

I mjölk- och foderproven finns nio släkten av bakterier som förekommer både i mjölk och i foder på samma gård, på minst två olika gårdar. Det är därför mest troligt att de bakterier som kan sprida sig från foder till mjölk finns i den här gruppen av bakterier.

Släktena *Pseudomonas* och *Pantoea* förekommer i foder och mjölk på samma gård på fyra eller fler gårdar. *Acinetobacter* och *Lactobacillus* förekommer både i foder och i mjölk på tre gårdar. Samtliga släkten är vanliga på levande växter och har tidigare isolerats i mjölk. Alla har isolerats i hö och mjölk på franska gårdar (Masoud *et al.*, 2011; Vacheyrou *et al.*, 2011; Vorholt, 2012). Bakterien *Le. mesenteroides* är enligt Quigley *et al.* (2013) också associerad med mjölk. Samma släkte finns på levande växter och är viktig i ensileringsprocessen (Daeschel *et al.*, 1987). Släktet *Clostridium* är kända för att vara en jordbakterie vars sporer kan kontaminera mjölk (Sundberg *et al.*, 2003; Bashan & de-Bashan, 2005) Sammantaget ser jag detta som starka indicier på att dessa släkten av bakterier, samt *Le. mesenteroides*, kan ha sitt ursprung i fodret.

Enligt Quigley *et al.* (2013) har också *Cryseobacterium*, *Stenotrophomonas* och *Yersinia* påvisats i komjölk. Enligt Quigley *et al.* (2013) återfinns dessa tre släkten vanligtvis i mjölk i låga koncentrationer och räknas alla som produktförstörare/sjukdomsframkallande, med undantag för *Stenotrophomonas* som visserligen isolerats i ostar men inte tros ha negativ inverkan på ystningsprocessen. Jag kan inte se att man i någon annan studie utrett huruvida dessa släkten kan spridas från foder till mjölk, men det är möjligt och något som bör undersökas närmare.

Påverkas mjölkens bakterieflora av foder?

Ovan nämns en rad bakterier som bevisligen finns både i fodret och i mjölken. Men, enligt den franska studien av Vacheyrou *et al.* (2011) återfinns flera av bakteriesläktena på fler ställen än bara i foder och mjölk, såsom i damm, luften eller på spenarna. Machado *et al.* (2017) bekräftar också att bakterierna i mjölken har flera möjliga ursprung. Primärt kan de komma från mjölkmaskinen eller spenarna. Dessa kan i sin tur kontamineras av luft, vatten, liggbås/strömedel, avföring, foder, jord samt växter på betet. Vidare har spenarna också en

naturlig bakterieflora där släktena *Aerococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, och *Bifidobacterium* ofta ingår. Detta bör dock till viss del vara individuellt och variera mellan besättningar.

Men hur stor inverkan har bakterierna i fodret på mjölkens innehåll av mikrobiota? Hypotetiskt bör det påverka om det finns 100 eller 100 000 bakterier av en art per gram foder, då det påverkar chanserna att livskraftiga bakterier av denna art tar sig till spenarna och in i mjölken. Tar sig flera bakterier av en art in i mjölken ges de en konkurrensfördel vilket kan påverka andelen av dessa bakterier i förhållande till andra efter lagring. Fynden av Monsallier *et al.* (2012) styrker denna tes då de såg att kor som fodrats med ensilage hade fler *Lactobacillus* i mjölken än de kor som fått hö. De såg också att kor på gårdar där färre hygienåtgärder kring mjölkningen utfördes bland annat hade mer *Lactobacillus* och *Enterococcus* i mjölken, vilket tyder på att dessa kommer med i mjölken om de inte tvättas bort. Utöver antalet bakterier har även typen av bakterie betydelse då vissa bakterier har bättre förmåga att etablera sig i och på juvret.

Fodrets mikrobiota bör alltså ha en viss inverkan på mjölkens mikrobiota. Från Tabell 13 ses att proportionen av bakterier från familjen Peptostreptococcaceae i mjölken tycks bero på lagringsmetod av grovfodret. Även bakterier från familjen Clostridiaceae tenderar att påverkas av detta. För att koppla tillbaka till Hypotes 1: Vilka bakteriesläkten i tankmjölken kan ha sitt ursprung i fodret? anser jag att vi från Tabell 14 har identifierat sex släkten som kan ha sitt ursprung i fodret: *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea* och *Pseudomonas*. Det finns troligtvis ytterligare en hel del bakterier som kan ha sitt ursprung i fodret, vilket diskuterats ovan. Dessa släkten är dock de som jag anser är mest intressanta att gå vidare med för att undersöka hur de påverkas av fodrets mikrobiota och foderbyten etc.

Påverkas ystningsresultaten av dessa bakterier?

Flera av de nämnda bakteriesläktena kan påverka ystningsprocessen, både positivt och negativt. *Acinetobacter* och *Pseudomonas* är kända produktförstörare och släktet *Stenotrophomonas* ses som negativt i ost, även om dess påverkan på smaktutvecklingen är liten (Quigley *et al.*, 2013). Släktena *Lactobacillus* och *Leuconostoc* är av teknologiskt intresse i osttillverkningen och arter av dessa ofta används i starterkulturer. Båda släktena innehåller även flera non- starter LAB som kan överleva pastöriseringen och sedan påverka smak- och strukturutvecklingen på osten (Quigley *et al.*, 2013). Med större kunskaper om hur fodret kan påverka mjölkens mikrobiota kan det därför vara möjligt att minska eller öka mängden av dessa bakterier i mjölken för att få önskat ystningsresultat.

Etapp 2

Hygienisk kvalitet i grovfoder

I de hygieniska proverna undersöktes effekten på fodret av lagringsmetod och förekomst av olika tillsatsmedel. I Tabell 17 och Tabell 18 kan vi se att ingen signifikant skillnad kan ses i mängd enterobakterier och klostridiesporer. Däremot ses skillnader i mängd jäst, mögel och mjölksyrabakterier.

Resultaten i tabellerna liknar varandra och det är svårt att veta vad som är orsak och verkan gällande lagringsmetod och tillsatsmedel. Av de prov som inte behandlats med något tillsatsmedel var alla rundbalar. Av de som behandlats med kemiskt medel var två från plansilo och en från rundbal, resterande prov från plansilo och alla från tornsilo hade

behandlats med syrabaserat tillsatsmedel. Detta medför att gruppen med balar är starkt korrelerad med proven utan ensileringsmedel och gruppen med tornsilos korreleras med syrabaserat tillsatsmedel. Ändå kan vissa slutsatser hypotiseras med hjälp av litteraturen.

Enterobakterier och klostridiesporer

Inom samtliga grupper var mängden enterobakterier och klostridiesporer låg, nära detektionsgränsen, samtidigt som mängden mjölksyrabakterier var på den förväntade nivån 10^7 (Pahlow *et al.*, 2003). Detta tyder på en generellt lyckad ensileringsprocess där enterobakterierna snabbt konkurrerats ut och haft begränsade möjligheter att bryta ner de klostridiehämmande nitriterna i fodret (Heron *et al.*, 1993).

Jäst och mögel

Analyserna av jäst och mögel visade en signifikant skillnad mellan rundbalar, tornsilo och plansilo. Tornsilo hade den högsta halten mögel. Det tyder på närvaro av syre, vilket krävs för mögeltillväxt. Förekomst av syre i silon kan bero på otillräcklig packning till följd av hög torrsbstanshalt i övre lagren (Sundberg *et al.*, 2003). Vid uppdelning på förekomst av ensileringsmedel ses att proven med syratillsats innehåller mer mögel än proven utan tillsatsmedel och de med kemtillsats. Anledningen till det kan vara att alla prover från tornsilos finns representerade inom gruppen med syratillsats vilket höjer dess genomsnittliga värde. Eller så kan det vara så att det kemiska tillsatsmedlet är effektivare mögelhämmande även vid inblandning av syre.

Skillnader i mängd jäst och mögel sågs mellan rundbalar och tornsilo/plansilo där rundbalarna innehöll mer jäst men mindre mögel. Både jäst och mögel kan växa under lagring i närvaro av syre, trots lågt pH (Sundberg *et al.*, 2003). Alla rundbalar pressades i kombimaskin där plastning sker omedelbart efter pressning. Detta bör minimera mängden syre jämfört med plansilos där inläggningen pågick i 2 – 3 dygn och kan förklara den låga mängden mögel i rundbalarna. Däremot tycks det märkligt att rundbalarna har mer jäst än silos och orsaken är svår att fastslå. Enligt Sundberg *et al.* (2003) växer jäst till snabbare än mögel vid skada på plast eller öppnande av balen. Men det tycks långsökt att en tillräcklig mängd balar ska ha fått skada på plasten innan foderprovtagning, för att ge signifikanta skillnader i mängd jäst mellan lagringsmetoderna. En möjlig bidragande orsak kan vara frånvaron av ensileringsmedel i balarna då detta ger ett mer lagringsstabil foder (O’Kiley, 2009). Jämfört med de syra-behandlade proven av plansilo/tornsilo är det möjligt att jäst i proven från rundbalarna hann växa till från det att balarna öppnades tills syret tog slut i de förslutna provpåsar provet placerades i. Detta verkar dock mindre troligt på grund av vinterkylan vid provtagningarna.

Mjölksyrabakterier

I tabellerna ses att rundbalar jämfört med silos har mer mjölksyrabakterier odlade på s-b medium (*Enterococcus*). I Tabell 18 ses också en tendens till skillnad i mjölksyrabakterier odlade på rogosa medium (*Lactobacillus*, *Pediococcus* och *Leuconostoc*), där proverna som behandlats med syratillsats har mindre mängd mjölksyrabakterier. Enligt O’Kiley (2009) verkar syrabaserat ensileringsmedel hämmande både mot oönskade mikrober och mot mjölksyrabakterier. Vidare beskriver Daeschel *et al.* (1987) att *Ec. faecalis* och *Le. mesenteroides* inleder ensileringsprocessen varpå de mer syratoleranta *Lactobacillus* tar över. Det är därför möjligt att *Ec. faecalis* och *Le. mesenteroides* i våra prover inte fått samma betydelse i ensileringsprocessen på grund av att tillsatta syror redan sänkt pH. Istället kan bakterierna inom släktet *Lactobacillus* ha tagit vid tidigare, vilket resulterar i att mängden *Lactobacillus* är samma oberoende av närvaro av tillsatsmedel, men att mängden *Enterococcus* och *Leuconostoc* i fodret blivit lägre vid syratillsats, vilket ger skillnaderna som ses i Tabell 17 och Tabell 18. Ser vi i Tabell 14 från Etapp 1, finns ett prov där syrabaserat

ensileringsmedel tillsatts (grovfoderprov 7). I det provet utgör *Lactobacillus* 76,6 % av bakteriefloran samtidigt som varken *Enterococcus*, *Leuconostoc* eller *Pediococcus* uppmätts.

Även de tre proven med kemiskt tillsatsmedel innehåller en lägre mängd *Enterococcus* än proven utan tillsatt ensileringsmedel. Det kemiska tillsatsmedlet är i sig bakteriehämmande (O’Kiley, 2009) vilket skulle kunna göra att de mindre syratoleranta *Enterococcus* hämmas både av ett lågt pH och bakteriehämmande konserveringsmedel och antalet vitala bakterier inom släktet minskar.

Påverkas mjölkens mikrobiota av ensileringsmedel?

Enligt dessa resultat kan vi hypotisera att två släkten av bakterier hämmas vid närvaro av kem- och syrabaserat ensileringsmedel; *Enterococcus* och *Leuconostoc*. Detta samtidigt som mängden *Lactobacillus* tycks vara konstant. *Leuconostoc* är ett av de släkten av bakterier i mjölk som möjligen kan påverkas av fodrets mikrobiota (se: Påverkas mjölkens bakterieflora av foder?). Det är därför möjligt att mängden *Leuconostoc* kan påverkas av användande av kem- eller syrabaserat ensileringsmedel i grovfodret till de mjölkande korna.

Påverkas fodrets mikrobiota av lagringsmetod?

För att koppla tillbaka till andra hypotesen; Hur kan hanteringen av grovfoder påverka dess bakterieflora? Enligt de resultat som erhållits i Etapp 2 ser det ut som att rundbalarna, som packats med kombimaskin där plastning sker omedelbart efter pressning, verkar hålla lägre halt mögel än övriga lagringsmetoder, trots att rundbalarna inte behandlats med ensileringsmedel. Detta bör bero på effektivt avlägsnande av syre i fodret. Det verkar också som att avsaknaden av ensileringsmedel (syra och kem) i rundbalarna gör att de har större mängd mjölksyrabildande bakterier.

Sammanfattning

Studien visar att det är troligt att en hel del bakterier i mjölken kan ha sitt ursprung i fodret. Det är svårare att säga hur mycket mängden av dessa bakterier i mjölken påverkas av fodrets mikrobiota. Några förslag på bakteriesläkten som kan påverkas av fodret är *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea* och *Pseudomonas*. Flera av dessa är också av vikt vid ostproduktion. Vidare forskningsfrågor för att undersöka detta ytterligare bör vara i hur stor utsträckning mjölkens bakterieflora påverkas av fodrets bakterieflora? Ändras det snabbt, eller tar det längre tid? Man kan till exempel tänka sig att vissa bakterier finns kvar i spenarnas bakterieflora under längre tid, samtidigt som andra snabbt konkurreras ut.

Fodret å sin sida påverkas både av lagringsmetod och av tillsatt av ensileringsmedel. Rundbalar plastade i kombimaskin verkar generellt innehålla mindre mögel än olika typer av ensilage från silos. Foder som behandlats med syra- eller kembaserat ensileringsmedel verkar också innehålla lägre andel *Enterococcus* och *Leuconostoc* än de som behandlats med ensileringsmedel samtidigt som mängden *Lactobacillus* är konstant. Då mängden *Leuconostoc* i mjölken tros kunna påverkas av mängden i grovfodret är det möjligt att närvaro av nämnda ensileringsmedel minskar mängden *Leuconostoc* i mjölken.

Referenslista

Artdatabanken (2016). Tillgänglig på: <http://artfakta.artdatabanken.se/taxon/5000052> (2019-01-14).

Bashan, Y & de-Bashan, L. E. (2005). Bacteria – Plant growth promoting. I Hillel, D., Hatfield, J. L., Powlson, D. S., Rosenzweig, C., Scow, K. M., Singer, M. J. & Sparks, D. L. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, pp. 103-115.

Daeschel, M. A., Andersson, R. E. & Fleming H. P. (1987). Microbial ecology of fermenting plant material. *Federation of European Microbiological Societies*, Vol. 46 (3), pp. 357-367.

Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C. & Vorholt J.A. (2009) Community proteogenomics reveals insight into the physiology of the phyllosphere bacteria. *PNAS*, Vol. 106 (38), pp. 16428-16433.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (2006a). *The prokaryotes – Volume 3*. Tredje upplagan. New York, Springer.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (2006b). *The prokaryotes – Volume 5*. Tredje upplagan. New York, Springer.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (2006c). *The prokaryotes – Volume 6*. Tredje upplagan. New York, Springer.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (2006d). *The prokaryotes – Volume 7*. Tredje upplagan. New York, Springer.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (2006e). *The prokaryotes – Volume 13*. Tredje upplagan. New York, Springer.

Greppa näringen (2014). *Kogödsel som strömedel*. Tillgänglig på: http://www.greppa.nu/download/18.724b0a8b148f52338a327a9/1413539530007/Kogödsel+som+strömedel_DU+2014+FINAL_0808.pdf (2018-02-27)

Heron, S. J. E., Wilkinson, J. F. & Duffus, C. M. (1993). Enterobacteria associated with grass and silages. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 75 (1), pp. 13-17.

Hibberd, A. A., Lyra, A., Ouwehand, A. C., Rolny, P., Lindegren, H., Cedgård, L. & Wettergren, Y. (2017). Intestinal Microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ open gastroenterology*. Vol 4 (1).

Illumina (2016). *Illumina sequencing by synthesis*. Tillgänglig på: <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

KI (2008). *Kompendium I Bakteriologi*. Tillgänglig på: https://pingpong.ki.se/public/pp/public_courses/course05874/published/1289756271011/resourceId/3959359/content/infoweb/node-2181658/Bakt_V07.pdf (2018-09-06).

Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C. & Vorholt, J. A. (2011). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal*, Vol 2012 (6), pp. 1378-1390.

Krause D. O. & Russell J. B. (1996). How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science*, Vol. 79 (8), pp. 1467-1475.

Legg, A. K., Carr, A. J., Bennett, R. J. & Johnston, K. A. (2017). Chapter 26 – General Aspects of Cheese Technology I McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D. & Ewerett, E. W. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4e Upplagan

LRF (2014). *Gramnegativa bakterier*. Tillgänglig på: <https://www.lrf.se/om-lrf/organisation/branschavdelningar/lrf-mjolk/expertomraden/mjolkkvalitet/mjolkkvalitet/produktforstorande-bakterier/gramnegativa-bakterier/> (2018-03-15).

Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J. & Heyndrickx, M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed dairy milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8.

McSweeney, P. L. H. (2017). Chapter 14 – Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview I McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D. & Ewerett, E. W. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4e Upplagan

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin B. & Montel M-C. (2012). Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practice and individual dairy cow characteristics. *Dairy Science and Technology*, Vol. 92 (3) pp. 265-278.

Müller, B., Sun, L., Westerholm, M. & Schnürer, A. (2016). Bacterial community composition and *fhs* profiles of low- and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Biotechnol Biofuels*, Vol, 9. Nr. 48.

O’Kiley, P. (2009). Chemical additives and the aerobic stability of silage. Proc. International Symposium on forage Quality & Conservation, Sao Pedro, Brazil. eds: L.G. Nussio & M. Zopollatto, FEALQ, Piracicaba, Brazil. p.155-174.

Oliviera, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. O., Cervantes, A. A. P., Arriola, K. G., Jiang, Y., Kim, D., Li, X., Goncalves, M. C. M., Vyas, D. & Agesogan., A. T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Vol 100 (6), pp. 4587-4603.

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. W. H. & Spoelstra, S. F. (2003). *Silage Science and Technology*. Wisconsin. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.

Parvin, S. & Nishino, N. (2009). Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. *Journal of Applied Microbiology*, Vol 107 (6), pp. 2029-2036.

Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *Federation of European Microbiological Societies*, Vol. 37 (5), pp. 664-698.

Slobodkin A. (2014) The Family *Peptostreptococcaceae* I In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes* (Vol 4). Springer, Berlin, Heidelberg

Stackebrandt E. & Jones D. (2006). The Genus *Brochothrix* I Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. *The Prokaryotes*. Tredje upplagan. New York, Springer. pp. 477 – 491.

Sundberg, M., Emanuelsson, M. & Lingvall, P. (2003). *Ensilering av vallfoder*. Hållsta: Svensk Mjölk. (Kvalitetssäkrad Mjölkproduktion).

Sundberg, M., Pauly, T. & Spörndly, R. (2012). Inverkan av korta inläggningsavbrott på ensilagekvalitet i plansilor – Modellförsök. Rapport 407, Lantbruk & Industri. JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik, Uppsala.

Vacheyrou, M., Normand, A-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. & Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 146 (2) pp. 253-262.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 2012 (10) pp. 828-840.

Växa (2016). *Resultat stalltyp medel lista*. Icke offentlig publikation. (2018-01-16)

Växa (2017). *Husdjursstatistik*. Tillgänglig på:
https://www.vxa.se/globalassets/dokument/statistik/husdjursstatistik_2017.pdf (2018-03-22)

Bilaga 1

Frågor till lantbrukare, telefonintervju

Det foder jag frågar efter är det som ges till korna i anslutning till hämtning av mjölk för ystning och foderprover och därför kan påverka mjölkens bakterieflora vecka 44 – 46.

Grovfoder

Idag och de närmsta veckorna.

- Ensilage/hösilage/hö?
- Används
 - Vall – Ålder på vallen? Hur mycket klöver?
 - Helsäd – Sammansättning av spannmål?
 - Flera sorter – Hur stor andel av varje?
- Halm?

Lagringsmetod

- Rundbal/plansilo/torn?
- Hur lång tid till plastning?
- Tillsatsmedel?

Har några förändringar skett i skördesystemet? (Berätta vad de svarade senast)

TS-halt i fodret? Blött/torrt?

Hur lång tid efter inplastning flyttades balarna?

Skördedatum?

Kraftfoder

Idag och de närmsta veckorna.

- Hemodlat/köpt, vilken sort?

Utfodring

Kolla om det är någon förändring sedan senast.

- Hur ser utfodringen ut, TMR/blandfoder/uppdelat?
- Hur många givor grovfoder/dag? Puttar till foder?
- Hur många givor kraftfoder/dag och hur stor del av fodergivan är kraftfoder?
- Hur ofta rengörs foderbord?
- Har korna fortfarande tillgång till utomhusvistelse?

Finns någon foderstat vi kan få tillgång till, som ett exempel på en ko som mjölkar 30 kg?

Eventuell analys av grovfodret?

Djuren

- Finns förändringar i mjölkningsrutiner ink rengöring? (Stäm av med tidigare svar)
- Antal mjölkningar i roboten.
- Finns förändring i djurantal?
- Har det gjorts inköp av djur?
- Förändring i sammansättning av raser?

Datum för betessläpp och installning 2016.

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15 eller 30 högskolepoäng) samt större enskilda arbeten (15-30 högskolepoäng) utförda och/eller handledda vid Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap, SLU.

DISTRIBUTION:
Sveriges Lantbruksuniversitet
Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap
901 83 UMEÅ
www.slu.se/njv