



Klostridier och jästsvamp i ensilage – orsak, verkan och samverkan

Clostridia and yeasts in silage - cause, effect and interaction

Madelene Costa

Skara 2013

Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Studentarbete
Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

Nr. 500

Student report
Swedish University of Agricultural Sciences
Department of Animal Environment and Health

No. 500

ISSN 1652-280X



Klostridier och jästsvamp i ensilage – orsak, verkan och samverkan

Clostridia and yeasts in silage - cause, effect and interaction

Madelene Costa

Studentarbete 500, Skara 2013

Husdjursvetenskap - Husdjur, examensarbete för kandidatexamen, Grund, G2E, 15 hp, kurskod: EX0553

Handledare: Elisabet Nadeau, SLU, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, Box 234, 532 23 SKARA

Examinator: Katarina Arvidsson, SLU, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, Box 234, 532 23 SKARA

Nyckelord: Ensilage, klostridium, jästsvamp, syre tillgång, näringsinnehåll, gräsenzilage, majsensilage

Key words: Silage, clostridium, yeast, oxygen availability, nutrient composition, grass silage, maize silage

Serie: Studentarbete/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, nr. 500, ISSN 1652-280X

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

Box 234, 532 23 SKARA

E-post: hmh@slu.se, **Hemsida:** www.slu.se/husdjurmiljohalsa

I denna serie publiceras olika typer av studentarbeten, bl.a. examensarbeten, vanligtvis omfattande 7,5-30 hp. Studentarbeten ingår som en obligatorisk del i olika program och syftar till att under handledning ge den studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Arbetenas innehåll, resultat och slutsatser bör således bedömas mot denna bakgrund.

Abstract

Yeast and Clostridia is a problem in silage for farmers as contaminated silage may result in poor animal health and milk quality. Clostridia can produce toxins that, when consumed, acts as neurotoxins, it may also cause blown cheeses if the Clostridia contaminates milk. The purpose of this study was to investigate the cause, effect and interaction of yeasts and Clostridia in silage. Clostridia are microorganisms which are strictly anaerobic and consume carbohydrates and protein in the silage. Yeast is a fungus that is facultative aerobic and feed on carbohydrates in the silage. The reason that yeast and Clostridia occur in silage is mainly caused by that the pH is not reduced in an anaerobic environment or because an anaerobic environment is not maintained in the silage, due mainly to oxygen ingress and holes in the plastic that provides air access to the silage. Yeast and Clostridia consume carbohydrates and proteins in the silage, which result in losses of nutrients. There is an interaction between yeast and Clostridia although they have completely different ecological niches. The most probable situation is that yeast creates an anaerobic environment for Clostridia when it consumes the oxygen in the silage. Therefore, Clostridia and yeast are usually found on the surface layer of silage where it has been an aerobic environment. There is a need for more studies on how yeast and Clostridia interact in different types of silages.

Sammanfattning

Jästsvamp och klostridier är ett problem i ensilage för lantbrukare då kontaminerat ensilage kan leda till försämrad djurhälsa och kvalitet på mjölk. Klostridier kan producera toxin som vid förtäring verkar som nervgift, dessutom kan klostridier i mjölk orsaka sprängda ostar. Syftet med litteraturstudien har varit att utreda orsak, verkan och samverkan till jästsvampar och klostridier i ensilage. Klostridier är mikroorganismer som är strikt anaeroba och livnar sig på kolhydrater och protein i ensilaget. Jäst är en svamp som är fakultativt aerob och som livnar sig på kolhydrater i ensilaget. Anledningen till att jäst och klostridier förekommer i ensilage orsakas främst av att pH inte sänks i en anaerob miljö eller att en anaerob miljö inte upprätthålls i ensilaget genom syretillförsel, vilket främst beror på hål i plasten som ger lufttillträde i ensilaget. När jäst och klostridier finns i ensilaget förbrukar de kolhydrater och proteiner, vilket minskar näringsinnehållet. Det finns en samverkan mellan jäst och klostridier trots att de har helt olika nischer. Troligtvis skapar jäst en anaerob miljö för klostridier när den förbrukar syret i ensilaget. Därför återfinns klostridier oftast med jäst på ytskiktet av ensilage där det varit en aerob miljö. Det finns ett behov av fler studier på hur jäst och klostridier samverkar i olika typer av ensilage.

Inledning

Ensilage är ett viktigt fodermedel till däggdjursherbivorer och används framförallt som energi- och proteinkälla. Däggdjursherbivorer kan vara idisslare eller grovtarmsförjäsare, vilket innebär att båda använder mikroorganismer för att frigöra näring i fodret. En skillnad mellan idisslare och grovtarmsförjäsare är att idisslare har mikroorganismer i vommen medan grovtarmsförjäsare endast har mikroorganismer i grovtarmen. Herbivorer mikroorganismer fermenterar kolhydrater, fett och proteiner, där kolhydraterna blir till flyktiga fettsyror (VFA) vilka är den viktigaste energikällan för herbivorer (Dehority, 2002). Ensilering används för att lagra foder som bl.a. är viktigt för att kor ska kunna producera med bibehållen produktivitet under vintertid (Pahlow et al., 2003). Ensilering innebär att fodret får vistas i en miljö med ett surt pH-värde och i anaeroba förhållanden. Det låga pH-värdet och den anaeroba miljön

minskar tillväxten av oönskade mikroorganismer. Oönskade mikroorganismer kan bl.a. vara jäst och klostridier (Jatkauskas & Vrotniakiene, 2011).

Jästsvamp är en fakultativ aerob svamp som klarar miljöer med låg syrehalt och ett lågt pH-värde (Norrman, 1985). En fakultativ aerob mikroorganism använder sig huvudsakligen av syre som elektronmottagare vid metabolismen, men kan också använda andra elektronmottagare då syre inte är tillgängligt (Liu et al., 2013). Svampen tillväxer därför lätt i dåligt tätat ensilage då det finns tillgång till syre (Wilkinson & Davies, 2012). De flesta jäst arterna är inte farliga t.ex. aktiv torr jäst som till största delen består av *Saccharomyces cerevisiae*, vilket kan ge positiv effekt på mikrofloran i vommen genom att verka som probiotica (Chaucheyras- Durand et al., 2007). Jästsvampar kan ge temperaturhöjningar i ensilaget, som i sin tur kan resultera i näringsförluster samt tillväxt av andra mikroorganismer (Richardt, 2012). Vid tillväxt i ensilaget bryter jätten ned mjölksyran och sockret vilket resulterar i en höjning av pH-värdet och näringsförluster. Detta leder till både osynliga och synliga förluster och ensilagepartier kan behöva kasseras (Middelhoven & Van Baalen, 1988; Pahlow et al., 2003).

Klostridium är en bakterie som finns i jorden och kan bilda sporer. Bakterien återfinns oftast i form av sporer i ensilage och är en strikt anaerob bakterie. Klostridium tillväxer lätt i ensilage som har mycket tillgängligt vatten (hög vattenaktivitet), anaeroba förhållanden och med ett pH-värde > 5. Klostridium bryter ned mjölksyra, kolhydrater och aminosyror i ensilaget, vilket orsakar näringsförluster (Driehuis, 2013). Klostridier kan också ge sporer i mjölk och orsaka skador på djur. *Clostridium tyrobutyricum* kan bl.a. ge skador på textur och utseendet hos osten (Garde et al., 2011). *C.botulinium* producerar ett nervgift som i mycket låga doser kan leda till döden, för både människor och djur (Bok et al., 2012).

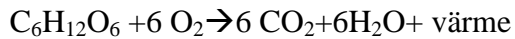
I ensilage orsakar jästsvampar främst näringsförluster och bidrar till tillväxt av andra oönskade mikroorganismer t.ex. klostridiebakterier. Klostridier ger också näringsförluster samt kan orsaka hälsoproblem hos djur, (Garde et al., 2011; Bok et al., 2012) därför behövs jäst och klostridier motverkas i ensilage. För att hitta metoder som motverkar jästsvampar och klostridiebakterier, behövs kunskap om organismerna och deras samverkan (Jonsson, 1989; Jonsson, 1991). Därför skall denna litteraturstudie behandla orsak, verkan och samverkan mellan jäst och klostridiebakterier i ensilage. Litteraturstudien kommer att behandla frågorna; 1) Vad är det som orsakar tillväxt av jästsvamp och klostridiebakterier i ensilage och 2) Hur verkar och samverkar klostridiebakterier och jästsvampar i ensilage?

Syftet är att utreda orsak till att jästsvamp och klostridiesporer kan förekomma i ensilage, samt hur jästsvamp och klostridiebakterier verkar och samverkar.

Ensilering

Ensilering är en konserveringsmetod som används för att konservera grovfoder (Kung, 2001). Vid förtorkning i fält sänks vattenhalten och begränsar vattenaktiviteten hos grovfodret. Vattenaktivitet är ett mått på tillgängligt vatten, vilket är ett krav för mikrobiell tillväxt (Kung, 2001; Muck et al., 2003). Efter förtorkningen sker inläggning i silo eller bal som sedan täcks med plast för att uppnå en anaerob miljö när näringen i grönmassan förjäses. När allt syre har förbrukats till koldioxid, vatten och värme bildas en anaerob atmosfär (McDonald et al., 2002a).

Värmen som bildas i ensilaget, speciellt vid respiration av socker till koldioxid och vatten (figur 1), leder till att nedbrytningen av näring orsakad av mikroorganismer tilltar eftersom bakteriernas tillväxt ökar. Bakterierna har ett tillväxtoptimum som ensilaget närmar sig när temperaturen ökar och gör att bakterierna tillväxer (Henderson, 1993).



Figur 1 Respiration av socker.

Protein blir nedbrutet genom en proteolysreaktion (Ohshima et al., 1979; Muck et al., 1996). Vid en proteolys är det främst växters proteasenzymmer men även bakterier som bryter ner proteinerna till peptider och aminosyror (Kemble, 1956). Fermentering som inte är orsakad av mjölksyrabakterierna och proteolys är inte önskvärd eftersom näringsinnehållet i fodret då minskar. Näringsinnehållet är viktigt eftersom det utnyttjas av djuren vid metabolism (McDonald et al., 2002b). Respiration och proteolys avtar då syret är slut eller pH-värdet är för lågt för tillväxt av de flesta bakterier och svampar. När dessa kriterier uppfylls kommer enzymerna i växter och bakterier att bli inaktiverade. Denna process bör inte ta längre än ett par timmar (Kung, 2001; Wilkinson & Davies, 2012).

Efter att syret har tagit slut i ensilaget börjar bakterier som producerar ättiksyra att fermentera lösliga kolhydrater. När pH-värdet sjunkit till ca 5, avstannar tillväxten av ättiksyrabakterierna medan mjölksyrabakterier tillväxer. Mjölksyrabakterierna använder lösliga kolhydrater och bildar mjölksyra som biprodukt. Mjölksyrabakterierna är mycket viktiga för att få ett lågt pH-värde i ensilaget (McDonald, 1982; Kung, 2001). Ett lågt pH-värde i ensilaget gör att mikroorganismer som har en lägre vätejonkoncentration inuti cellen än i ensilaget, kommer via osmos ge cellens cytoplasma en ökning av vätejonkoncentrationen då vattnet går ut ur cellen. Sänkningen av pH-värdet i cellens cytoplasma kan orsaka inhiberingar av enzymer och förstöra plasmamembranet på cellen, vilket inhiberar oönskade bakterier att tillväxa (Willey et al., 2009a). För att mjölksyrabakterierna skall kunna konkurrera med klostridier är det viktigt att grödorna som skall ensileras inte har en torrsbstanshalt (ts-halt) <25-30 % för att motverka klostridier (Driehuis, 2013). Den begränsade vattenaktiviteten, anaeroba miljön och det låga pH-värdet förhindrar de flesta oönskade mikroorganismer att tillväxa och fodret kan då lagras under längre tid än utan ensilering (Kung 2001).

Grödor för ensilering

Det är vanligt att använda gräs- och baljväxtblandningar vid ensilering, detta för att få bra näringsvärden i ensilaget. Baljväxter har generellt högre proteinhalt än gräs. Baljväxter innehåller dock oftast mindre socker än gräs, vilket gör dem svårare att ensilera och snabbt få ner pH-värdet i ensilaget (Harrison et al., 2003). Exempel på baljväxter är klöver och lusern (Pederson, 1995; Halling, 2008). Gräsarter som är vanliga att använda i Sverige vid ensilering är bl.a. rajgräs, timotej och ängssvingel. Oftast används flera olika gräsarter samt en eller flera baljväxter i vallen som ska ensileras (Weidow, 2000a). Helsädesensilage är ett ensilage som innehåller hela grödan av stråsäd och/eller trindsäd och har under de senaste åren blivit vanligare att använda i Sverige (Nadeau, 2007). Majsensilage är ett helsädesensilage som framförallt används i södra Sverige. Majs innehåller kolhydrater i form av socker och stärkelse, vilket gör att det är lätt att ensilera och snabbt få ner pH-värdet (Weidow, 2000b). Detta eftersom det finns mycket tillgänglig näring för mjölksyrabakterierna. Majsensilage har

ett högt energi- och kolhydratinnehåll samt har en del svårsmälta kolhydrater som leder till fastare träckkonsistens hos djur (Mgbeahuruike, 2007).

Orsak till oönskad mikrobiell tillväxt

Det är viktigt att det är en god hygien vid hantering av ensilaget, för att undvika att jord och gödsel kommer in i ensilaget där mikroorganismer kan tillväxa (Kung, 2001). Dessutom är det viktigt att silon är ordentligt rengjord innan nytt ensilage läggs i den för att förhindra kontaminering av ensilaget (JTI, 2000). En silo som inte är rengjord eller dåligt rengjord kan innehålla sporer och bakterier som lätt tillväxer vid inläggning av ny grönmassa. Den nya grönmassan har då inte hunnit få en anaerob atmosfär och om det finns bakterier och/eller sporer i silon tillväxer de fort i den nyinlagda grönmassan. Detta har bl.a. observerats vid ett försök av JTI (2000). Försöket påvisade ett minskat angrepp av mikroorganismer i ensilage när silon var rengjord jämfört med en icke rengjord silo.

Det är vanligast att oönskad mikrobiell tillväxt i ensilage beror på att något gått fel i ensileringsprocessen. Ett problem vid ensilering är för låg ts-halt (<25%) eller för hög ts-halt (plansilo >35%, tornsilo >40% och bal >50%) i ensilaget. Ensilage som har en låg ts-halt ger en hög vattenaktivitet som många mikroorganismer trivs i. Mikroorganismer tillväxer bra i hög vattenaktivitet eftersom det finns stora mängder tillgängligt vatten (Kung, 2001). *Klostridium* är en bakterie som tenderar att tillväxa i ensilage med hög vattenaktivitet (Driehuis, 2013). Har ensilaget istället en för hög ts-halt blir vattenaktiviteten låg, vilket orsakar problem vid packning av ensilaget (Kung, 2001). Den höga ts-halten och försämrade packningen ger mycket luft i balen eller silon. Den rikliga mängden luft orsakas av att luften får plats mellan det porösa ensilaget vilket gör att syret blir mer tillgängligt för bakterierna i hela ensilaget. I poröst ensilage med luft i tar det längre tid att uppnå en anaerob miljö. Det gör att de aeroba mikroorganismerna har längre tid på sig att tillväxa i ensilaget (Kung, 2001). I ett försök av McEniry et al. (2007) observerades bland annat att ensilage som var kompakt packat hade ett lägre pH-värde och en lägre ts-halt än ensilage som inte var kompakt packat. Den enda mikrobiella skillnaden mellan det kompakta ensilaget och de löspackade var klassen bacilli som hade högre nivå i det löspackade ensilaget.

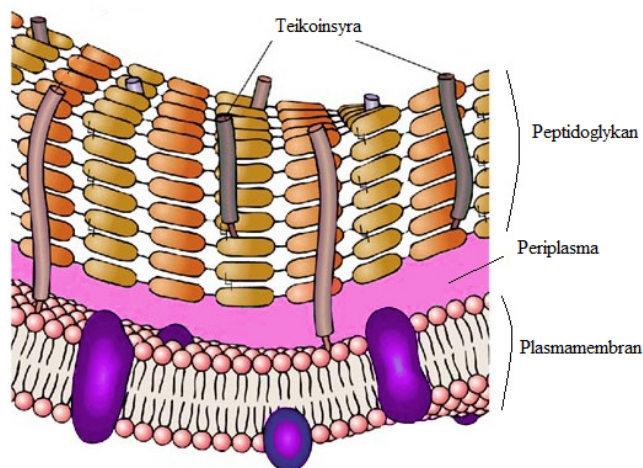
Ett annat fel kan vara att det tagit för lång tid vid den första fasen i ensileringen att uppnå en anaerob miljö, vilket resulterar i tillväxt av aeroba svampar t.ex. mögel och jäst, vilka har kommit in med grönmassan (Pahlow et al., 2003). Tillväxt av mögel och jästsvampar gör att mycket av näringen i ensilaget förbrukas och mjölksyrabakterierna kan bli utkonkurrerade (Kung, 2001). Mjölksyrabakterierna är mycket viktiga för att pH-värdet skall kunna sjunka då de producerar mjölksyra som ger ett surt pH i ensilaget. Blir mjölksyrabakterierna utkonkurrerade bildas det inte tillräckligt med syra eller mjölksyran kan förbrukas av andra organismer (Kung, 2001). Om inte mjölksyrabakterierna kan tillväxa sänks inte pH-värdet och oönskade mikroorganismer kan tillväxa (Rooke & Hatfield, 2003).

Ett annat vanligt problem med den anaeroba stabiliteten är att det av någon anledning har gått hål i plasten för balen, silon eller på annat sätt inte är en anaerob miljö (Kung, 2001). När den slutna miljön bryts och det blir tillgång på syre i ensilaget börjar jäst och mögel snabbt tillväxa. Jästen förbrukar då mjölksyran och pH-värdet ökar vilket gör att andra aeroba mikroorganismer kan tillväxa. När mjölksyran förbrukas kommer pH-värdet att öka i ensilaget (Kung, 2001). I samma försök av McEniry et al. (2007) som nämndes ovan observerades också vikten av luft-täthet. Författarna kunde observera att de silos som inte var

helt täta för luft hade lite mögel i toppen och i botten av silorna. De observerade också att det var lägre ts-halt och högre pH i de silor som inte varit helt anaeroba vid ensilering. Även smörsyrahalten i den oförslutna silon var högre än i den förslutna vilket påvisar klostridier. Dessutom ökade enterobakterer och Bacilli klassen i silor som inte var förslutna. Även en snabbare temperaturökning noterades i de silor som inte varit helt förslutna då silon öppnades. I en studie utförd av Borreani och Tabacco (2010) observerades att tilltagande vattenaktivitet och pH-värde i ensilage under aeroba förhållanden gav ökad mängd av jästsvampar och klostridier i ensilaget. I studien fann de att jäst, mögel och klostridier var negativt korrelerade med nitrat, mjölksyra och ättiksyra. De fann en positiv korrelation mellan minskning av syre, pH och vattenaktivitet. Vilket påvisar att det är viktigt med anaerob miljö, rätt vattenaktivitet och pH-värde i ensilaget.

Klostridier

Klostridier förekommer naturligt på växter i form av sporer, ungefär 100-1000 koloniformade enheter (cfu) g^{-1} gröda. Ensilage som har mindre mjölksyrabakterier än 100 000 cfu g^{-1} (Pahlow et al., 2003) har vanligtvis ett pH-värde över 5 och får då lätt en tillväxt av klostridier som inte är särskilt tåliga för osmosförändringar (Driehuis, 2003). Klostridie angripet ensilage har ofta förhöjda halter av ammoniak och smörsyra, där höga halter av ammoniak är $>120g$ ammoniak per kg^{-1} kväve och höga halter av smörsyra är 5 g per kg^{-1} ts. De höga halterna beror på klostridiernas fermentering av kolhydrater och proteolys av protein vilket kan ge smörsyra lukt i ensilaget (McDonald, 1982).



Figur 2 Gram-positiv cell (modifierad från Willey et al., 2009).

Klostridiebakterier är grampositiva och strikt anaeroba. Toleransen för syre kan variera mellan de olika klostridierna (Pahlow et al., 2003). Bakterier som är grampositiva har liknande cellstruktur som ger snarlika egenskaper hos de olika arterna. Grampositiva bakterier är oftast till utseendet runda och cellväggen är 20-80 nm tjock (Lamed et al., 1987). Cellmembranet består av ett plasmamembran, peptidoglykan och ett periplasma. Periplasma är skiktet mellan plasmamembranet och peptidoglykanet. Plasmamembranet består till största delen av fosfolipider som har en homofil- och homofob ände som ger bakterien dess skydd från omvärlden. Peptidglyckanlagret är mycket tjockt hos grampositiva bakterier och är uppbyggt av aminosyror och teikoinsyra. Teikoinsyrorna är inbäddade i aminosyrorna och teikoinsyra ger cellen negativ laddning (se fig. 1). Grampositiva bakterier kan bilda sporer vid stress. Reproduktionen sker via delning (binär fusion). Grampositiva bakterier är vanligtvis

kemoorganoheterotrofa d.v.s. de använder organiska komponenter för att få energi. Vissa kan också vara fototrofa, använder ljus för att få energi (Willey et al., 2009b).

Klostridiebakterier är ett stort problem för ysterier då *C. tyrobutyricum* orsakar sprängda ostar (Garde et al., 2011). Sprängda ostar är ostar som får stora hål, som inte går att sälja utan måste kasseras eller säljas till ett lägre pris vilket orsakar stora förluster för mejerierna. Mjölken kontamineras genom att klostridiesporer finns i ensilage som via gödsel på juvren hamnar i mjölken. Vid lagring av osten tillväxer klostridiebakterier (Vissers et al., 2006). I ett försök av Nadeau et al. (2010) studerades klostridiesporer i mjölken hos ett antal svenska besättningar. I försöket ingick 23 gårdar, där hälften av besättningarna hade haft problem med höga klostridiesporer i mjölken i minst 65 % av 16 månader i mjölken, medan andra hälften av besättningarna inte hade haft problem med klostridiesporer i mjölken. De registrerade gräs- och klöverensilagens kvalitet efter: ts-halt, pH, etanol, smörsyra, mjölksyra, ammoniumkväve och var sporena fanns i ensilaget samt antalet klostridiesporer i mjölken. I försöket observerades bl.a. att ensilage som inte var behandlat med bakteriehämmande medel och syra hade högre halt av etanol och smörsyra än ensilage som var behandlat. De observerade att de högsta halterna av klostridiebakterier återfanns på kanten av ytskiktet i ensilaget. Studien konstaterade att kor som utfodrats med höga halter klostridiesporer i ensilaget fick oftast höga koncentrationer av klostridiesporer i mjölken. I en studie gjord av Vissers et al. (2006) fann de att ensilaget var den största anledningen till klostridiesporer i mjölken, vilket orsakar sprängda ostar. I försöket observerades ett tydligt samband mellan antal sporer i ensilaget och klostridiekoncentrationen i gårdstanken. De såg att ensilage som har en klostridiekoncentration på log 5 cfu/g eller mer bör undvikas att utfodras med, eftersom det ger stora mängder sporer i mjölken i gårdstanken.

Metabolism

Klostridier som finns i ensilage fermenterar oftast kolhydrater och kallas för sakarolytiska klostridier. Ett exempel på en sakarolytisk klostridie är *C.tyrobutyricum* och i denna grupp inkluderas även *C.Beijerinckii* och *C.Acetobutylicum* (Pahlow et al., 2003). I en studie gjord av Burri (1936) visades bl.a. att *C. tyrobutyricum* tillväxer dåligt i glukos substrat och att det är få kolhydrater som kan utnyttjas av klostridier. I en annan studie av Beynum & Pette (1935) visades att bara glukos kunde användas medan studier av Rosenberger (1956) kom fram till att glukos och fruktos kunde användas. Bryant och Burkey (1956) har observerat att *C.tyrobutyricum* kan fermentera socker och mjölksyra i ensilage och att denna klostridie är något tåligare för lägre pH-värden än de andra klostridiegrupperna. Vid mjölksyranedbrytning, bryts mjölksyran ned till smörsyra, vätgas och koldioxid. På senare tid har det observerats att det finns olika typer av klostridier där sakarolytiska fermenterar kolhydrater. Vilka kolhydrater som en specifik klostridie kan fermenterar skiljer sig åt och kan också bero på miljön den vistas i (Pahlow et al., 2003).

Fermenteringen orsakad av klostridier resulterar i ts- och energiförluster i ensilaget (McDonald, 1982). De stora energi- och näringsförlusterna beror på att det produceras väte och koldioxid. Nedbrytningen leder också till att pH-värdet ökar i ensilaget. Ökningen i pH-värdet beror på att 2 mol mjölksyra bildar 1 mol smörsyra som har ett högre pKa-värde än vad mjölksyran har (Bryant & Burkey, 1956). En studie av Beynum & Pette (1935) observerade att ensilage med rikliga mängder klostridier till en början fick en normal pH- värdes sänkning vid inläggning. Ett tag efter inläggning observerade de att pH-värdet började stiga i ensilaget. Ökningen av pH-värdet berodde på bakteriens metabolism och produktion av smörsyra.

Proteolytiska klostridier är en grupp klostridier som kan bryta ned protein och inkluderar bl.a. *C.Sporogenes*. Protein protolyseras vanligtvis i ensilage som har ett pH över 5, eftersom enzymerna som används vid proteolys har sitt optimum vid det pH-värdet (Pahlow et al., 2003). Klostridier kan metabolisera protein genom proteolys eller genom stickland reaktion. Stickland reaktion innebär att en aminosyra oxideras medan en annan aminosyra är elektronmottagare. Genom denna process kan lite ATP bildas genom substrate- level phosphorylation. Substrate- level phosphorylation är en exogen nedbrytning av organiska molekyler som innehåller mycket energi och som gör att det syntetiseras ADP till ATP (Schwartz & Schäfer, 1973). Vid stickland reaktion av aminosyror bildas ammoniak och organiska syror såsom smörsyra, ättiksyra och propionsyra. Problemet med att aminosyrorna förbrukas av klostridium är att proteinvärdet minskar i ensilaget och biprodukterna som bildas vid proteolys gör att ensilaget blir mindre smakligt för djuren (Pahlow et al., 2003). I en studie gjord av Fonknechten et al. (2010) visade de att klostridiums DNA innehåller information om Stickland reaktion vilket gör att de har konstaterat att klostridium bakterien bryter ned proteiner för att få energi. De observerade att treonin, arginin och serin var de bästa aminosyrorna för att få energi till tillväxt, medan glutamat, aspartat och alanin knappt utnyttjades alls. Det har också kunnat observera att vissa klostridier t.ex. *C.acetobutylicum* kan använda sig av proteinnedbrytning vid tillgång på syre.

Jästsvampar

Jäst är encelliga organismer som tillhör gruppen svampar. Jästsvampar är heterotrofa mikroorganismer vilket innebär att de använder mindre organiska molekyler som huvudsaklig kolkälla. Jäst har eukaryota celler och är fakultativt aerob. Dessa organismer fermenterar vid tillgång på syre men kan även fermentera i miljöer med dålig tillgång på syre. (McDonald et al., 2002a). Många jästsvampar är tåliga för låg vattenaktivitet (Pahlow et al., 2003), lågt pH-värde ner till 4 (Middelhoven & van Baalen, 1988) och låg syrehalt (Pahlow et al., 2003). Jästsvampar förökar sig genom sexuell reproduktion eller asexuell reproduktion (Pahlow et al., 2003). Vid sexuell reproduktion används sporer där positiva och negativa jästsvampar kan producera sporer. Asexuell reproduktion är det vanligaste reproduktionssättet och sker genom avknoppning. Avknoppning är då en dottercell formas på modercellen, dottercellen är en kopia av modercellen (Willey et al., 2009c).

De tre viktiga faktorer som påverkar jästfloran i ensilage är mängden luft vid inläggning av ensilage, typ av gröda som ensileras och tillsatsmedlet myrsyra i ensilaget (Pahlow et al., 2003). Betydelsen av mängden luft i ensilaget vid inläggning på jästfloran har studerats av Jonsson och Pahlow (1984). I försöket kunde de observera att under anaeroba förhållanden var det huvudsakligen *S.cerevisiae* jäst som fermenterade i ensilaget. Vid aeroba förhållanden i ensilage observerades att *Candida. spp* och *Hansenula. spp* var den överrepresenterande jästen i ensilaget. Att det var olika jästarter i aerob och anaerob miljö beror troligtvis på att *Candida. spp* och *Hansenula. spp* har ett tillväxtoptimum vid aeroba förhållanden och tillgång till socker, vilket gör att de kan konkurrera ut *S.cerevisiae* (Pahlow et al., 2003). Vilken gröda som väljs till ensilering påverkar jästfloran eftersom jäst tenderar att tillväxa i grödor som innehåller socker. Den tredje faktorn som påverkar jästfloran är tillsatts av myrsyra i ensilaget, jästen kan använda ättiksyra och mjölksyra vid fermentering som resulterar i höga etanolhalter. Utkonkurrerandet av mjölksyrabakterier sker pga. att jästen förbrukar glukos och mjölksyra vilket gör att näringen för mjölksyrabakterierna minskar och pH-värdet ökar i ensilaget (Pahlow et al., 2003).

Metabolism

Vid anaeroba förhållanden använder jäst socker t.ex. glukos, sukros och maltos i ensilaget. Vid fermenteringen bildas etylalkohol, VFA (acetat, butyrat och propionat), koldioxid och andra alkoholer t.ex. propanol (Middelhoven & van Baalen, 1988). Vid fermenteringen kommer glukos att brytas ned i glykolysen till pyruvat. Via dekarboxylering kommer pyruvat dekarboxylas bilda acetaldehyd av pyruvat. Med hjälp av alkohol dehydrogenas bildas etylalkohol av acetaldehyd (Rooke & Hatfield, 2003). Problemet är att jästen tar kolhydraterna från mjölksyrabakterierna och kan på det viset konkurrera ut mjölksyrabakterierna. Etanolen kan bidra till smakfel på mjölken (Randby et al., 1998). När jästen har tillgång till syre kommer den i stället att använda sig av mjölksyran som mjölksyrabakterierna har bildat (Yimin et al., 1999). Detta sker eftersom jäst kan fermentera mjölksyra via glykolys, citronsyrcykeln och elektrontransportkedjan. Jästen fermenterar mjölksyran till vatten och koldioxid. Förbrukningen av mjölksyra leder till att pH-värdet stiger i ensilaget och fler mikroorganismer kan tillväxa. (Pahlow et al., 2003). I ett försök gjort av Selwet (2008) på majsensilage observerades att antalet jäst ökade kraftigt då ensilaget utsattes för syre. Författaren observerade också att jästen ökade med ca 51 % i myrsyra substrat jämfört med substrat som inte hade blivit behandlat med myrsyra. Vid tillgång på propionsyra ökade antalet jäst med ca 57 % jämfört med substratet som inte blivit behandlat med något tillsatsmedel. I substrat med propionsyra, myrsyra och ammoniumjoner ökade jästcellerna med 23 % i förhållande till substrat som inte var behandlat med något tillsatsmedel.

Klostridiers förhållande till aerob miljö och jäst

Klostridium är en strikt anaerob bakterie, trots det återfinns den ofta i ytskiktet i ensilage som blivit utsatt för luft. Redan 1935 kunde Beinum och Pette isolera prover från ensilage med stora mängder jäst tillsammans med klostridiesporer. Även på senare tid har det observerats att klostridiebakterier återfinns i riklig mängd tillsammans med jästsvamp. De har observerat att klostridier kan bilda sporer i aerob miljö (Jonsson, 1989; Jonsson, 1991). Jonsson (1991) studerade klostridiesporer i gräsensilage i storbalar där det observerades att ytorna på ensilagebalar som blivit utsatta för aerob miljö hade generellt ett högre pH-värde på ytan, höga värden av smörsyra, förhöjda nivåer av mögel och klostridiesporer. Det högsta antalet klostridiesporer fanns på ytan i ensilagebalen. Efter 40 dagar i aerob miljö observerades att klostridiebakterierna hade växt djupare in i balen.

Tabell 1 Positiv(+) eller negativ (-) korrelation mellan mikroorganismanalys och kemiskanalis av majsensilage, temperatur skillnader mellan ensilagetemperatur och referenstemperatur vilket var i kärnan av ensilaget, uppmätt 400mm från nedbrytningsområdet (drt). Där – är negativ korrelation och + är positiv korrelation (modifierad från Borreani & Tabacco 2010)

Registrering	drt	Ts-halt	Vattenaktivitet	PH	Jäst	Mögel	Klostridiesporer	Temp	Nitrat	mjölksyra
Ts- halt	+									
Vattenaktivitet	+	-								
pH	+	+	+							
Jäst	+	+	+	+						
Mögel	+	+	+	+	+					
Klostidiesporer	+	+	+	+	+	+				
Temperatur	+	+	+	+	+	+	+			
Nitrat	-	-	-	+	+	-	-	-		
Mjölksyra	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
ättiksyra	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

I en studie utförd av Borreani och Tabacco (2010) på majsensilage observerade de också tydliga samband mellan jäst och klostridier i ensilage. De observerade ett positivt samband mellan klostridier, jäst och aerob nedbrytning, klostridier, jäst och vattenaktivitet, klostridier, jäst och pH-värde, samt klostridier och jäst. De fann ett starkt positivt samband mellan klostridier, jäst, mögel och ts-halt. Det var en negativ korrelation mellan klostridier och jäst för nitrat, mjölksyra och ättiksyra (tabell 1).

I ett annat försök gjord av Vissers et al. (2007) i Nederländerna studerades koncentrationen av klostridier i ensilage och dess relation till aeroba förhållanden. Försöket var uppdelat i två olika studier där den ena studien gick ut på att jämföra halten klostridier i gräs- och majsensilage. Andra försöket utfördes på majsensilage, där relationen mellan syretillgång och klostridier studerades. I det första försöket ingick 21 gårdar som hade gräsenilage, majsensilage och blandensilage mellan gräs och majs. Ensilaget förvarades i silos och de tog prover från ytan och på mögelfläckar i alla ensilage. I det andra försöket valdes det slumpmässigt ut åtta gårdar som hade majsensilage som utfodrades till mjölkkor. Ensilagesilon delades upp i fraktioner med 5 indelningar och 3 djup och kärna av silon. Från varje sektion och djup togs prover på temperatur, pH och mikroorganismflora. I första försöket kunde de konstatera att det inte fanns några skillnader mellan sporconcentrationen på ensilageytan mellan gräs- och majsensilage. Dock konstaterades att höga halter klostridiebakterier på omkring log 5 per g var vanligare på ytan av ensilaget än i mitten av ensilaget. I gräsenilaget fann de att 5 % av det yttre lagret hade höga klostridiesporhalter medan 0 % av ensilaget i mitten av silon hade höga halter av klostridiesporer. Det var betydligt högre sporhalt vid mögelfläckar på ytan av ensilaget för både gräs- och majsensilage jämfört med i kärnan av ensilaget. De allra högsta koncentrationerna av klostridiesporer återfanns i mögelfläckar i majsensilage. Sporhalterna kunde vara upp till log 5,5 klostridiesporer per gram i mögelfläckarna och i mer än 70 % av fallen fanns det log 5 klostridiesporer per gram i majsensilaget. Gräsenilaget innehöll också högst koncentration av klostridiebakterier i mögelfläckar på ytan av ensilaget. Koncentrationen av klostridiebakterier på ytan i mögelfläckarna var log 4 klostridiesporer per gram gräsenilage. I studien observerade de en signifikant lägre nivå klostridiebakterier i mögelfläckarna i gräsenilaget jämfört med majsensilaget. De observerade också att mögelfläckarna var mellan 5- 10 gånger större i majsensilaget än i gräsenilaget. I blandensilaget var det ca 10 % av gårdarna som hade log 5 klostridiesporer per gram ensilage. De hittade en lägre medelkoncentration klostridiesporer i gräsenilaget jämfört med blandensilaget. Även majsensilaget hade lägre klostridiesporhalt. Där det var hög halt av jäst och mögel var det också högst halt av klostridiesporer, i alla ensilage. De upptäckte att gräsenilaget hade generellt ett högre pH-värde än majsensilaget. Det kunde inte konstateras någon signifikans mellan ts-halt, pH och mikrobiellflora. I den andra studien hade 16 av 128 fall höga klostridie halter i yttrelagret medan de aldrig hittade höga halter i kärnan av ensilaget, vilket påvisar att det inte sker någon tillväxt av klostridiebakterier efter inläggning i silon. I majsensilaget var de högsta halterna av jäst, mögel och klostridier i yttre lagret, även de högsta temperaturerna och högsta pH-värdena var där. De här resultaten påvisar att klostridiesporer återfinns tillsammans med jäst och mögel där temperaturen är som högst, syrehalten högst och pH-värdet som högst. De visade också att tillväxt av jäst och mögel i aerob miljö orsakar temperaturökningar i ensilaget som i sin tur gör att andra mikroorganismer kan tillväxa och på så vis ökar pH-värdet när mikroorganismerna orsakar fermentering i ensilaget. När pH-värdet stigit till minst 4,4 kan *C. tyrobutyricum* tillväxa, vilket kunde observeras i försöket.

I ett försök utfört av Tabacco et al. (2009) i Italien på majs- och vallensilage såg de att klostridier ökar i antal i aerob miljö. De observerade att temperaturen i majs- och vallensilaget lagrat i silo utan tillsatsmedel och majs- eller vallensilage med tillsatts av *Lactobacillus plantarium* var omkring 20 grader Celsius vid öppning av silon. Efter ca 162 timmar av aerob miljö nådde majsensilaget utan tillsatsmedel ett temperaturmaximum på ca 45 grader Celsius. Vid 183 timmar nådde majsensilage med tillsatsmedel ett temperaturmaximum på ca 45 grader Celsius. I vallensilage observerades att ensilaget som var behandlat med *L. plantarium* nådde en maximaltemperatur vid ca 223 timmar vilken var 40 grader Celsius. I vallensilaget utan tillsatsmedel observerades ett temperaturmaximum vid ca 75 timmar på 40 grader Celsius. Vid aerob miljö i 100 timmar observerades att jästen ökade i antal i både majs och vallensilage. Klostridierna ökade kraftigt efter 100 timmar i majsensilage och nådde ett maximum vid 175 timmar på över log 6 sporer per gram. I vallensilaget ökade klostridierna i antal efter 100 timmar men inte lika kraftigt som i majsensilage. Klostridiebakterierna i vallensilage nådde sin topp efter 200 timmar och minskade sedan sakta. Den maximala halten i vallensilaget var något över log 3 sporer per gram.

Diskussion

Kung (2000) och Sundberg & Häggblom (2000) är överens om att en dålig hygien vid ensilagehantering kan bidra till tillväxt av jäst och klostridier. Detta beror på att grönmassan redan innehåller höga halter av bakterier som snabbt kan tillväxa då fermenteringen startar och temperaturen ökar i ensilaget (Kung, 2000; Sundberg & Häggblom, 2000). Dessutom har McEniry et al. (2007) visat att fel ts-halt är en bidragande faktor till oönskad mikrobiell tillväxt i ensilaget. Rooke & Hatfield (2003) visade att mjölksyrabakterier spelar en stor roll i ensileringen genom snabb sänkning av pH-värdet till ca 4, vilket gör att de flesta mikroorganismer får svårt att tillväxa (Kung, 2000; Pahlow, 2003). Tabacco (2010) och McEniry et al. (2007) har båda visat den stora betydelsen av den anaeroba miljön i ensilaget för att förebygga oönskad mikrobiell tillväxt. Detta eftersom tillväxten av oönskade mikroorganismer i ensilaget minskar då det är anaerob miljö, lågt pH-värde och kontrollerad vattenaktivitet (McEniry et al., 2007; Tabacco, 2010). God ensileringsteknik är intressant eftersom det gynnar lantbrukaren att åstadkomma god näringsmässig och hygienisk kvalitet i ensilaget, vilket leder till förbättrad ekonomi för lantbrukaren. Bra ensilage ger friska djur som minskar veterinärkostnader, djuren producerar bra vilket ger ett bra pris på mjölk och kött.

Jäst förbrukar kolhydrater och mjölksyra i ensilaget (Middelhoven & van Baalen, 1988; McDolnad et al., 1991) medan klostridier också förbrukar protein i ensilaget (Pahlow, 2003; Fonknechten et al., 2010). Beynum & Pette (1935), Burri (1936) och Rosenberg (1956) är inte överens om vilka kolhydrater som klostridier kan fermentera. Dock kan det konstateras att klostridier kan fermentera enklare sockerarter så som glukos (Beynum & Pette, 1935; Burri, 1936; Rosenberg, 1956). Skillnaderna i resultaten beror troligtvis på att de har använt olika metoder vid försöken. Metoderna som eventuellt använts kan vara substrat och ensilage. Det kan också bero på vart försöket är utfört någonstans eftersom klimat har påverkan på mikroorganismer i form av temperatur och vattentillgänglighet. Även andra mikroorganismer i ensilaget kan samverka med klostridier och innebära påverkan på försöken.

Förbrukningen av näring i ensilage skall ses som ett stort problem då energiförlusterna får ersättas med kraftfoder till djuren vilket kan vara ett stort problem för ekologiska bönder som endast får använda en begränsad andel kraftfoder i foderstaten till djuren. Dessutom kan stora

mängder kraftfoder i foderstaten ge problem med vomacidosis och nedsatt konsumtion och produktion hos mjölkkor och växande ungnöt (Mgbeahuruike, 2006).

Majsensilage tenderar att innehålla större mängder jäst än vad gräs- och klöverensilage gör. Detta beror på att jätten tillväxer lättare i ensilage som har höga halter kolhydrater som t.ex. majs. Gräs-klöverensilage är något svårare att ensilera pga. mindre kolhydrater vilket gör att mjölksyrabakterierna får det svårare att tillväxa. Klostridierna kan däremot använda protein i ensilage med låg halt kolhydrater och kan utkonkurrera mjölksyrabakterierna genom att förbruka de kolhydrater som finns (Jonsson, 1991; Vissers et al., 2007; Borreani & Tabacco, 2010). Detta visar vikten av att få en så stor population mjölksyrabakterier i ensilaget som möjligt, särskilt i majsensilage och tidigt skördat gräsenilage då kolhydraterna till största delen bör användas av mjölksyrabakterierna och inte av jästsvamp. Detta är en intressant iakttagelse som visar att det är viktigt att ta hänsyn till olika faktorer vid ensilering av olika grödor och fältfloras påverkan för att motverka oönskad mikrobiell tillväxt. Sambandet mellan klostridier och jäst i kolhydratrikt ensilage verkar troligtvis genom att syre kommer in i ensilaget vilket orsakar tillväxt av jäst eftersom jäst är tålig för låga pH-värden (Norrman, 1985; Middelhoven & van Baalen, 1988). *C.tyrobutyricum* är ett exempel på en klostridiebakterie som tål låga pH-värden och kan fermentera mjölksyra i ensilaget (Vissers et al., 2007). När jätten tillväxer ökar pH-värdet eftersom jätten förbrukar mjölksyran i ensilaget (Pahlow et al., 2003). Andra aeroba bakterier börjar tillväxa då pH-värdet ökar (Vissers et al., 2007). Till en början kommer antalet mikroorganismer som är aeroba att tillväxa och syre kan tränga in i balen, vilket ökar tillväxten av aeroba mikroorganismer (Vissers et al., 2007). Då mikroorganismerna successivt ökar minskar syret som kan tränga in i balen och mikroorganismerna kommer först att förbruka syret på ytan. Detta medför att en anaerob miljö uppstår med ett högre pH-värde (Pahlow et al., 2003; Vissers et al., 2007). Anaeroba bakterier börjar tillväxa då pH-värdet ökar och anaerob miljö uppstår. De anaeroba bakterierna fermenterar socker och syror som finns tillgängliga i ensilaget (Vissers et al., 2007). I försöket av Visser et al. (2007) visade resultatet att jäst stiger till ett optimum och sedan ökar antalet klostridier. Det beror troligtvis på att det då bildats tillräckligt mycket koldioxid för att klostridier skall kunna tillväxa i ensilaget. Det är ett viktigt konstaterande eftersom de påvisar ett samband mellan klostridier och jäst. Finns det en samverkan mellan jäst och klostridier kan klostridietillväxt förebyggas genom att förhindra jästsvampar att tillväxa i ensilaget. Dock finns det ännu inte tillräckligt med studier i ämnet utan det skulle behöva utföras fler försök för att det skall gå att konstatera hur och varför jäst och klostridier samverkar. I gräs-klöverensilage som har en hög andel klöver och därmed låg sockerhalt har också mer klostridier men vanligtvis inte mer jästsvampar (Harrison et al., 2003). Där börjar klostridierna tillväxa först vilket producerar smörsyra och andra organiska syror samt koldioxid i ensilaget (Pahlow et al., 2003).

Slutsats

För att förebygga klostridier och jäst i ensilage är det viktigt att ha en anaerob miljö (främst jäst) och lågt pH, rätt ts-halt och att ta hänsyn till vilken gröda som skall ensileras. Jäst och klostridier förbrukar näring i ensilaget i form av kolhydrater och protein. Det finns en samverkan mellan jäst och klostridier. I majsensilage skapar jäst problem då jäst lätt tillväxer i den kolhydratrika miljön och skapar en gynnsam miljö för klostridier att tillväxa då kolhydraterna minskat och protein finns kvar. I kolhydratfattig miljö som i gräs-klöverensilage är det klostridier som är huvudsakliga problemet.

Källförteckning

- Beynum, V. J., Pette, J.W. 1935. Zuckervergärende und laktatvergärende buttersäure-bakterien. In: Clostridia in Silage (eds. T. Gibson). 28, 56-67. Journal of Applied Bacteriology.
- Bok, S., Korampally, V., Darr, C. M., Folk, W. R., Polo-Parada, L., Gangopadhyay, K. S. 2012. Femtogram-level detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A by sandwich immunoassay using nanoporous substrate and ultra-bright fluorescent suprananoparticles. Biosensors and Bioelectronics 41, 409-416.
- Borreani, G., Tabacco, E. 2010. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. American Dairy Science Association 93, 2620-2629.
- Bryant, M. P., Burkey, L. A. 1956. The characteristic of lactate fermenting spore forming anaerobes from silage. Journal of Bacteriology 71, 43-46.
- Burri, R. 1936. Die mikrobiologie verschiedener in der schweiz gebrauchlicher silofutter- typen. In: Clostridia in Silage (eds. T. Gibson). Journal of Applied Bacteriology 28, 56-66.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D., Bach, A. 2007. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology 145, 5-26.
- Dehority, B. A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. Journal of Applied Animal Research 21, 145-160.
- Driehusi, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods. Agricultural and Food Science 22, 16-34.
- Fonknechten, N., Chaussonnerie, S., Tricot, S., Lajus, A., Andreesen, J. R., Perchat, N., Pelletier, E., Gouyvenoux, M., Barbe, V., Salanoubat, M., Paslier, L.D., Weissenbach, J., Cohen, G. N., Kreimeyer, A. 2010. Clostridium sticklandii, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. BMC Genomics 11, 555.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. 2011. Occurrence of Clostridium spp. in ovine milk and manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. International Dairy Journal 21, 272-278.
- Halling, M. A. 2008. Rödklöver-tidig, medelsen och sen, vitklöver, blålusern och käringtand. In: Vallväxter till slåtter och bete samt grönfoderväxter - sortval för södra och mellersta Sverige 2008/2009, 12-15, 18-26.
- Harrison, J., Huhtanen, P., Collins, M. 2003. Perennial grasses. I: Silage science and technology agronomy 42 (red. D, Buxton., R, E, Muck., J, H, Harrison), 665-732. American Society of Agronomy, Inc, USA.
- Henderson, N. 1993. Silage additives. Animal Feed Science and Technology 45, 35-56.
- Kemble. 1956. Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. Journal of the Science of Food and Agriculture 7, 125-130.
- JTI. 2000. Jordbrukstekniska institutet. Nr 265. Hygien i tonsilo för ensilage, inventering, effekt av rengöring. Uppsala, ISSN 1401-4963.
- Jatkuskas, J., Vrotniakiene, V. 2011. The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume-grass silage. Agriculture Science 4, 367-374.
- Jonsson, A., Pahlow, G. 1984. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. Anim. Res. Develop 20, 7-22.
- Jonsson, A. 1989. The role of yeast and Clostridia in silage deterioration. Rapport 42. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Jonsson, A. 1991. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 54, 557-568.
- Kung, L. Jr. 2001. Silage fermentation and additives. Animal and Food Sciences, 145-149, University of Delaware.

- Lamed, R., Naimark, J., Morgenstern, E., Bayer, E. A. 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *American Society for Microbiology* 169, 3792-3800.
- Liu, C., Xue C., Lin, Y., Bai, F. 2013. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances* 31, 257–265.
- McDonald, P., Edwards, R, A., Greenhalgh, J, F, D., Morgan, C, A., Sinclair, L, A., Wilkinson, R, G. 2002a. Silage. *Animal Nutrition*. Upplaga 6, 499-500. Pearson education limited, Edinburgh Gate, Harlow, UK.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R.G.. 2002b. Animal and its Food. *Animal Nutrition*, Upplaga 6, 3-14. Pearson education limited, Edinburgh Gate, Harlow, UK.
- McDonald, P. 1982. Silage fermentation. *British Grassland Society* 7, 164-166.
- McEniry, J., O’Kiely, P., Clipson, N. J. W., Forristal, P. D., Doyle, E. M. 2007. The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. *Grass and Forage Science*, 62, 470-484.
- Mgbeahurike, A. C. 2007. Faecal characteristics and production of dairy cows in early lactation. Report no. 62. Department of Animal Environment and Health, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Middelhoven, W. J., Van Baalen, A. H. M. 1988. Development of the yeast flora of whole-crop maize during ensiling and during subsequent aerobiosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 42, 199-207.
- Muck, R. E., Mertens, D.R., Walgenbach, R.P. 1996. Proteolysis in different forage species. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome> 4/4-2013.
- United States department of agriculture (USDA). April 2013. http://ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=73274
- Muck , R. E., Moser, L. E., Pitt, R. E. 2003. Postharvest factors affecting ensiling. In: *Silage Science and Technology Agronomy* 42. (Red. D, Buxton., R. E, Muck., J. H, Harrison), 251-229. American Society of Agronomy, Inc, USA.
- Nadeau, E. 2007. Effects of plant species, stage of maturity and additive on the feeding value of whole-crop cereal silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 789–801.
- Nadeau, E., Arnesson, A., Bengtsson, A. 2010. Investigation of Clostridial spores in swedish dairy herds. Conference proceedings, 14de International ymposium forage conservation, Brno, Czech Republic, 17-19 mars, 2010.
- Norrman, E. 1985. Produktion av foder med god hygienisk kvalitet. Fakta husdjur, 3. Konsulentavdelningen/husdjur. SLU. Uppsala.
- Ohshima, M., McDonald, P., Acamovic, T. 1979. Changes during ensilage in the nitrogenous components of fresh and additive treated ryegrass and lucerne. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30, 97-106.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oudeelferrink, S. J. W. H., Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: *Silage Science and Technology Agronomy* 42. (eds. D, Buxton., R. E, Muck., J. H, Harrison), 32-78. American Society of Agronomy, Inc, USA.
- Pederson, G. A. 1995. White Clover and Other Perennial Clovers. Forages, vol. I, 5th ed., An introduction to grassland agriculture (red. R, F, Barnes., D, A, Miller., C, J Nelson.), 227-236. Iowa State University Press, Ames, IA, 50014, USA.
- Randby, Å.T., I. Selmer-Olsen, L. Baevre 1999. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. . *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 420-428.
- Richardt, W. 2012. Silage quality and animal health. In: *International Silage Summit- the Future of Silage Preservation*. (H, Auerbach., C Luckstädt., F, Weissbach), 43-62. Addcon Grop GmbH, Tyskland.

- Rooke, J. A., Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. In: Silage Science and Technology Agronomy 42, 96-116. American Society of Agronomy, Inc, USA.
- Rosenberger, R. F. 1959. Obligate anaerobes which form skatole. *Journal of Bacteriology* 77, 517.
- Schwartz, A. C., Schäfer, R. 1973. New amino acids, and heterocyclic compounds participating in the stickland reaction of *Clostridium sticklandii*. *Arch. Mikrobiol* 93, 267-276.
- Selwet, M. 2008. Effect of organic acids on numbers of yeast and mould fungi and aerobic stability in the silage of corn. *Journal of Veterinary Sciences* 11, 119-123.
- Tabacco, E., Piano, S., Cavallarin, L., Bernardes, T. F., Borreani, G. 2009. Clostridia sporeformation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1632-1641.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, M. C., Te Giffel, P., De Jong, J. M. G. L. 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria american. *Dairy Science Association* 89, 850–858.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, M. C., Te Giffel, P., De Jong, J. M. G. L. 2007. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Dairy Science Association*, 90, 928–936.
- Weidow, B. 2000a. Odling av vall. *Växtodlingens grunder*, 300-304, Stockholm: LTs förlag.
- Weidow, B. 2000b. Odling av grönfoderväxter. *Växtodlingens grunder*, 323-328, Stockholm: LTs förlag.
- Willey, M. J., Sherwood, M. L., Woolverton, C. J. 2009a. *Prescotts Principles of Microbiology*, 138. McGraw- Hill, New York.
- Willey, M. j., Sherwood, M. L., Woolverton C. J., 2009b. *Prescotts Principles: of Microbiology*, 48-49 New York, McGraw- Hill.
- Willey, M. j., Sherwood, M. L., Woolverton, C. J., 2009c. *Prescotts Principles: of Microbiology*, 543. New York, McGraw- Hill.
- Wilkinson, J. M., Davies, D. R. 2012. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science* 68, 1–19.
- Yimin, C., Benno, Y., Ogawa, M., Kuma, S. 1999. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 520–526.

Vid **Institutionen för husdjurens miljö och hälsa** finns tre publikationsserier:

- * **Avhandlingar:** Här publiceras masters- och licentiatavhandlingar
- * **Rapporter:** Här publiceras olika typer av vetenskapliga rapporter från institutionen.
- * **Studentarbeten:** Här publiceras olika typer av studentarbeten, bl.a. examensarbeten, vanligtvis omfattande 7,5-30 hp. Studentarbeten ingår som en obligatorisk del i olika program och syftar till att under handledning ge den studerande träning i att självständigt och på ett vetenskapligt sätt lösa en uppgift. Arbetenas innehåll, resultat och slutsatser bör således bedömas mot denna bakgrund.

Vill du veta mer om institutionens publikationer kan du hitta det här:
www.slu.se/husdjurmiljohalsa

DISTRIBUTION:

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa
Box 234
532 23 Skara
Tel 0511-67000
E-post: hmh@slu.se
Hemsida:
www.slu.se/husdjurmiljohalsa

*Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal
Science
Department of Animal Environment and Health
P.O.B. 234
SE-532 23 Skara, Sweden
Phone: +46 (0)511 67000
E-mail: hmh@slu.se
Homepage:
www.slu.se/animalenvironmenthealth*
