



**Spansk skogssnigel (*Arion lusitanicus*) i  
ensilerat vallfoder – betydelse för fodrets  
näringsinnehåll och hygieniska kvalitet**

*Slugs (*Arion lusitanicus*) in Grass Silage  
– Significance for Nutrient Values and Hygienic quality*

av

**Cathrine Haaga**

---

**Institutionen för husdjurens utfodring och vård  
Sveriges lantbruksuniversitet**

**Examensarbete 382  
30 hp A2E-nivå**

***Department of Animal Nutrition and Management  
Swedish University of Agricultural Sciences***

***Degree project 382  
30 credit A2E-level  
Uppsala 2012***

---





# **Spansk skogssnigel (*Arion lusitanicus*) i ensilerat vallfoder – betydelse för fodrets näringsinnehåll och hygieniska kvalitet**

*Slugs (*Arion lusitanicus*) in Grass Silage  
– Significance for Nutrient Values and Hygienic quality*

av

**Cathrine Haaga**

**Handledare/ Supervisor:** Rolf Spörndly  
**Examinator/ Examiner:** Jan Bertilsson

**Nyckelord/ Key words:** Sniglar, ensilage, foderkvalitet / *Slugs, silage, feed quality*

---

**Institutionen för husdjurens utfodring och vård  
Sveriges lantbruksuniversitet**

**Examensarbete 382  
30 hp A2E-nivå  
Kurskod EX0408**

***Department of Animal Nutrition and Management  
Swedish University of Agricultural Sciences***

***Degree project 382  
30 credit A2E-level  
Course code EX0408  
Uppsala 2012***

---

## Innehåll

Abstract .....	3
Sammanfattning .....	3
Introduktion .....	4
Litteratur .....	4
Sniglar och snäckor .....	4
Spansk skogssnigel, <i>Arion lusitanicus</i> .....	4
Bakterier hos sniglar och snäckor .....	5
Snäckor som värdjur för parasiter .....	6
Konservering av grönmassa .....	7
Fermentation .....	7
Respiration och protolys .....	8
Mikroorganismer .....	8
Näringsförluster .....	12
Klassificering av ensilage .....	12
Näringsvärden i ensilage .....	13
Hygienanalyser .....	14
Material och metoder .....	16
Resultat .....	19
Diskussion .....	23
Slutsats .....	24
Tillkännagivanden .....	24
Källförteckning .....	25



Foto: Cathrine Haaga

## Abstract

This work is about silage contaminated with slugs (*Arion lusitanicus*). The hypothesis was: Do slugs affect the nutritional value and hygiene quality of silage? During the winter season 2007/2008 silages were discarded in big amounts due to the contamination of slugs. Both the Swedish Farmer Association (LRF) and the National Veterinary Institute (SVA) received phone calls from farmers and animal owners about contaminated silage. The Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) and SVA decided to initiate this project as a master thesis. The experiment was performed in Uppsala at SLU Kungsängen research centre and at SVA. The slugs were collected from an affected area in Horred in the southwest parts of Sweden and brought together with unaffected grass wilted to two different dry matters (DM), 35 % and 65 %. The lower DM was also treated with an additive. Three different levels of slugs were mixed up in each DM level and completed with a control group. Each treatment was made in triple. Total numbers of silage samples were 36. The results pointed out that the slugs contained lactic acid bacteria and content of lactic acid were higher in silage containing slugs compared to controls (no slugs). Enterobacteria, spores of *Clostridium tyrobutyricum* or moulds did not increase in silages with slugs added. The yeast count tended to increase at the highest addition of slugs. The general conclusion is that the addition of slugs to grass did not deteriorate the silage quality in this study.

## Sammanfattning

Detta examensarbete baseras på en studie av ensilage av vallfoder blandat med spansk skogssnigel (*Arion Lusitanicus*). Frågeställningen var: Har inblandningen av sniglar i ensilerat vallfoder någon inverkan på ensilagens näringsinnehåll och betydelse för dess hygieniska kvalitet? Under vintersäsongen 2007/2008 kasserades ensilage kontaminerat med sniglar för stora summor i Sverige. Både Lantbrukarnas riksförbund (LRF) och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) fick ta emot telefonsamtal från bekymrade lantbrukare och djurägares angående ensilage innehållande sniglar. Ett samarbete mellan Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och SVA togs fram för att undersöka frågeställningen och resulterade i detta examensarbete. De praktiska undersökningarna har utförts på Kungsängens forskningscentrum vid SLU i Uppsala och vid SVA i Uppsala. Från orten Horred i Hallands län i sydvästra Sverige insamlades spansk skogssnigel (*Arion Lusitanicus*). Dessa blandades med snigelfri grönmassa från Uppsala och torkades till två olika torrsustanser (ts) 35 % (låg) och 65 % (hög). Den lägre ts-halten behandlades även med tillsatsmedel (låg ts bh). En kontrollnivå (0) utan sniglar och tre olika nivåer (1, 2 och 3) med sniglar tillsattes de tre grönmassorna (låg, låg bh och hög). De fyra behandlingarna upprepades tre gånger. Totalt 36 prover. Både sniglar och grönmassa identifierades innan blandning. Kemiska analyser genomfördes på de två grönmassorna och de tre ensilagen. Mikrobiologiska analyser genomfördes på de två grönmassorna, de tre ensilagen och en mix av sniglar blandade med snigelfekalier. De erhållna resultaten visade på att sniglarna själva innehöll mjölksyrabakterier och att ensilage med sniglar innehöll mer mjölksyra än kontrollerna. Halten av enterobakterier, smörsyra sporer och mögel i ensilaget förhöjdes inte genom inblandning av sniglar till grönmassan. Halten jäst ökade dock något vid den högsta inblandningen. Det gick inte att med konventionella kvalitetskriterier för ensilage påvisa en försämrad kvalitet i ensilage som kontaminerats med sniglar i denna studie.

## Introduktion

Under vintersäsongen 2007/2008 kasserades ensilage i de västra och sydvästra delarna av Sverige för stora summor till följd av att sniglar (*Arion lusitanicus*) kommit med in i fodret vid skörd och att ensilaget betraktats som obrukbart. Både Lantbrukarnas Riksförbund (LRF) och Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) fick ta emot många samtal från oroliga lantbrukare angående problem med sniglar i betesvall och i ensilage under sommar och höst 2007 samt vintern 2008 (Eksvärd, 2008; Hultén, 2008). Under våren 2008 genomförde LRF en enkätundersökning för att kartlägga problemet som visade att vissa lantbrukare var helt förskonade och andra mycket hårt drabbade (Eksvärd, 2008). Institutionen för Husdjurens utfodring och vård vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) bestämde sig för att undersöka hygien och näringsinnehåll i ett sådant ensilage i samarbete med SVA, vilket resulterade i detta examensarbete. Hur påverkas näringsinnehållet och den hygieniska kvalitén i ensilage? Litteratur som berör kvaliteten av ensilage som kontaminerats med sniglar har inte stått att finna. I detta examensarbete insamlades vilt levande sniglar från fält för att inblandas i grönmassa med två olika torrsubstans halter (35 % och 65 %) och med tre nivåer med olika antal sniglar samt kontroller (0 sniglar). Proverna skedde i triplikat, totalt producerades 36 ensilageburkar.

## Litteratur

### *Sniglar och snäckor*

#### **Spansk skogssnigel, *Arion lusitanicus***

I Sverige finns 22 snigelarter och av dessa är 12 tillförda den svenska faunan från andra länder (introducerade) (v. Proschwitz, 1989; 2008). Snigel- arten *Arion Lusitanicus* (AL) (bild 1) är en introducerad art och hör till släktet blötdjur och saknar skal till skillnad från snäckor.



Bild 1. Vuxen *Arion lusitanicus*. Foto: Cathrine Haaga

Artens svenska namn är Spansk skogssnigel och går även under trivialnamnet mördarsnigel, på grund av sin glupska aptit. AL registrerades första gången i Sverige 1975 (v Proschwitz, 1996). I dagsläget finns arten rapporterad från södra delarna av Sverige upp till Dalälven samt enstaka fall från norra delarna av Sverige. De sydvästra delarna är mer representerade än övriga delar av riket, främst områden runt storstäder och större samhällen. På senare tid har rapporterats om förekomst av AL i fält (Eksvärd, 2008; Hultén, 2008). De övriga nordiska länderna Norge, Danmark och Finland rapporterade sina första fall av AL 1988-1994 (v. Proschwitz, 2008). Spridning av arten har med största sannolikhet skett via människan genom, plantor, jord, trädgård till trädgård och trädgård till åker. AL är robust, extremt tålig, har stor

reproduktions hastighet, ett aggressivt åt- beteende och är invasiv (v. Proschwitz 1992). Artens livscykel kan sägas börja på hösten då i stort sett alla vuxna individer dör och endast mycket unga juveniler överlever genom att gräva ned sig och övervintra i jordhålor på 10-20cm djup (Grimm, 2001; v. Proschwitz, 2008). På våren, april-maj, vid en temperatur runt +4° C stimuleras sniglarna till aktivitet och blir sexuellt aktiva. *AL* är självbefruktande (hermafrodit), men kan även utbyta spermiepaket med egna artfränder eller annan snigel- art, exempelvis svensk skogssnigel och producera hybrider. Varje individ kan producera upp till 400 ägg under sin livstid (en sommar), 10-30 ägg läggs vid varje äggläggning vilket sker i omgångar. Äggen kläcks efter 4 veckor och efter ytterligare 4 veckor är snigeln fullt utvecklad och kan reproducera sig. En individ ger i genomsnitt upphov till två generationer under en sommar. Faktorer som påverkar snigelns och äggens överlevnad är fuktighet (måste ha fukt annars torkar de ut), temperatur (vid sträng kyla fryser de ihjäl), torka (torkar ut och dör), markens beskaffenhet (sand och lera är ogynnsamt, för torrt respektive för kompakt) och fiender (fåglar, skalbaggar och karnivora sniglar). I Sverige bekämpas *AL* med kemiska bekämpningsmedel som Ferramol (järnIIIfosfat) och andra länder tillåts även metaldehyd och carbamat (saluförs som pellets) (Speiser 2002). De två sistnämnda preparaten är även giftiga för fåglar, däggdjur, fiskar och andra vattenlevande organismer (Mellqvist, 2008). Andra metoder för att hejda invasion av *AL* är att lämna 20cm stubb vid skörd och därmed skapa en torr och ogynnsam miljö, korta rotationsintervaller på vallar och grödor. Jordbruksverket har i samarbete med Hushållningssällskapet Sjuhärad genomfört experiment med olika typer av strängläggning av slagen vall i kombination med olika tork- tider (Mellqvist, 2008). I vårt västliga grannland Norge är problem med *AL* mycket stora och området Bergen har varit mycket hårt drabbat enligt Haukeland (2008). Laborativa experiment har utförts med rundmaskar (nematoder, *Phasmarhabditis hermaphrodita*) för att begränsa antalet sniglar (Wilson *et al.*, 1993; Speiser *et al.*, 2001; Grimm, 2002; Haukeland, 2008). Nematodernas inverkan gör att sniglarna slutar äta och svälter ihjäl och har en fatal inverkan främst på unga individer av arten. Andra arter av sniglar kan bli angripna av nematoderna då de inte är art-specifika och på lång sikt kan den biologiska mångfalden påverkas negativt (Morand *et al.* 2004). I Holländska försök har Ester (2008) kunnat påvisa att saponiner har motverkande effekt på Golden Apple Snails (GAS), en snäck- art som förekommer i Sydamerika. I övrigt förespråkar Haukeland (2008) barriärer, regelbunden kultivering, insamling och fällor samt information för att hejda *AL*:s framfart. Vid studier genomförda i Holland i grödan sockerbeta var antalet sniglar fångade med fällor 5 till 125 vid varje fångstillfälle under perioden början på mars till den första juni och vikten hos sniglarna varierade mellan 0,06g till 0,70g (Ester, muntligen 2008).

## Bakterier hos sniglar och snäckor

Få studier är gjorda på bakterier från mag- och tarmkanalen hos sniglar och snäckor och resultaten skiljer sig mellan arter och geografisk härkomst (Charrier *et al.*, 2006). Charrier *et al.* (2006) fann att den genomsnittliga mängden bakterier i mag- och tarmkanalen uppgår till  $5,10^9$  CFU g<sup>-1</sup> (koloni- formade enheter per gram). Den geografiska härkomsten visade på skillnader i bakteriefloran hos den ätliga snäckan Vinbergssnäckan (*Helix pomatia*). Den svenska arten innehöll bakterier som *Buttiauxella*, *Citrobacter* och *Kluyvera*, men saknade *Enterococcus*, *Enterobacter* och *Obesumbacterium* vilka har återfunnits hos den franska. En riklig förekomst av enterobakter iaktogs hos den franska varianten av *H. pomatia*, medan streptokocker representerade ett lägre antal speciellt hos den svenska arten av *H. pomatia*. Båda innehöll rikliga mängder av *Lactococcus*, vilket inte ätliga snäck-arten *Cornu aspersum* gjorde. Bakterier hos *C. aspersum* innehöll en blandning av ovan nämnda samt *Raoultella* och *Clostridium* (Lesle *et al.*, 1990; Watkins and Simkiss, 1990). Studier har visat att snäckornas bakterieflora kan degradera och fermentera huvudkomponenterna hos växter som lösliga



sockerarter och polymerer, dock ej bryta ned beståndsdelar från svampar (Charrier *et al.*, 2006). I digestionskanalen hos *H. pomatia* fanns bakterier som kunde fermentera arabinogalactan och/eller stärkelse (Fransk) eller pektin (Svensk). Till skillnad från snigeln *A. L.* (v. Proschwitz, 2008) kan inte de ätbara snäckorna *H. pomatia* och *C. aspersum* bryta ned cellulosa (Charrier *et al.*, 2006).

Potmac horse fever (PHF) är en sjukdom som drabbar hästar på bete i de norra delarna av Kalifornien (Reubel *et al.*, 1998). Resultat från två studier från norra Kalifornien pekar på att sjukdomen, med största sannolikhet, orsakas av bakterien *Ehrlichia risticii* (Barlough *et al.*, 1998; Reubel *et al.*, 1998). Gruppen av bakterien är oftast förknippad med fästingar och orsakar influensa liknande symtom som feber och huvudvärk samt reducerar antalet vita blodkroppar (leukocyter), bakterierna orsakar även leverskador (Brock *et al.*, 2006). I Kalifornien har bakterien *E. risticii* har kunnat påvisas hos vattenlevande snäckor (*Juga* spp) (Reubel *et al.*, 1998). Från det området där hästar betat och insamling av snäckor gjorts kunde sekvensanalysen av gener från källorganismen med *E. risticii* uppvisa identiska gener med *E. risticii* stam hos häst. Vattendragen där snäckorna insamlades var lokaliserade på betesmarker där drabbade hästar betat. Analys av de undersökta generna indikerade på närvaro av geografiska kluster av *E. risticii* stammar. DNA från *E. risticii* har återfunnits i högre grad i sekretionen från färksvatten-snäckor, än från hela eller delar av dessa. Eftersom DNA från hela snäckan återfinns i sekretionen är bakterie-DNA troligt utspädd. Vad snäckan spelar för roll i bakteriens livscykel är ännu okänt. Av 57 studerade vattenlevande snäckor (*Juga* spp) bar 3,5 % på *E. risticii* (Barlough *et al.* 1998). Inget bakterie-DNA har återfunnits i vävnad från snäckorna. Det är tänkbart att hästar kan bli exponerade för *E. risticii* genom att konsumera vegetationen där en värdorganism finns eller att dricka vattnet på bete. När snäckor exponeras för temperatur över 22° C frigör trematoder i larvstadium (*virgulate cercariae*) bärandes på *E. risticii* (Reubel *et al.*, 1998). I vattnet kan sannolikt infekterade trematod-larver finnas efter det att snäckor utsöndrat dessa efter en varm period. Den säsongsbundna uppkomsten av PHF under tidig vår, sommar och tidig höst skulle således kunna förklaras. Om snäckor spelar en roll i trematodernas livscykel bör även andra snäckarter vara involverade.

## **Snäckor som värdjur för parasiter**

Parasiterna stora och lilla leverflundrans livscyklar påminner mycket om varandra där båda måste ha en snäcka som mellanvärd, sumpsnäcka respektive landsnäcka (Hegrestad, 2008; Rudby-Martin, 2008). Den lilla leverflundran behöver dessutom en myra som mellanvärd under sin livscykel. Båda parasiterna kan infektera många arter: får, nötkreatur, vilda idisslare och hare. Ytterligare ett potentiellt värdjur för stora leverflundran är häst. Symtom som förekommer hos värdjuren är nedsatt tillväxt, diarré, blodbrist, mindre mjölmängd och nedsatt aptit, hos får även ödem i käftgropen. När det gäller stora leverflundran kan det ta upp till fyra månader innan infektion kan påvisas från det att djuret smittats. Ytterligare bevis på förekomst av parasiten kommer som regel från slakteriet med anmärkning eller kassation av levern vid slakt (Rudby-Martin, 2008). Av samtliga slaktade kor i Sverige under 2007 hade 3 % anmärkning av stora leverflundran och 4,8 % anmärkning av lilla leverflundran (Hegrestad, 2008). Mellan åren 2005 och 2007 har anmärkningsfrekvensen för ko och stut ökat med 10 % respektive 27 % för båda typer av leverflundror. Hegrestad (2008) menar att den anmärkningsfrekvensen beror i hög grad på typ av betesmark. Den lilla leverflundran blir vanligare på torra betesmarker och den stora leverflundran verkar minska på sanka marker. Äggen från lilla leverflundran kan överleva i månader i torra betesmarker och är därmed svåra att sanera bort. Den lilla leverflundran förekommer mest i de östliga delarna av Sverige, medan den stora leverflundran är vanligare i de västra och sydvästra delarna (Rudby-Martin,



2008). Eftersom sumpsnäckan trivs på blöta och sankta marker har rekommendationerna varit att låta djur beta på torra betesmarker, men med mycket blöta betesmarker under 2007 ställer Rudby-Martin sig frågan om rådande normer räcker till. Vidare befaras att om betessäsongerna blir längre, varmare och blötare kan detta gynna den stora leverflundran och refererar till Storbritannien/Irland som hittills varit hårdare drabbat än Sverige.

## **Konservering av grönmassa**

Vid konservering av gräs tillämpas två olika metoder, höbärgning eller ensilering med olika torrsubstans (ts)-halter (Spörndly *et al.*, 1988). Den första metoden innebär att torka grönmassan till en torrsubstans (ts)-halt på 80-85% för att sedan samla ihop det i balar eller rullar. Den andra metoden är att konservera, ensilera, grönmassan till ensilage genom fermentation med hjälp av mjölksyra. Ensilering sker vid ts-halter mellan 15-50 %. Den senare metoden gör det möjligt att kunna bärga grönmassan under sämre väderförhållanden än vad som krävs vid den första metoden som i regel kräver uppehåll och sol under en längre tid. Ensilage avsett för nötkreatur har som regel lägre ts-halt, runt 35 %, än vad hösilage avsett för hästar har, runt 60 % (Müller, 2005). På senare år har ensilage blivit vanligare som ett fodermedel till häst. Fördelar med ensilage i jämförelse med hö är att halterna av damm och mögelsporer är lägre. Vid feljäsning av ensilage genom bakterietillväxt av klostridier kan giftet (toxinet) botulin bildas (Brock, 2006). Botulin är ett nervgift som ofta har en fatal utgång och hästar är mycket känsliga för små mängder av toxinet (Sjaastad *et al.*, 2004; Brock, 2006). Genom att analysera ensilaget kan kvaliteten bedömas (Hallén-Landin *et al.*, 2004). Detta görs genom kemiska och mikrobiologiska analyser och kallas gemensamt för hygienanalyser. De kemiska analyserna inbegriper olika parametrar som pH, mjölksyra, lättflyktiga fettsyror, etanol, ammoniumkväve, socker (water soluble carbohydrates, WSC), kväve bundet till amylas (amylase detergent fibre, ADF-N) och nitrat. De mikrobiologiska analyserna består i regel av odling av mjölksyrabakterier (lactic acid bacteria, LAB), klostridiesporer (sporer av *Clostridium tyrobutyricum*), enterobakter, jäst och mögel. Enligt Wilkinson (1999) kan hälsoproblem hos djur orsakat av grovfoder indelas i tre kategorier: oönskade mikroorganismer (listeria, enterobakter, klostridier och mögel), oönskade kemiska substanser (toxiner) samt överskridande halter av syror och andra metaboliska störningar.

## **Fermentation**

Vid fermentation av grönmassan sker en syrefri konservering (McDonald *et al.*, 2002). Den slutliga fermentations- produkten, ensilaget, beror på den ursprungliga grödan, närvaro och tillgänglighet av näringsämnen, temperatur och pH-värde samt närvaron av mikroorganismer. Vid en fermentation där mjölksyrabakterier har den mest gynnsamma situationen reduceras pyruvat till mjölksyra (Brock, 2006). Vid fermentation där jäst har den mest gynnsamma situationen reduceras pyruvat till etanol och frisättning av koldioxid.

I den sönderhackade grönmassan frigörs saft från växterna och blir snabbt tillgängliga för mjölksyrabakterier vilka producerar mjölksyra och ättiksyra (McDonald *et al.*, 2002). De två syror gör att pH snabbt sjunker i ensilaget. Mjölksyrabakterier fermenterar naturligt förekommande socker, huvudsakligen glykos och fruktos, till syror främst mjölksyra. Den ökade produktion av syra bidrar till ökad mängd vätejoner och därmed en allt surare miljö, lågt pH, där andra typer av bakterier som förekommer i grönmassan förhindras, inhiberas, i sin aktivitet. Det kritiska pH-värdet vid vilket inhibering sker varierar med grönmassans ts. Vid en låg ts-halt krävs att mer mjölksyra bildas och ett lägre pH för att inhibera bakterieaktiviteten än vid en högre ts-halt där avsaknaden av vatten bidrar till att hämma bakterietillväxten. Det är svårare att nå det kritiska pH-värdet hos grönmassa med hög buffertkapacitet (Bk). En grönmassa med en ts på 200g/kg och ett pH-värde runt 4,0 är

tillfredsställande konserverat, så länge som silon är lufttät. Skulle syre åter skulle komma i kontakt med grönmassan kommer oönskad mikrobiologisk aktivitet att öka, vanligen först genom tillväxt av jäst sedan även av mögel och bakterier. Grönmassan kan komma att omvandlas till oanvändbar, oätlig och ibland giftig produkt. Genom att inte gynna oönskade mikroorganismer som klostridier och enterobakter kan oönskade fermentationsprodukter undanröjas. Dessa mikroorganismer kan inhiberas genom att stimulera tillväxten av mjölksyrabakterier. Detta kan göras genom att använda kemiska tillsatsmedel, tillsats av utvalda mjölksyrabakterier eller genom tillsats av lämpligt substrat.

## Respiration och protolys

När grönmassa slås aktiveras enzymer som finns i växtmaterialet (McDonald *et al.*, 2002). Respiratoriska och protolytiska processer är av stor vikt och påverkar näringsvärdet i det slutliga ensilaget. Den respiratoriska processen (cellandning) avger koldioxid och vatten då kolhydrater, bl.a. hexos, oxideras. Koldioxid och vatten övergår vanligen till luften. Denna förlust av kolhydrater kan resultera i en uttömning av substrat som under fortsatt fermentation möjligen får negativ effekt. Respirationen pågår så länge det finns både syre och substrat närvarande och så länge växtenzymerna är aktiva. Den enklaste metoden att begränsa respiration är att få en så syrefattig miljö som möjligt vid skörd. I den oslagna grönmassan uppgår det totala kväveinnehållet till 75-90 % som protein. Efter skörd sker en snabb protolytisk process där peptidbindningar hydrolyseras och efter ett par dagar på fält för torkning reduceras proteininnehållet med 50 % (McDonald *et al.*, 2002). Mängden degraderat protein beror på växtens art, ts-innehåll och omgivande temperatur. När väl grödan är ensilerad fortlöper degraderingen, men avtar då värdet på pH sjunker. Produkterna efter protolysen är aminosyror med varierande längd. Vidare nedbrytning sker genom växtenzymerna, men detta bör beaktas som begränsat. Den huvudsakliga nedbrytningen av aminosyror i ensilaget sker av mikrobiell verksamhet.

## Mikroorganismer

På växande gröda är syrekrävande (aeroba) bakterier, svampar och mögel de dominerande mikroorganismerna, så kallad fältflora (McDonald *et al.*, 2002). Vid lagring under syrefattiga (anaeroba) förhållanden ersätts dessa av andra typer av bakterier, svampar och mögel, så kallad lagringsflora. Dessa tillväxer i anaeroba miljöer, exempelvis en silo eller en plastbal. Bakterier som gynnas av anaerob miljö är mjölksyrabakterier, klostridier och enterobakter.

### *Mjölksyrabakterier (Lactic acid bacteria, LAB)*

Mjölksyrabakterier, ofta förkortat LAB efter engelskans Lactic Acid Bacteria, återfinns naturligt på den växande grödan i litet antal, men förökar sig snabbt efter grödan slagits speciellt då grödan hackats eller krossats (McDonald *et al.*, 1991).

När grödan ensileras tillväxer mjölksyrabakterierna genom att fermentera de vattenlösliga sockerarterna till organiska syror, huvudsakligen mjölksyra, vilket sänker pH (McDonald *et al.*, 1991). Även aminosyror, vitaminer, puriner och pyrimidiner är nödvändiga vid en lyckad fermentation (Brock, 2006). LAB förekommer även på bl.a. multnande växtmaterial och i mejeriprodukter (Brock, 2006) och i fiskars inälvor (Vázquez *et al.*, 2008). De är Gram-positiva stavar och cocci-formade bakterier. LAB är fakultativt anaeroba (tillväxer både anaerobt och aerobt) (McDonald *et al.*, 1991; Brock, 2006) till skillnad från andra anaeroba bakterier som är känslig för syre (Brock, 2006). Inom LAB finns två subgrupper, homofermentativ och heterofermentativ, baserat på vad de producerar vid fermentation av socker. Den homofermentativa gruppen producerar endast en produkt, mjölksyra (Brock, 2006) och nyttjar hexos mer effektivt än den andra gruppen (McDonald *et al.*, 1991). Den

heterofermentativa gruppen producerar flera produkter, huvudsakligen etanol och koldioxid men även mjölksyra. Skillnaden mellan dessa två grupper bottnar sig i närvaro/frånvaro av enzymet aldolas, ett nyckelenzym i glykolysen. Hos den heterofermentativa gruppen finns inte enzymet närvarande (Brock, 2006).

### ***Klostridier***

Klostridier finns naturligt i jord, på växande gröda, i ensilage och förekommer också i gödsel (McDonald *et al.*, 1991; Brock, 2006). Tidigare var uppfattningen den att dessa bakterier ursprungligen fanns i tarmkanalen på djur och människor och att förekomsten i jord skulle vara en kontaminering av jorden från gödsel (fekalier). Senare uppfattning är den att förekomsten i tarmregionen skulle bero på vegetabilier med jord på skulle ha konsumerats. Närvaron av klostridier i ensilage är sannolikt en kontaminering av jord eftersom antalet klostridier på den växande plantan är lågt. En alternativ kontamineringskälla skulle kunna vara sörja och slam som skulle kunna innehålla signifikanta nivåer av bakterier i vilotillstånd (McDonald *et al.*, 1991), så kallade sporer (McDonald *et al.*, 1991; Brock, 2006). Klostridier är grampositiva, sporulerande, stavformade och ofta rörliga bakterier som växer under strikta anaeroba förhållanden och fermenterar socker, organiska syror och proteiner (McDonald *et al.*, 1991). Fritt syre inhiberar deras tillväxt och kan döda en del bakterier som inte är i sporstadium. Det finns över 60 olika klostridier och endast sju av dem anses spela en avgörande roll vid ensilering av grönmassa till ensilage. Klostridier kan delas in i två huvudgrupper: saccarolytiska klostridier (*Clostridium butyricum* och *Clostridium tyrobutyricum*) och protolytiska klostridier (*Clostridium bifermentans* och *Clostridium sporogenes*). Den första gruppen fermenterar mjölksyra och vattenlösliga sockerarter till smörsyra (McDonald *et al.*, 1991; Brock, 2006). Den andra gruppen fermenterar aminosyror till ett flertal produkter bl. a. ättiksyra, smörsyra, aminosyror och ammoniak. Naturligtvis finns det undantag som bekräftar regeln då bakterier som *Clostridium perfringens* nyttjar båda fermentationsvägarna. Den mest isolerade förekommande klostridien i ensilage är *C. tyrobutyricum* vars sporer kan överföras till mjölken och vid tillverkning av hårdostar åstadkomma ”blåsta” (stora hål) ostar hos exempelvis Emmental och Grevé. *C. tyrobutyricum* kan ha en ogynnsam inverkan på fermentationen av ensilage, skapa stora förluster och skapa störningar i mejeriet när den via yttre kontamination hamnar i mjölken (Julien *et al.*, 2008). Inom klostridie- släktet finns även bakterier som producerar gift, *Clostridium botulinum* är en av dem (McDonald *et al.*, 2002). *C. botulinum* producerar giftet botulin, vilket orsakar sjukdomen botulism hos däggdjur. Fall av förgiftning hos både nöt och häst har rapporterats, även om det är ovanligt.

Klostridier återfinns som sporer i aeroba miljöer och utvecklas och tillväxer enbart under strikta anaeroba förhållanden (Brock, 2006). Sporererna är mycket motståndskraftiga mot värme (motstår 150°C) och därmed svåra att få bort genom sterilisering och autoklavering. Inte heller ultraviolettt strålning, starka syror och baser, desinfektionspreparat och uttorkning har effekt på sporererna. Sporererna går in i ett viloläge och kan vara där mycket länge. Viloläget har studerats i laboratoriemiljö då sporer av *Clostridium aceticum* som varit 34 år gamla övergått i vegetativ fas (börjat växa och föröka sig). För att en spor ska bli aktiv igen krävs tre steg: aktivering, groning och tillväxt. Aktivering sker ofta i närvaro av aminosyror speciellt alanin, och värme. Groning är en snabb process på några minuter med flera kemiska processer. Bakterien växer till och delar sig till dess att miljön och näringstillgången blir sådan att bakterien börjar bilda en spor igen för att säkerställa artens överlevnad.

Klostrider tillväxer bäst vid ett neutralt till lätt basiskt pH (7,0–7,4) och klarar inte att tillväxa under sura förhållanden. Ett pH runt 4,2 anses tillräckligt lågt i flertalet fall för att inhibera

tillväxt i ensilage (McDonald *et al.*, 1991). Klostridier behöver också en våt miljö för aktiv tillväxt och ju våtare miljön är desto lägre pH kan tolereras. Vid en ts på 150g/kg kan de även tillväxa i en så sur miljö som pH 4. Deras tillväxt är ganska så begränsat vid en ts över 300g/kg, troligen sker total inhibering av tillväxt vid en ts på 400g/kg. I början av ensileringsprocessen tillväxer bakterier i ensilaget, däribland klostridier. Dessa kan till skillnad från flertalet andra bakterier även tillväxa i senare stadium under ensileringen och deras metaboliska produkter börjar uppstå i mer moget ensilage. Tyvärr är det en dålig korrelation mellan antalet sporer och klostridiernas fermentations-produkter som smörsyra och ammoniak. Detta är ingen överraskning eftersom produkterna produceras av växande (vegetativa) bakterier och inte sporer! Därför är den bästa metoden att påvisa sporer från klostridier att använda mikrobiologiska analyser. Gröda med lågt ts, lågt WSC- innehåll och hög buffertkapacitet i kombination med fördröjd förslutning av silon och temperatur runt 37°C, vilket är optimal temperatur för tillväxt för flertalet klostridier, ger en ytterst gynnsam miljö för klostridier. Temperaturer upp till 50°C har visat sig favorisera klostride-fermentation, medan temperatur runt 20°C främjade mjölksyra-fermentation. Om inte ett lågt och stabilt pH kan upprätthållas kommer klostridierna att stimuleras och en andra fermentation kommer att äga rum. En tillväxt av klostridier är inte önskvärd i ensilage eftersom de motverkar konserveringen av grödan genom att förstöra mjölksyra vilket leder till att pH höjs. Ett ensilage med påtaglig mängd klostridier karaktäriseras av högt pH och höga halter av smörsyra, ammoniak och aminer (Driehuis och Oude Elferink, 2000).

### ***Enterobakterier***

Enterobakter är vanligen förekommande i vatten och kloakvatten, likväl normalt förekommande i tarmkanalen hos människa och djur (slutet av tunntarmen och hela tjocktarmen) (Brock, 2006). Enterobakter är ofta patogena och framkallar sjukdomar, bland annat i njurarna. Enterobakter finns även på yta som t ex. hud, munhåla, respiratoriska organ, digestionskanalen och urinorgan som exponeras för den yttre miljön. Normalt återfinns inte mikroorganismer i inre organ, blod, lymfan eller nervsystemet. På växande gröda och i samband med ensilage förekommer enterobakter i litet antal och har beskrivits som ättiksyra-bakterie eller coliform bakterie (McDonald *et al.*, 2002).

Enterobakterier är stavformad, flagell-lös, gram- negative bakterie som inte sporulerar (Brock, 2006). Det optimala värdet på pH är 7,0 för tillväxt och enterobakterna är vanligtvis aktiva endast i tidigt stadium vid fermentation av ensilage då pH-värdet är till förmån och ännu inte hunnit sjunka (McDonald *et al.*, 2002). Vanliga enterobakter som återfinns i ensilage är *Escherichia coli* och *Erwina herbicola*. Tack vare dess medicinska betydelse har enterobakter, i. g. *E. coli*, noga studerats och många isolat har karaktäriserats (Brock, 2006). Tillväxtsubstrat är glukos och laktos med NH<sub>4</sub> samt mineraler som N, P, S, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> och spårelement och vitaminer. Karaktäristiska för bakterien är fakultativ aerobisk metabolism (McDonald *et al.*, 2002; Brock, 2006). Tillsammans med klostridier konkurrerar enterobakterna om de vattenlösliga sockerarterna (McDonald *et al.*, 2002). Enterobakterna fermenterar sockret till en samling produkter inkluderande ättiksyra, etanol och hydrogen (McDonald *et al.*, 2002; Brock, 2006). Likt klostridier kan de fermentera aminosyror. Enterobaktens huvudsakliga fermentationsprodukt är ammoniak (McDonald *et al.*, 2002), vanligen reducerar de nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) till nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Brock, 2006). Vidare omvandlas nitrit till ammoniak och andra nitrösa gaser (Driehuis och Oude Elferink, 2000). De nitrösa gaserna kan ha skadliga effekter på lungvävnaden hos människa och djur. Enterobakterna använder två vägar vid fermentering av socker och fermentationsprodukterna är karaktäriserande (Brock, 2006). Den ena producerar huvudsakligen etanol, 2,3- butanediol, bärnstenssyra, mjölksyra, ättiksyra, format, vätgas och koldioxid. Den andra producerar huvudsakligen de tre

syrorna mjölksyra, ättiksyra och bärnstenssyra samt etanol, koldioxid och vätgas. I den förstnämnda produceras dubbelt så mycket koldioxid som vätgas i jämfört med den sistnämnda fermentations-vägen.

### ***Jäst och mögel***

Svampar som finns i jord och vegetation är encelliga svampar (jäst) och multicellulära filamentösa kolonier (mögel) (McDonald *et al.*, 2002). Jäst som är associerade med ensilage är exempelvis *Candida*, *Saccharomyces* och *Torulopsis*. I ensilage anses all närvaro av jäst av ondo både aerobt och anaerobt (Driehuis och Ouede Elferink, 2000). Under aeroba förhållanden oxideras mjölksyra och pH höjs vilket möjliggör tillväxt av oönskade mikroorganismer. Under anaeroba förhållanden fermenteras socker till etanol och CO<sub>2</sub>. De eftersträvaransvärda LAB har mindre socker att nyttja och önskad fermentation uteblir samt lagringsförluster uppstår. Majoriteten av mögel i ensilage är strikt aerobt och är aktivt på ytan av ensilaget (McDonald *et al.*, 2002). Det finns många olika mögel och flera av dem producerar giftiga substanser (mykotoxiner). Vanligen delas mögelfloran in i fältflora och lagringsflora. Vanligt förekommande mögel i ensilage är *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus (clavatus, flavus och fumigatus)*, *Fusarium (culumorum och crookwellense)*, *Byssosclamyces nivea* och *Paecilomyces viriotii*, flertalet av dessa är mykotoxin-bildande. Relativt få fall där mykotoxiner har identifierats som orsak till sjukdom hos djur som konsumerat ensilage eller människor som hanterat ensilage. Detta kan bero på att mikroorganismerna i vommen hos idisslare har möjligheten att metabolisera en del av toxinerna som till exempel zearelenone, ochratoxin och en del trichothecener. Även om brist på bevis på orsakssamband föreligger, utesluter detta inte möjligheten till sjukdom på subklinisk nivå (McDonald *et al.*, 2002). Hos nöt metaboliseras mykotoxinet aflatoxin B1 till aflatoxin M1 med hjälp av levern och utsöndras till mjölken via blodet (Sjaastad *et al.*, 2003). De bevis som finns där mykotoxiner har effekt på fertiliteten, immunsystemet och nervsystemet är när djuret utsatts för kontinuerlig och lång tids exponering (McDonald *et al.*, 2002). Mögel i ensilaget orsakar dessutom lägre näringsvärde och sämre smaklighet (Driehuis och Oude Elferink, 2000). Ensilage som exponerats för luft och fått mögelangrepp bör inte utfodras till djur och hantering av densamma bör ske med yttersta varsamhet (McDonald *et al.*, 2002). Genom att minimera exponerad ytan av ensilaget så lite som möjligt vid uttag och snabb hantering får mögelsvampar sämre chans att utvecklas. Ensilage producerat med tillsatsmedel som begränsar fermentationen, högt pH och signifikant mängd av vattenlösliga sockerarter måste betraktas med misstänksamhet. En del åtgärder mot mögelangrepp är tillsatser innehållande organiska syror och deras salter.

Under hösten 2007 publicerades Broberg *et al.* en svensk studie där forskarlaget hade isolerat och karaktäriserat antisvamp-substanser från olika stammar av *Lactobacillus plantarum* i ensilage. Studien som genomfördes gick ut på att undersöka om kända antisvamp-metaboliter producerade från stammar av *L. plantarum* i vätskemedium även producerades av motsvarande stammar i gräsenilage. Stammarna producerade 3-fenylättiksyra, 3-hydroxyfettsyror och diketopiperaziner. Det visade sig att 3-hydroxyfettsyror var de mest potenta antisvamp-substanserna. Detta skulle kunna vara en lovande biokontroll för att hålla nere tillväxt och sporbildning av organismer som förstör konserveringen t ex *P. roqueforti* och *A. fumigatus*. Broberg *et al.* (2007) siar att framtida forskning på gräsenilage med applicerade LAB som biokontroll i silor i praktiken kommer att skilja sig från deras studie då förutsättningarna troligen inte lika optimala på grund av att tillväxt-mediumet ej är balanserat och att totalt syrefri miljö är svår att uppnå.

### **Vattenaktivitet, $a_w$**

Vattenaktivitet är ett mått på det vatten som är tillgängligt för mikroorganismer i exempelvis torkat foder. Värdet för  $a_w$  ligger mellan 0 och 1 (Brook, 2006). Rent vatten har ett  $a_w$ -värde på 1,000. Bakterier kan överleva och tillväxa vid värden ned till 0,750. Tillväxt av mögelsvamp är möjlig ända ned till en  $a_w$  på 0,610. Värdet bör ligga under 0,7 i torkat spannmål för god lagringsstabilitet. Klostridier är mer känsliga än LAB för lågt  $a_w$  (Driehuis and Oude Elferink, 2000).

### **Näringsförluster**

Förluster av näringsämnen i grönmassan och ensilaget kan ske på olika sätt genom bland annat fält-, oxidations-, fermentations- och pressvattenförluster. I gröda som slås och ensileras samma dag anses oxidationsförlusterna försumbara, även förtorkning inom 24 timmar har låg förlust 1-2% (McDonald *et al.*, 2002). Fältförluster uppstår också på grund av skördemaskinens bristande förmåga att ta upp all gröda som slagits (Spörndly, 2008). Vid förtorkning mer än 48 timmar kan avsevärda mängder näringsämnen gå förlorade, beroende på väderförhållanden och förluster på 6 % och 10 % av ts- halten efter fem respektive åtta dagar har rapporterats (McDonald *et al.*, 2002). De näringsämnen som påverkas mest är vattenlösliga kolhydrater och proteiner (hydrolyseras till aminosyror). Oxidationsförluster uppstår med enzymatisk verkan vid närvaro av substrat (socker) och syre med koldioxid och vatten som produkter. I en silo som snabbt fyllts och stängts har det inestängda syret i växtmaterialet mycket liten betydelse och orsakar ts-förlust på endast runt 1 %. Kontinuerlig exponering som sker vid kanter och ibland i det övre lagret leder till bildning av oätligt komposterat material. Att mäta förlusten på dessa ytor kan vara missvisande då de upplevs som stora, men i förhållande till sin volym är förlusten liten. Energiförluster på grund av mjölksyrabakteriernas aktivitet är låg. Ts-förlusten förväntas inte överstiga 5 % och energiförlusten är ännu lägre på grund av omlagring av kolhydrater till produkter med högre energikoncentration, så som till exempel etanol. Vid fermentation där klostridier och enterobakter varit verksamma kommer näringsförluster att vara betydligt högre på grund av produktion av koldioxid, väte och ammoniak. Förluster av lösta näringsämnen sker via pressaft. Mängden pressaft beror på den ursprungliga texturen på grödan, även silons utformning och beskaffenhet har inverkan. Pressaft innehåller sockerlösta kväveföreningar, mineraler, fermenterade syror. Vid en ts-halt i ensilaget på 150g/kg uppstår som regel en pressavattenförlust på 10 % och en vid en ts-halt på 300g/kg eller mer produceras mycket lite pressaft, om något alls.

### **Klassificering av ensilage**

#### ***Välkonserverat***

McDonald *et al.*, (2002), har föreslagit följande klassificeringar av ensilage, naturligt fermenterat och behandlat med tillsatsmedel.

Välkonserverat ensilage, naturligt fermenterat: gräsenilage med LAB som dominerat fermentationen. Denna typ av ensilage karaktäriseras av lågt pH mellan 3,7 och 4,2 och innehåller hög koncentrationer av mjölksyra. I gräsenilage ligger mjölksyra inom 80-120 g/kg ts, högre värden kan förekomma då grödan varit våt och haft högt innehåll av vattenlösliga sockerarter. Ensilaget innehåller som regel låga halter av ättiksyra och kan innehålla spår av propionsyra och smörsyra. Varierande mängder av etanol och mannitol kan förekomma genom aktivitet från LAB och jäst. Mycket lite vattenlösliga kolhydrater finns kvar efter fermentation ofta mindre än 20g/ kg ts. De kväverika näringsämnena i välkonserverat ensilage förekommer huvudsakligen i en löslig icke-proteinform till skillnad från den som fanns i den färska grönmassan (mest av N i proteinform). En del nedbrytning har skett av aminosyror under fermentationen, men bör vara mycket låg och likväl då

ammoniakhalten i ensilaget mindre än 100g NH<sub>3</sub>-N/kg TN. Koncentrationen av bruttoenergi är högre än i det ursprungliga materialet på grund av den omfattande förändringen av vattenlösliga sockerarter till föreningar med högre energiinnehåll som etanol. Välkonserverat ensilage där torkning av grödan skett före ensileringen gör att fermentationen minskar. I sådant ensilage är aktiviteten och klostridier och enterobakter minimal medan LAB tillväxer. Detta sker även i gröda upp till ts 500g/kg. Med så torra grödor är det svårt att packa så hårt att allt syre försvinner och risk finns för att luft kommer in i en silo. Högre ts ger högre pH, högre värden på WSC samt lägre värden på fermentations syror. Förtorkning av gröda förhindrar inte proteolys, men sker behandlingen snabbt och under goda väderförhållanden kommer nedbrytningen av aminosyrorna att minska. Innehållet av bruttoenergi är vanligen lika som i det ursprungliga materialet.

Välkonserverat ensilage med tillsatsmedel: Behandling med tillsatsmedel i ensilage delas ofta in i två grupper, en med stimulerande effekt på tillväxten av LAB och den andra med en inhiberande effekt på oönskade mikroorganismer (McDonald *et al.*, 2002). Den förstnämnda kan bestå av tillsats av sockerrika material eller av inympningar av LAB och enzymer. Den senare består ofta av syror för att snabbt sänka pH. Stimulans med melass har visat sig kunna öka ts-halten och innehållet av LAB samt reducera pH och halten av ammoniak. I jämförelse med obehandlat ensilage har tillsats av LAB till ensilage givit lägre pH, högre koncentration av vattenlösliga kolhydrater och mjölksyra samt lägre halter av ättiksyra och etanol. Genom att tillsätta enzymer spjälkas hemicellulosa och cellulosa till vattenlösliga kolhydrater som blir tillgängliga för LAB. Syror som myrsyra och propionsyra används i Skandinavien och tillsätts ensilaget för att få ett snabbt fall av pH, gärna under 4,0. Rekommenderad mängd är 2,5-5 liter per ton färsk gröda baserat på ts. All mikrobiell aktivitet avstannar inte, fermentation av LAB kommer att fortsätta. Denna metod fungerar bra på grödor med låga nivåer av vattenlösliga kolhydrater som exempelvis baljväxter och gräs.

### ***Dåligt konserverat***

Med ett dåligt konserverat ensilage menas att fermentationen dominerats av klostridier eller enterobakter eller båda (McDonald *et al.*, 2002). Detta inkluderar inte ensilage som har förstörts som ett resultat av lufttillträde, ett sådant aerobt försämrade material är troligen giftigt och bör aldrig utfodras till djur. Dåligt konserverat ensilage är allt som oftast producerat av en gröda som antingen har haft för hög vattenhalt eller innehållit låga halter av vattenlösliga kolhydrater. Dåligt ensilage produceras även om grödan inte innehållit tillräckligt med mjölksyrabakterier. Karaktäristiskt för ett dåligt ensilage är högt pH (5,0–7,0) även vid lägre ts-halter. Vid höga ts-halter är pH inte ett bra mått. Weissbach (1996) har föreslagit en ekvation som teoretiskt anger vilket värde pH bör vara vid olika ts-halter för att ensilagekvaliteten ska bedömas som bra,  $pH < (0,0257 * ts\%) + 3,71$ . Ekvationen kan tillämpas på ensilage mellan 15 och 50 % ts. I dåligt ensilage produceras ättiksyra eller smörsyra i större mängder än i ett bra konserverat ensilage. LAB och vattenlösliga kolhydrater finns närvarande i små mängder eller uteblivit helt. Värde på ammoniumkväve ligger ofta över 200g/kg TN. Med detta ammoniumkväve, som härstammar från katbolismen av aminosyror, finns andra nedbrytningsprodukter som aminer, ketosyror och fettsyror.

### **Näringsvärden i ensilage**

Näringsvärdet i ensilage avgörs i första hand av vilken gröda som ensileras och i vilket mognadsstadium den är och i andra hand aktiviteten av plantenzymer och mikroorganismer under skörd och lagring (McDonald *et al.*, 2002). Resultatet hos en fermenterad gröda, ensilaget, är att det har en högre bruttoenergi än den färska ursprungliga grödan. Ökningen blir dock mindre hos förtorkade och behandlade grödor. Ändringen i bruttoenergin återspeglas



direkt i den omsättbara energin eftersom dessa produkter betraktas som fullständigt smältbara. I jämförelse med ursprungsgrödan innehåller ensilaget mer ammoniumkväve och fritt  $\alpha$ -aminokväve på grund av nedbrytning av växtens proteiner (proteolys). Proportionen av potentiellt nedbrytbara kväveföreningarna är reducerad medan onedbrytbara kväveföreningar är oförändrade. Sammantaget ger det en ökning av kväve som redan är tillgängliga för vommens mikroorganismer och kommer snabbt att utnyttjas. Förtorkning och behandling med myrsyra och formaldehyd av grödan kommer att minska proteolysen och ge ensilaget lägre koncentration av ammoniumkväve och  $\alpha$ -aminosyrakväve samt reducera hastigheten av degraderingen av kvävefraktionerna. Användning av bakterier och enzymer som tillsatsmedel kommer att öka proteolysen. Genom att tillgodose mikroorganismerna i vommen med tillräckligt med energi kommer de att kunna utnyttja kväveföreningar i högre hastighet och därmed hålla halter av ammoniak nere i vommen. I detta skede produceras det mikrobprotein istället, som kan tillgodogöra sig i hela digestionskanalen. På detta sätt nyttjas också energin effektivare. Proteinets smältbarhet i ensilage är 75-85% (McDonald *et al.*, 2002).

## Hygienanalyser

### *Kemiska analyser*

De kemiska analyserna baseras på olika parametrar med uppsatta riktvärden, sammanfattade av Spörndly (2003) och mer utförligt beskrivna av Hallén-Landin *et al.* (2004). Acceptabla värden på pH varierar beroende på fodrets torrs substans (ts) och tillgänglighet på vatten för mikroorganismer, således kan ett torrare foder ha högre pH-värde än ett våtare. För att bedöma om pH-värdet är tillräckligt lågt kan ekvationen  $\text{pH} < (0,0257 * \text{ts} \%) + 3,71$  (Wiessbach, 1996) tillämpas. Ett lågt värde är eftersträvansvärt för att hämma mikrobiell tillväxt. Mycket buffrande substanser i fodret, som t.ex. klöver, gör att pH inte sjunker så mycket fastän mycket syra bildats. Den starkaste syran som bildas i fodret är mjölksyra och bildas av LAB. Den bidrar mest av alla syror till att pH sjunker. Normalvärden för förtorkat foder är 3-7 % av ts vid > 30 % ts och i direktskördat fodermedel med tillsatt myrsyra är värdet 8-12 % av ts. Värden över 12 % av ts har en hämmande effekt på foderkonsumtionen. Övriga syror som i regel detekteras är:

- *Ättiksyra*, bör ej överstiga 3 % av ts (produceras av enterobakter), har en hämmande effekt på jäst-tillväxt och vid 20-40 % av mjölksyra ger ett mer lagringsstabil ensilage.
- *Propionsyra* (bildas av propionsyrabildande bakterier), förekommer enbart i liten omfattning bör ej överstiga 1 % av ts, hämmar jäst- och mögeltillväxt kraftigt, finns i tillsatsmedel som exempelvis Promyr.
- *Smörsyra* (produceras av klostridier ex. *C. butyricum* och *C. tyrobutyricum*). Sackarolytiska klostridier bryter ned kolhydrater och organiska syror (t. ex mjölksyra) och bidrar smörsyra. Proteolytiska klostridier bryter ner protein, peptider och aminosyror till ammoniak och aminer och producerar iso-smörsyra. Höga halter smörsyra och högt ammoniak-tal (A-tal) indikation på dåligt fermenterat ensilage. Förtorkning av grönmassan till minst 35 % ts är ett bra sätt att hindra bakteriernas aktivitet.
- *Bärnstenssyra* återfinns i grönmassa med 2,2 g/ kg ts, används som substrat i oxidativ fosforylering, bildas normalt i ensileringsprocessen, produceras genom enzymatisk aktivitet i grönmassan och genom mikroorganismer enterobakter (*Escherichia*) och mjölksyrabakterier (*L. plantarum*) (McDonald *et al.*, 1991).

Etanol detekteras för att se om jästsvampar har tillväxt under ensileringen. Både LAB och enterobakter kan producera etanol, men jäst är den enskilt största orsaken. Stora mängder etanol är över 1 % av ts. Höga ammoniumtal (A-tal) över 12 % ammoniumkväve ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) av

totalkväve, indikerar att grödans protein brutits ned av proteolytiska klostridier och enterobakter. Gränsvärde för A-tal i ensilage är < 8 % bra, 8-12% mindre bra och >12% dåligt. Tillräckligt med socker i grönmassan är en förutsättning för att mjölksyra ska kunna bildas, därför görs en analys av sockerhalten i grönmassan (Water Soluble Carbohydrates, WSC) (Hallén-Landin *et al.*, 2004). Det bör finnas minst 2 % socker i grönmassans färskvikt. För att vara säker på att socker inte varit en begränsande faktor för mjölksyra- produktionen kan det finnas skäl att också analysera WSC i det färdiga ensilaget. Fiberbundet kväve (ADF-N) kan analyseras i ensilage för att avslöja om protein är bundet till fiber, detta sker då ensilaget tagit värme. Att ensilage tar värme är vanligen orsakat av att luft fått tillträde och gynnat aeroba mikroorganismer samt tillväxt av jäst och mögel. Höga sockerhalter, förtorkning och syra- tillsatser av grönmassan gör att nitrat bryts ned i mindre omfattning än om förutsättningarna varit de omvända. Nitrat är en kväveförening som bryts ned till nitrit, nitrösa gaser och ammoniak. Alla dessa är ohälsosamma, under fermentationen kan dock måttlig halt av nitrit ha positiv effekt eftersom den inhiberar tillväxten av sporbildande bakterier som exempelvis *C. tyrobutyricum*. Ensilage med nitrathalter över 0,9 % av ts skall aldrig utfodras. Värden upp till 0,44 % av ts i ensilage bör utfodras restriktivt, men halter mellan 0,12 % och 0,25 % anses godtagbara (Spörndly, 2003).

### **Mikrobiologiska analyser**

De mikrobiologiska analyserna kan variera beroende på laboratorier och vad som efterfrågas. Analyserna kan utgöras av sporbildande bakterier (baciller, klostridier), enterobakter, koliforma bakterier, listeria, jäst, mögel samt toxiner och LAB vid behov (Hallén-Landin *et al.*, 2004). Analyser utförs vanligen då ensilaget misstänks vara dåligt efter en bedömning av utseende, lukt och ett ställningstagande om fodret ska användas eller ej. De olika parametrarna vägs samman till en helhet och ligger till grund för att bedöma ensilagens kvalitet. Flertalet analyser sker med odling på plattor och resultaten presenteras i antalet kolonibildande enheter per gram i enheten log Cfu/g (Colony Forming Units/g). I jord och gödsel förekommer sporbildande bakterier som baciller och klostridier som kan ha kontaminerat ensilaget och tillvuxit. Antalet typer aeroba sporer är fler i gräsenilage än i majsensilage och mjölk (Giffel *et al.*, 2002). Ensilage är bevisligen en källa till sporkontaminering av mjölk. För att förhindra kontaminering av mjölk bör den fermentativa processen kontrolleras noga. Inom bacillus finns många olika bakterier bl.a. *Bacillus cereus* som kan ha negativ påverkan på mejeriprodukters hållbarhet. *B. cereus* har dock ingen känd inverkan på ensilagens kvalitet, vilket släkte *Clostridium* spp kan ha (se kapitlet om kemiska analyser) (Hallén-Landin *et al.*, 2004). Maxivärden i ensilage för sporer av baciller och klostridier är  $10^3$ /g prov. Låga värden under  $10^3$ - $10^4$ /g prov av gramnegativa bakterier, enterobakter, är en indikator på att ensileringen lyckats. Likt baciller och klostridier förekommer enterobakter i gödsel och jord. De koliforma bakterierna detekteras då mastit förekommer onormalt mycket i en besättning, maxivärde i ensilage är  $10^3$ /g prov. Analys av *listeria monocytogenes* (en grampositiv stavformig bakterie) i ensilage föranleds av misstanke om tillväxt efter det att djur insjuknat, varför de sällan analyseras regelmässigt. Mycket jäst i ensilaget leder till näringsförluster och förbrukning av socker och myrsyra. Förekomst av jäst leder ofta till tillväxt av mögel i ensilaget och vittnar om närvaro av syre. Det är mer meningsfullt att säkerställa vilket mögel som dominerar i provet än att räkna antalet eftersom mögel har olika sätt att sporbilda. I vallfoder är antalet  $10^5$ / g prov ett maximivärde för jäst och för mögel är gället motsvarande siffra men avser endast hö-prov (Spörndly, 2003). Analyser utförda vid Statens veterinärmedicinska anstalt kategoriserar mängden mögel enligt tillväxten O-tillväxt, mycket sparsam, sparsam, måttlig samt riklig i kombination med log-värde (SVA, 2008). Mögel har många nackdelar exempelvis sänkning av näringsvärde i ensilage, allergiframkallande och upphov till förgiftningar genom toxiner (Hallén-Landin *et*

*al.*, 2004). Toxiner kan vara livshotande i mycket små mängder och bildas av bakterier och mögel. Analyser av LAB sker inte så ofta eftersom aktiviteten är liten i ett välfermenterat ensilage där konserveringen är fullbordad och mikrobiell aktivitet är avslutad. Som ett mått på LAB detekteras därför mjölksyra, se ovan kemiska analyser (Hallén-Landin *et al.*, 2004), och ett värde mer än  $10^4$ /g prov är önskvärt (Spörndly, 2003).

På grund av att fermentation med mjölksyra är begränsad vid högre ts, kan inte brukliga kvalitetsvariabler användas vid bedömning av ensilage (Müller, 2005). Indikationer på ett dåligt konserverat ensilage är dock höga halter av ammoniak och mögel oberoende av ts. Däremot bör inte ett högt pH och låga halter av organiska syror anses som indikation på dålig konservering. Kvalitetsskillnader och skillnader i den mikrobiologiska kompositionen är ytterst små i avseende på olika ensileringssystem (McEnriy *et al.*, 2008). Däremot påverkas flertalet parametrar (dock ej smörsyra eller ättiksyra) i ensilage av lagringstiden, jäst ökar i takt med längre lagringstid (Müller *et al.*, 2007).

## Material och metoder

Till ensilering desinficerade 36 glasburkar (å 1500 ml) och lock med alkohol. I locken sattes jäsrör. En rektangulär plastlåda rengjordes med vatten och diskmedel för transport av sniglar. Sniglar hämtades ett dygn innan preparering av ensilering-burkar. Insamling av spansk skogssnigel skedde hos Bengt Johansson i Skogsåkra, Horred i Halland den 29 maj 2008 på morgonen kl.06:15-07:15. Rådande väderlek var uppehåll och molnfri himmel med sol som börjat torka upp nattens dagg. Betesvallen blev putsad ett dygn innan insamling av sniglar skedde. Vallens höjd var ca 15cm. En uppskattning av förekomst av spansk skogssnigel gjordes i den putsade betesvallen. Sniglarnas förekomst var så riklig och med sådan regelbunden täthet att beslut fattades att insamling skulle ske där man stod (plocka samtliga sniglar) för att sedan förflytta sig tre steg i slumpmässig riktning och åter plocka (bild 2).



Bild 2. Snigeltätheten i fält.

Foto: Cathrine Haaga



Bild 3. Transport-låda för sniglar.

Foto: Cathrine Haaga

Det totala antalet insamlingsställen uppgick till tio och den totala ytan utgjorde tio kvadratmeter. Sniglarna insamlades tillsammans med grönmassa, huvudsakligen maskrosblad, i en plasthink för att sedan överföras till en transport-låda med öppen topp över vilken ett nät fästes (bild 3). Plastlådan förseglades med tape och transporterades via Göteborg till SLU i Uppsala samma dag som sniglarna insamlades. För identifiering av rätt art av snigel anlätades Ted von Proschwich vid Göteborgs naturhistoriska museum. Tre sniglar överlämnades för att säkerställa rätt art. Spansk skogssnigel separerades från sin transport-grönmassa och placerades i en glasburk med lock, avvikande sniglar och snäckor avlägsnades och placerades i en annan glasburk. Tio slumpmässigt valda sniglar vägdes och mättes varvid intervall, medelvikt och medellängd räknades ut. Den totala vikten av alla sniglar dividerades med medelvikten och antalet sniglar erhöles. Beroende på sniglarnas ringa storlek antogs tre stycken motsvara en normalstor snigel. Transportlådan rengjordes med 1000 ml destillerat vatten. Blandningen av snigelfekalier och destillerat vatten benämndes "fekalier". Hela sniglar, 17 sniglar/kg grönmassa, mixades tillsammans 25 ml med "fekalier" för mikrobiell analys (jäst, mögel, klostrider, enterobakter och mjölksyrabakterier). Mixen av sniglar och "fekalier" benämndes "mix". Hela sniglar 5 stycken, och 40 ml "fekalier" frystes in -18 °C för SVA:s ändamål.

Grönmassa utgjordes av 75 % timotej och 25 % ängssvingel och insamlades från ett snigelfritt område söder om Uppsala den 30 maj, vilket motsvarar tidig skörd. Grönmassan torkades till två olika torrsubstanser (ts) 35 % (låg) respektive 65 % (hög). Tre ensileringsserier genomfördes. En serie med ensileringsmedel promyr (6 l/ton) i ts 35 % (låg ts behandlad (bh)), den andra serien utan ensileringsmedel i ts 35 % (låg ts) och den tredje serien utan ensileringsmedel i ts 65 % (hög ts). Grönmassa för respektive serie vägdes och "fekalier" och promyr tillsattes, allt blandades i stora plastpåsar ur vilka grönmassa senare togs för fyllning av ensilageburkarna. Glasburkarna som representerade silos rymde 1500 ml. Volymen motsvarade grönmassa från ca ½ m<sup>2</sup>, 730g (35 % ts) respektive 550g (65 %). Proportionellt mot denna yta uppgick antalet små sniglar till 35, utifrån detta halverades antalet sniglar två gånger. Inom varje ensileringsserie genomfördes fyra led av inblandning av sniglar (nivå 0 kontroll = 0 sniglar, nivå 1 = 8 sniglar, nivå 2 = 17 sniglar och nivå 3 = 35 sniglar) (bild 4). Alla led genomfördes i tripplikas, totalt producerades 36 ensileringsburkar (bild 5). Grönmasseprov med 35 % ts och 65 % ts utan några tillsatser frystes in, såväl resterande sniglar och "fekalier".





Bild 4. Tre nivåer av sniglar till grönmassa med låg ts, låg ts bh och hög ts. Foto: Cathrine Haaga



Bild 5. Ensilage-prover, kontroller och tre nivåer av sniglar totalt 36 prover. Foto: Cathrine Haaga

Kemiska analyser gjordes på grönmassan och de tre ensilagen, metod presenteras inom parantes. Parametrar som detekterades på grönmassa var pH (pH-meter 654; Methrom, Courtaboeuf, Frankrike), aska (askugn, 3 h i 550°C), råprotein (rp) (Bremner and Breitenbeck, 1983), vattenlösliga kolhydrater (water soluble carbohydrates, WSC) (Larsson och Bengtsson, 1983), amylas-neutrala lösningsfibrer (neutral detergent fibre, NDF) (Van Soest *et al.*, 1991, Chai och Udén, 1998), vomvätskelöslig organisk substans (VOS) (*in vitro* med vomvätska i 96 h), buffertkapacitet (bk) och omsättbar energi (metabolisable energy, ME) (som VOS och beräknad enligt Lindgren, 1983). Övriga kemiska parametrar på ensilagen var torrsubstans (ts) (torkskåp 18 h i 55 °C och torkugn 20 h i 103 °C), WSC (som ovan), ättiksyra, propionsyra, bärnstenssyra, 2,3-batanedio, ammoniumkväve, mjölksyra, myrsyra, smörsyra, i-smörsyra, i-valerisyra, n-valerisyra och etanol (vätskekromatografi Andersson och Hedlund, 1983). Mikrobiologiska analyser genomfördes på grönmassa, "mix" och de tre ensilagen. De mikrobiologiska parametrarna var LAB (anaerobt i 72 h i 30°C på Rogosa agarplattor), klostridier (*C. tyrobutyricum*) (anaerobt i 7 dygn i 37°C på RCM

agarplattor), enterobakter och jäst (göts in i agarplattor, VRBG respektive MEA agarplattor) samt mögel. Beräkning av de mikrobiologiska analyserna gjordes enligt Niemelä (1984). Övriga parametrar på ensilagen var lagringsförluster (vägning och differensberäkning) och vatten aktivitet ( $a_w$ ).

## Resultat

Rätt art av snigel, Spansk skogssnigel (*Arion Lusitanicus*), identifierades av Ted von Proschwich vid Göteborgs naturhistoriska museum. Mängden insamlad Spansk skogssnigel uppgick till 439,5 g, avvikande sniglar och snäckor vägde 5,7 g och den separerade transportgrönmassan vägde 312,3 g. De tio slumpmässigt valda sniglar hade en medelvikt på 0,64 g med intervallet 0,0-1,4 g och medellängden 2,14 cm med intervallet 1,5- 2,5 cm. Den totala vikten av alla sniglar var 439,5 g detta dividerades med medelvikten 0,64 g och antalet 687 sniglar erhöles. Beroende på sniglarnas ringa storlek antogs tre stycken motsvara en normalstor snigel. De 687 sniglarna motsvarar då 229 normalstora sniglar. Sniglarnas massa utgjorde 43,9 g/m<sup>2</sup>, således 69 små sniglar motsvarande 23 normalstora. Mikrobiologiska analyser genomfördes på grönmassa och "mix" (tabell 1) och de tre ensilagen (tabell 3 och 4). Mikrobiologiska parametrar var jäst, mögel, klostridier (*C. tyrobutyricum*), enterobakter, och LAB. Kemiska analyser gjordes på grönmassan (tabell 2) och de tre ensilagen (tabell 3 och 4). Parametrar som detekterades på grönmassa var pH, aska, råprotein, WSC, NDF, VOS, bk och ME. På ensilagen detekterades pH, ts, WSC, ättiksyra, propionsyra, bärnstenssyra, 2,3-batanedio, ammoniumkväve, mjölksyra, myrsyra, smörsyra, i-smörsyra, i-valerisyra, n-valerisyra och etanol samt lagringsförluster.

**Tabell 1.** Mikrobiell analys på grönmassa och "mix".

	Grönmassa (cfu/g)	Mix (cfu/g)
Jäst	0	6,1*10 <sup>2</sup>
Mögel	2,3*10 <sup>2</sup>	0
Klostridier	1*10 <sup>2</sup>	0
Enterobakter	1,2 *10 <sup>4</sup>	1,1*10 <sup>1</sup>
LAB	5,6*10 <sup>1</sup>	2,7*10 <sup>5</sup>

**Tabell 2.** Kemiska analyser på grönmassas två ts-halter.

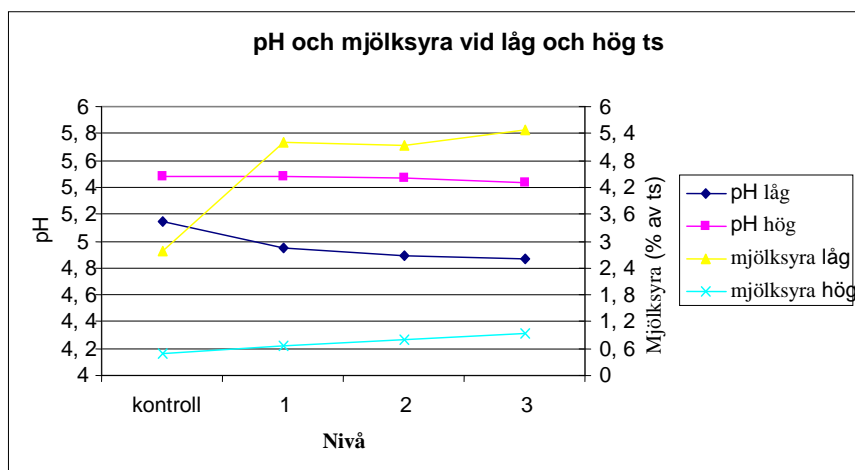
	35 %	65 %
pH	X	X
aska(%)	8,6	8,7
rp (%)	17,5	17,8
WSC (%)	15,1	15,0
NDF (%)	41,5	39,0
VOS(%)	89,1	89,5
Bk	X	X
ME(MJ/kg) ts	11,3	11,3
ts(%)	37,1	61,4

X: ej bestämda.

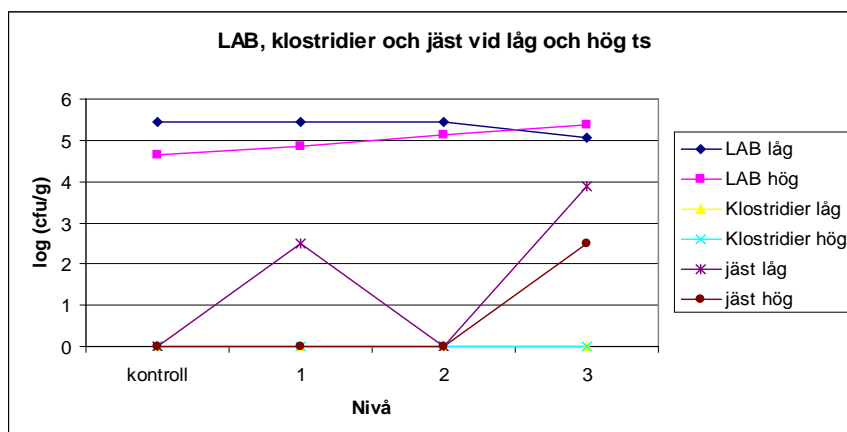
**Tabell 3.** Ensilage med låg och hög ts.

	ts låg				ts hög			
	kontroll	1:a nivå sniglar	2:a nivå sniglar	3:e nivå sniglar	kontroll	1:a nivå sniglar	2: nivå sniglar	3:e nivå sniglar
<b>pH</b>	5,14	4,95	4,89	4,87	5,48	5,48	5,47	5,43
Ammoniumkväve (% av ensilage)	0,05	0,09	0,08	0,09	0,04	0,04	0,05	0,05
WSC (% av ts)	5	3,91	4,06	3,49	10,54	9,68	10,45	10,45
<b>mjölksyra</b> (% av ts)	2,78	5,2	5,14	5,47	0,5	0,67	0,8	0,95
Ättiksyra (% av ts)	0,71	0,9	0,87	1	0,1	0,1	0,13	0,14
Propionsyra (% av ts)	0,16	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,06	0,06	0,06
Bärnstenssyra (% av ts)	0,59	0,84	0,78	0,82	0,39	0,4	0,39	0,36
2,3-butanediol (% av ts)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Etanol (% av ts)	1,19	1,05	1,16	1,14	1,13	1,84	0,89	0,56
<b>LAB</b> (log cfu/ g)	5,45	5,44	5,45	5,07	4,65	4,84	5,14	5,38
<b>Klostridier</b> (log)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
Enterobakter (log)	1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
<b>Jäst</b> (log)	<2,0	2,5	<2,0	3,9	<2,0	<2,0	<2,0	2,5
Mögel (log)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
lagrings förlust (%)	1,1	1,18	1,19	1,29	0,75	1,44	0,79	0,68
a <sub>w</sub>	0,96	0,96	0,96	0,96	0,92	0,92	0,93	0,92
Ts	33,05	32,8	32,73	33,08	55,52	54,67	53,44	53,69

(De markerade parametrarna redovisas i figur 1 och 2.)



**Figur 1.** Värderna på pH och mjölksyra vid låg och hög ts.



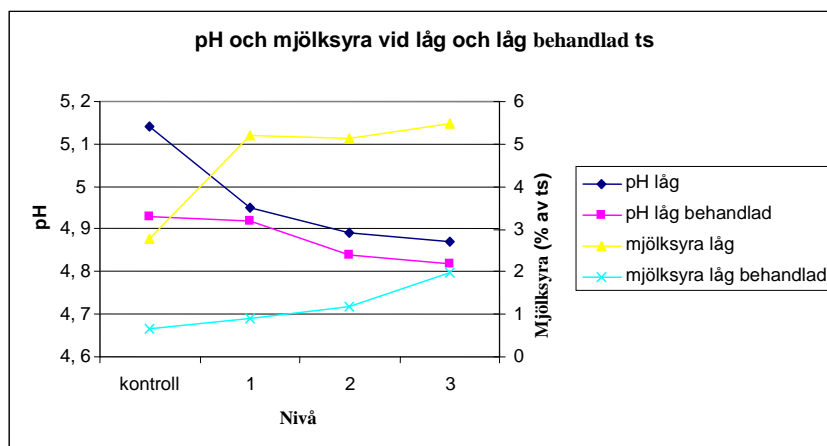
**Figur 2.** Värderna på LAB, klostridier och jäst vid låg och hög ts.



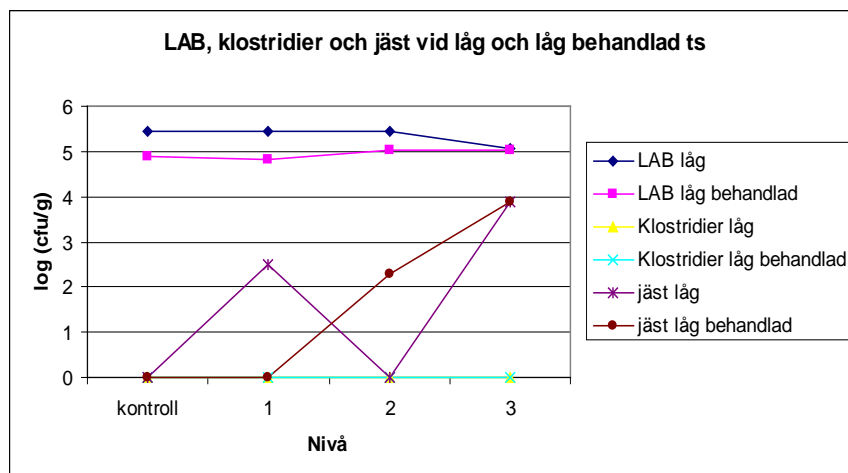
**Tabell 4.** Ensilage med låg ts och låg ts behandlad (bh).

	låg ts				låg ts bh			
	kontroll	1:a nivå sniglar	2:a nivå sniglar	3:e nivå sniglar	Kontroll	1:a nivå sniglar	2:a nivå sniglar	3:e nivå sniglar
<b>pH</b>	5,14	4,95	4,89	4,87	4,93	4,92	4,84	4,82
Ammoniumkväve (% av ensilage)	0,05	0,09	0,08	0,09	0,02	0,02	0,03	0,03
WSC (% av ts)	5	3,91	4,06	3,49	11,64	11,35	11,18	11,16
<b>Mjölksyra</b> (% av ts)	2,78	5,2	5,14	5,47	0,66	0,9	1,19	1,98
Ättiksyra (% av ts)	0,71	0,9	0,87	1	0,11	0,13	0,15	0,22
Propionsyra (% av ts)	0,16	<0,02	<0,02	<0,02	0,31	0,32	0,35	0,38
Bärnstenssyra (% av ts)	0,59	0,84	0,78	0,82	0,38	0,39	0,39	0,42
2,3-butanediol (% av ts)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Etanol (% av ts)	1,19	1,05	1,16	1,14	0,41	0,28	0,28	0,29
<b>LAB</b> (log cfu/g)	5,45	5,44	5,45	5,07	4,9	4,81	5,02	5,03
<b>Klostridier</b> (log cfu/g)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
Enterobakter (log cfu/g)	1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
<b>Jäst</b> (log cfu/g)	<2,0	2,5	<2,0	3,9	<2,0	<2,0	2,3	3,9
Mögel (log cfu/g)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
lagrings förlust %	1,1	1,18	1,19	1,29	0,21	0,25	0,25	0,34
a <sub>w</sub>	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
ts	33,05	32,8	32,73	33,08	34,71	34,66	34,55	33,8

(De markerade parametrarna redovisas i figur 3 och 4.)



**Figur 3.** Värderna på pH och mjölksyra vid låg och låg behandlad ts.



**Figur 4.** Värderna på LAB, klostridier och jäst vid låg och låg behandlad ts.

Värdet på pH sjönk i alla de tre serierna (låg ts, låg ts bh och hög ts) innehållande sniglar i jämförelse med respektive kontroll. Värdet sjönk även i avseende på ökat antal sniglar inom varje serie. Sammantaget för alla ts-serier med sniglar var att värden på pH låg under kontrollvärdet och sjönk i takt med ökat antal sniglar. Medelvärden för serien ts låg avseende pH var 4,90 och låg under värdet för kontroll 5,14. För ts låg bh var förhållandet det samma, men skillnaden var inte lika stor, medelvärdet på pH var 4,86 och kontrollens värde var 4,93. Medelvärden för ts hög på pH var 5,46 och kontrollen 5,48. I samtliga ensilage i de tre serierna var värdet för ammoniumkväve och 2,3-butanediol <0,02 % av ts. WSC- mängden var lägre i alla serier och nivåer i jämförelse med kontrollerna. I ts låg ökade värdet för att sen sjunka och åter öka i takt med ökad nivå av sniglar. I ts låg bh sjönk värdet i takt med ökad nivå sniglar. I ts hög sjönk värdet i den lägsta nivå med sniglar i jämförelse med kontrollvärdet för att sedan stiga och vara konstant i de följande två nivåerna av sniglar. Halten av mjölksyra ökade i samtliga serier. Mjölksyran ökade nästan dubbelt så mycket i ts låg och ts hög i jämförelse med kontrollerna, medan syran ökade tre gånger så mycket i ts låg bh, i takt med ökat antal sniglar. Mjölksyrans högsta medelvärde för ts låg var 5,47 och motsvarar 16,65 %. Ättiksyrans mängd ökade i de stigande nivåerna med sniglar i ts låg bh och ts hög i jämförelse med kontrollerna. Medan syran ökade i nivå ett för att sedan sjunka i nivå två och slutligen öka och nå ett maximum i nivå tre. Ts låg bh skiljde sig från de två andra serierna med avseende på propionsyra genom att värdet ökade något i takt med ökat antal sniglar. I ts låg var värdet konstant i de tre nivåerna vilket även var fallet i ts hög. Däremot skiljde sig ts låg från ts hög genom att nivåernas värde var lägre än kontrollens vilket var det motsatta fallet hos ts hög. Värdet för bärnstensyra i nivåerna med sniglar hade mindre variation (2-10 %) hos ts låg bh och ts hög i jämförelse med ts låg (32-42 %). Alla värden var högre i nivåerna med sniglar i jämförelse med kontrollerna med undantag av den högsta nivån med sniglar i ts hög, denna var lägre. Etanol- värdet hos ts låg var lägre i de tre nivåerna med snigel i jämförelse med kontrollen. Värdet gick ned för att sedan öka och slutligen sjunka igen i takt med ökat antal sniglar. I ts låg bh varierade etanol- värdet minst av de tre ts-serierna mellan kontroll och nivåer. Värdet var högst i kontroll för att sedan hålla sig på lika värde i de två lägre nivåerna med snigel och en ökad förändring på 0,01 hos den högsta nivån.

Mängden LAB låg stabilt i kontrollerna och i de två lägre nivåerna av sniglar för att sjunka något med 7 % i den högsta nivån av sniglar i ts låg. I de två andra ts-serierna ökade LAB i alla nivåer med sniglar. LAB ökade mest i ts hög med 13,6 % och i ts låg bh ökade LAB med 2,6 %. I samtliga ensilage i de tre serierna var värdet för klostridier log <2,0. I alla ensilage i de tre serierna med undantag av kontrollen i ts låg var värdet för enterobakter log <1,0 respektive 1,0. Förekomst av jäst var mycket sparsam till måttlig främst i ts låg och ts låg bh, i ts hög var förekomsten mycket sparsam. Jästtillväxt förekom i alla ensilagen förutom i kontrollerna. I grönmassan var värdet log 4,4 för jästtillväxt i den lägre ts- halten respektive log 4,1 för den högre ts- halten. Värden för jäst i de olika nivåerna varierade mellan < log 2,0 och log 3,9, de högsta värdena återfanns i nivå 3 i ts låg och ts låg bh. Mögel som återfanns i grönmassan, men inte i ensilagen, var *Cladosporium* spp, *Eurotium* spp och *Fusarium* spp. Värdet för tillväxt var log 3,7 och log 4,4 för ts låg respektive ts hög. Mögel som återfanns både i grönmassan och ensilagen var *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp. Mögelfloran i ensilagen vid direktodling 25 °C var *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp, tillväxten var mycket sparsam till sparsam i alla ensilage-serierna. Den termofila mögelfloran vid direktodling 37°C var den samma som vid direktodling 25 °C och tillväxten var noll till sparsam. O- tillväxt förekom vid tre tillfällen, en i ts låg och två i ts låg bh. *Mucor* spp förekom endast i ts hög med måttligt och mycket sparsam tillväxt vid 25°C respektive 37 °C. Övriga mögelsvampar hade mycket sparsam tillväxt i ts låg bh samt mycket sparsam till

sparsam tillväxt i ts hög. I samtliga serier och nivåer var värdet för mögel  $< \log 2,0$ , endast i nivå 3 i ts låg bh och ts hög var värdet  $\log 2,0$ .

Lagringsförluster i ts låg medelvärdet (mv) på 1,1–1,3 % ökad förlust med ökad mängd sniglar; ts låg bh mv 0,2–0,4 % ökad förlust med ökad mängd sniglar; ts hög mv 0,75–0,79–0,68 ökad förlust till nivå 2 av sniglar för att sedan sjunka. Vattenaktivitet var stabil i alla serier och nivåer av ts låg och ts låg bh och hade samma värde som kontrollerna 0,96. Torrsubstans var något lägre i den lägsta och mittersta nivån i jämförelse med kontrollvärdet och den högsta nivån var något högre än kontrollen i både ts låg och ts låg bh. I ts hög var samtliga nivåer lägre än kontrollen.

## Diskussion

Hur påverkas näringsinnehållet och den hygieniska kvalitén i ensilage? De uppmätta något högre pH-värdena än de förväntade värden bör inte betraktas som en försämring av kvalitén hos ensilagen. Alla pH-värden hos ensilage med sniglar låg under rådande rekommendationer. Detta i kombination med höga halter av LAB, mjölksyra, WSC samt låga lagringsförluster talar för en lyckad fermentation. Mjölksyran ökade i takt med antalet sniglar. Det höga värdet av mjölksyra 16,6 % i ts låg ligger över vad som anses smakligt för djur (12 %) och kan bli svårt att utfodra. Framtida försök utfodringsexperiment! De parametrar som normalt indikerar ett dåligt ensilage med sämre näringsinnehåll är höga nivåer av ammoniumkväve, ättiksyra, propionsyra, bärnstenssyra, 2,3-butanediolsyra och etanol. Några högre nivåer av dessa gick inte att återfinna i de undersökta ensilagen. Vid betraktelse av den hygieniska kvalitén måste den anses som god. Låga nivåer av klostridier, enterobakter, jäst och mögel i samtliga ensilage ger indikationer på att ensilagen är av god hygienisk kvalitet. Den ökande mängden mjölksyra indikerar på LAB-aktivitet vilket konkurrerat ut jästtillväxt och därmed låg mögeltillväxt som följd. Ett resultat som kan vara intressant att vidare undersöka är den ökade mängden jäst hos alla ensilage med största mängden sniglar. Vad händer med ensilage vid andra skörd då sniglarna förökat sig med en generation? Skulle mer sniglar gynna etableringen för jäst och därmed mögel? Var går gränsen då/om ensilage blir otjänligt avseende på proportionerna grönmassa kontra sniglar? En snigel ger upphov till minst 40 000 sniglar på en sommar om 2 generationer. Första sommaren märker man inte av dem för skörden ligger så tidigt på sommaren, först i augusti börjar de bli många. Följande år märker man av invasionen, den enstaka snigeln från förgående vår är då minst 40 000 stycken. Dessa 40 000 kommer att vara  $1,6 \cdot 10^9$  stycken (beräknat på 50 % överlevnad från ägg till fertil individ) vid andra sommars slut om förutsättningarna är goda (tillgång på föda, temperatur, fuktighet). Resultaten pekar på att *A.L.* innehöll mjölksyrabakterier. Resultaten pekar även på att *A.L.* inte innehöll klostridier eller enterobakter. Avsaknaden av mikroorganismerna samstämmer med resultat gällande den svenska Vinbergssnäcken (*H. pomatia*), men skiljer sig från den franska varianten (*H. pomatia*). Skulle geografiska skillnader även kunna vara av vikt hos *A.L.* så som hos *H. pomatia*? Varför återfinns inte mikroorganismerna hos de svensklevande *A.L.* och *H. pomatia*? Den svenska arten Vinbergssnäcken (*H. pomatia*) innehöll bakterier som *Buttiauxella*, *Citrobacter* och *Kluyvera*, men saknade *Enterococcus*, *Enterobacter* och *Obesumbacterium* vilka har återfunnits hos den franska - skulle *A.L.* kunna innehålla olika bakteriearter från olika geografiska områden i Sverige och Europa? Mängden LAB  $2,7 \cdot 10^5$  CFU/ g hos *AL* ligger i nivå med totala mängden bakterier  $5,1 \cdot 10^7$  CFU/ g hos den svenska *H. pomatia*. Intressant vore att isolera LAB hos *A.L.* för att eventuellt producera LAB som konserveringsmedel eller bioindikator enligt den svenska studien? Vi måste få veta vilka LAB som finns hos *A.L.* samt även andra bakterier och parasiter! Kan LAB hos *A.L.* ha samma hämmande verkan på mögeltillväxt som Brobergs et al., 2007. Är det därför som inte mögel har tillvuxit i ensilagen med sniglar? Kan *A.L.* vara ett värdjur för parasiter så som

sumpsnäckan är för leverflundran? Kan det finnas nya organismer på kartan som vi inte är vana vid och därför inte letar efter? *A.L.* är en relativt ny art i Sverige och eftersom studier på blötdjur är ringa är detta ett nytt område att utforska. Bakterien *Ehrlichia risticii* som orsakar betesfeber i Nordamerika genom kontaminerade värdjur- skulle detta kunna vara möjligt här? Vad har vi då att vänta vid en kombination av klimatförändring och snigelkorsningar mellan *A.L.* och svensk skogssnigel? En hybrid som kan klara av de flesta klimattyper med en hög förökningskapacitet?

## Slutsats

- De erhållna resultaten visade på att sniglarna själva innehöll mjölksyrabakterier och att ensilage med sniglar innehöll mer mjölksyra än kontrollerna. Halter av enterobakterier, smörsyrasporer och mögel var inte förhöjt i ensilage med sniglar i jämförelse med kontrollerna. Det gick inte att med konventionella kvalitetskriterier för ensilage påvisa en försämrad kvalitet i ensilage som blandats med sniglar så när som en något förhöjd halt jäst vid den allra högsta snigelnivån
- Framtida utfodringsförsök med avseende på ensilagens smaklighet när det kontamineras med sniglar
- Isolera och karaktärisera bakterieinnehållet hos *Arion lusitanicus* från olika lokaler samt vid olika årstider

## Tillkännagivanden

Ett stort tack till personalen vid Kungsängens forskningslaboratorium för all hjälp av analyser, information och förstående tillmötesgående. Tack till Eva Spörndly och Emma Boy för lån av kamera, utan tingelse hade inte experimentet förevigats. Ted von Proschwitz, Göteborgs Naturhistoriska museum och Cecilia Hultén, SVA tackas för ett gott samarbete. En eloge till Jordbruksverket som möjliggjort internationella möten om sniglar. Sist men inte minst ett stort tack till min handledare Rolf Spörndly, ditt tålamod och öppna sinne har givit mig chansen att fördjupa mig i ett utforskat ämne.

## Källförteckning

- Andersson, R. and Hedlund, B. (1983). HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 176, 440-443.
- Barloug, J. E., Gerhard, H., Reubel, G. H., Madigan, J. E., Vredevoe, L. K., Miller, P. E. and Rikihisa, Y. (1998). Detection of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, in Freshwater Stream Snails (Pleuroceridae: Juga spp.) from Northern California. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug, Vol. 64, No. 8, p. 2888–2893.
- Bremner, J. M. and Breitenbeck, G. A. (1983). A simple method for determining ammonium in semi- micro Kjeldahl analysis of soil and plant materials using block digester. *Comm Soil Science Plant Anal*, 14:905-913
- Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K. & Schnürer, J. (2007). Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. *Applied and Environmental Microbiology*, sept, s 5547-5552
- Brock, T. D. (2006). *Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.
- Chai, W and Udén, P. (1998). An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology*, 74, 281-288.
- Charrier, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Ainouch, K. and Andant, G. (2006). Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol Res*, 39: 669-681.
- Driehuis, F. and Oude Elferink, S.J.W.H. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *The Veterinary Quarterly*, 22: 212-217.
- Eksvärd, J. (2008). Miljöchef, Äganderätter och miljö- och klimatfrågor. Lantbrukarnas Riksförbund (LRF).
- Ester, A., (2008). Dr, forskare. Applied Plant Research (Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV), Wageningen Universitet och Forskningscentrum, Holland. Muntlig information.
- Giffel, M.C, Wagendorp, A., Herrewegh, A. and Driehuis, F. (2005). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Leeuwenhoek*, 81, 625-630.
- Grimm, B. (2001). Life cycle and population density of the pest slug *Arion lusitanicus* Mabilie (Mollusca: Pulmonata) on grassland. *Malacologica* 43:25–32.
- Grimm, B. (2002). Effect of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* on young stages of the pest slug *Arion lusitanicus*. *J Moll Stud* 68:25-28.
- Hallén-Landin, J., Emanuelson, M., Pauly, T. och Spörndly, R. (2004). Hygienisk kvalitet i ensilage- kortfattad faktasamling och en åtgärdsguide. Svenska Husdjur, Svensk Mjök och Sveriges lantbruksuniversitet.
- Haukeland, S. (2008) *Bioforsk, Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research*. Ås, Norge.
- Hegrestad, O. M. (2008). Leverflundra. *Djurhälsonytt*, 1, s17-18.
- Hulten, C. (2008). Epidemiolog och laboratorieveterinär vid enheten för kemi, miljö och fodersäkerhet, VMD. Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), muntlig information.
- Julien, M-C, Dion, P, Lafrenie`re, C, Antoun, H. and Drouin, P. (2008) Sources of Clostridia in Raw Milk on Farms *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 20, p. 6348–6357
- McEnriy, J., Kiely, P.O., Clipson, N.J.W., Forristal, P.D. and Doyle, E.M. (2008). Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 359-371.

- Lindgren, E. (1983). Vallfodrets näringsvärde bestämt *in vivo* och med olika laboratoriemetoder. Rapport 45. Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Larsson, K. och Bengtsson, S. (1983). Bestämning av lättillgängliga kolhydrater i växtmaterial, metod 22, Statens lantbrukskemiska laboratorium, Uppsala
- Lesel, M., Charrier, M. and Lesel, R. (1990). Some characteristics of the bacterial flora housed by the brown garden snail *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata). Preliminary results. Lesel, R. (ed) Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms. Amsterdam: Elsevier Sciences. pp. 149-152
- McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Second edition. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. and Morgan, C.A. (2002). *Animal Nutrition*. Sixth edition. Pearson Education Limited, Harlow, UK.
- Morand, S., Wilson, M.J. and Glen, D.M. (2004). *Nematodes (Nematoda) parasitic in terrestrial gastropods*. In G.M. Barker (ed.). *Natural Enemies of Terrestrial Molluscs*, CABI Publishing, Wallingford, UK, 525-558.
- Mellqvist, E, Växtskyddsenhet, Växtskyddscentralen i Skara, Jordbruksverket.
- Müller, C. (2005). Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as feed for horses. *Grass and Forage Science*, 60, 109-118.
- Müller, C., Pauly, T.M. and Udén, P. (2007). Storage of small bale silage and haylage- influence of storage period on fermentation variables and microbial composition. *Grass and Forage Science*, 62, 274-283.
- Niemelä, S. (1984). Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations. Nordisk metodkommitte för livsmedel (NMKL), rapport 1. s 10. Livsmedelsverket, Uppsala.
- Proschwitz, T.von (1989). *Arion lusitanicus* Mabile – en för Sverige ny snigelart. Göteborgs Naturhistoriska Museum Årstryck 1989.: 43-53.
- Proschwitz, T. von (1992). Den Spanska skogssnigeln - *Arion lusitanicus* Mabile – hur bekämpar vi den och förhindrar ytterligare spridning? Göteborgs Naturhistoriska Museum, Årstryck 1995: 51-59.
- Proschwitz, T. von (1996). Utbredning och spridning av spansk skogssnigel (*Arion lusitanicus* Mabile) och röd skogssnigel (*Arion rufus* (L.)) En översikt av utvecklingen i Sverige. Göteborgs Naturhistoriska Museum, Årstryck: 27-45.
- Proschwitz, T. von (2008). Göteborgs Naturhistoriska museum. Muntlig information. Möte om sniglar i Skövde.
- Reubel, G. H., Barlough, J. E. and Madigan, J. E. (1998). Production and Characterization of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, from Snails (Pleuroceridae: Juga spp.) in Aquarium Culture and Genetic Comparison to Equine Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36, No. 6, p. 1501–1511.
- Rudby-Martin, L. (2008). Så yttrar sig leverflundra hos får. *Djurhälsonytt*, 1, s19.
- Sjaastad, Ø., V., Hove, K. and Sand, O. (2003). *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Speiser, B. (2002). Molluscicides. *Encyclopedia of Pest Management* (D. Pimentel, eds), p. 506-508. Marcel Dekker; New York.
- Speiser, B. Glen, D., Piggott, S. Ester, A. Davies, K. Castillejo, J. and Coupland, J. (2001). Slug Damage and Control of Slugs in Horticultural Crops. - Brochure on slug control in general.
- Spörndly, R., Everitt, B. och Berggren, M. (1988). Ensilering- en biologisk process. Speciella skrifter 34, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala.

Spörndly, R. (2003). Fodertabeller för idisslare (Red.). Institutionen för husdjurens utfodring och vård. Rapport 257. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.

Spörndly, R. (2008). Agr. Dr. Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet. Muntlig källa.

Van Soest, P.J., Robertsson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods of dietary fibre, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

Watkins, B. and Simkiss, K. 1990. Interactions between soil bacteria and the molluscan alimentary tract. *J Mol Stud* 56: 267-274.

Vázquez, J.A., Docasal, S. F., Prieto, M.A., González, M.P. and Murado, M.A. (2008). Growth and metabolic features and lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio silage and fishing by-products. *Bio resource Technology*, 99, 6246-6257.

Weissbach, F. (1996). New developments in crop conservation. In XI International Silage Conference. Aberystwyth, p 11-25. IGER. Aberystwyth, UK.

Wilkinson, J. M. (1999) Silage and Animal Health. *Natural Toxins* 7: 221-232.

Wilson, M.J., Glen, D.M., George, S.K. (1993). The Rhabditid nematode, *Phasmarhabditis hermaphrodite*, as a potential biological control agent for slugs. *Bio control Science and Technology* 3, 503-511.





Nr	Titel och författare	År
373	Hur kan kalvningsförlamning förebyggas? How to prevent milk fever? 15 hp G2E-nivå Ida Hansson	2012
374	Effect of botanically diverse pastures on the milk fatty acid profiles in New Zealand dairy cows 30 hp A2E-level Gunilla Ström	2012
375	Renen – En framtida mjölkproducent? The reindeer – A future milk producer? 15 hp G2E-nivå Alexandra Sveen	2012
376	Mjölkkureahalten som mått på vommikrobernas kväveförsörjning och kons miljöbelastning Milk urea concentration as a measure of nitrogen supply to rumen microbes and indicator of the environmental load 15 hp G2E-nivå Anna Strömgren	2012
377	Ompressning av inplastat vallfoder – från rundbal till småbal Rebaling of wrapped forage – from round bale to small bale 30 hp A2E-nivå Eva Andersson	2012
378	Ljusprogram för kor Light program for dairy cows 15 hp G2E-nivå Emma Duvelid	2012
379	Mineraler till får – Fokus på kalcium, koppar, selen och magnesium 15 hp G2E-nivå Ida Ljunggren	2012
380	The effects of rubber alley flooring on cows' locomotion and welfare 30 hp A2E-nivå Pernilla Norberg	2012
381	Agroprotein som fodermedel till slaktkyckling Agroprotein as a feed ingredient to broiler chickens 30 hp A2E-nivå Emily Wallström	2012

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15, 30, 45 eller 60 högskolepoäng) vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet. En förteckning över senast utgivna arbeten i denna serie återfinns sist i häftet. Dessa, samt tidigare arbeten, kan i mån av tillgång erhållas från institutionen.

In this series Degree projects (corresponding 15, 30, 45 or 60 credits) at the Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, are published. Earlier numbers are listed at the end of this report and may be obtained from the department as long as supplies last.

---

**DISTRIBUTION:**  
**Sveriges Lantbruksuniversitet**  
**Institutionen för husdjurens utfodring och vård**  
**Box 7024**  
**750 07 UPPSALA**  
**Tel. 018-67 28 17**

---