



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science

Jäst i grönmassa för ensilering – en undersökning på svenska gårdar

Linnéa Stolt

Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, **473**

Uppsala 2014

Degree project / Swedish University of Agricultural Sciences,
Department of Animal Nutrition and Management, **473**

Examensarbete, 30 hp

Masterarbete

Husdjursvetenskap

Degree project, 30 hp

Master Thesis

Animal Science



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science
Department of Animal Nutrition and Management

Jäst i grönmassa för ensilering – en undersökning på svenska gårdar

Yeast in grass crop intended for silage – a survey on Swedish farms

Linnéa Stolt

Handledare: Rolf Spörndly, SLU, Inst. för husdjurens utfodring och vård
Supervisor:

Bitr. Handledare:
Ass. Supervisor:

Examinator: Cecilia Müller, SLU, Inst. för husdjurens utfodring och vård
Examiner:

Omfattning: 30 hp
Extent:

Kurstitel: Examensarbete i Husdjursvetenskap – D30
Course title:

Kurskod: EX0549
Course code:

Program: Agronomprogrammet - husdjur
Programme:

Nivå: Avancerad A1E
Level:

Utgivningsort: Uppsala
Place of publication:

Utgivningsår: 2014
Year of publication:

Serienamn, delnr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 473
Series name, part No:

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>
On-line published:

Nyckelord: Vallfoder, ensilage, varmgång, lagringsstabilitet, PCR
Key words: Forage, silage, aerobic stability, PCR

Innehåll

1. Introduktion	4
1.1 Ensileringsprocessen.....	4
1.2 Jäst	5
1.3 Varmgång vid uttag.....	6
2. Material och metoder	7
2.1 Insamling av prover	7
2.2 Transportering och lagring av prov.....	7
2.3 Odling av prov.....	7
2.4 Uträkning av antalet jästkolonier	10
2.5 Odling av jästisolat till frys-kultur och för DNA-extraktion.....	10
2.6 DNA-extraktion	10
2.7 PCR-körning	101
2.8 Gel-elektrofores.....	11
2.9 Rening av PCR-produkt	11
2.10 Förberedelse inför sekvensering	11
2.11 Artbestämning av jäst.....	11
2.12 Statistisk analys.....	112
3. Resultat.....	12
3.1 Antalet mikroorganismer i ursprungslösningen (jäst och bakterier) och andelen jäst	12
3.2 Resultat från BLAST-sökning för jästsekvenser.....	12
3.3 Förekomsten av olika jästarter på gårdarna.....	14
3.4 Sammanställning av enkätsvar	145
3.5 Statistisk analys av samband	16
4. Diskussion.....	18
4.1 Jästarter samt totalantalet jäst.....	18
4.2 Managementfaktorer och totalantalet jäst.....	188
4.3 Felkällor	20
4.4 Slutsats.....	20
5. Tack.....	21
6. Referenser.....	22
7. Bilaga	24

Abstract

Undesired microorganisms like yeast and mould are present on the green forage at harvest. A successful ensiling based on lactic acid producing bacteria may reduce the number of detrimental microorganisms that affects the fodder quality negatively. Yeast may however survive during the storing period and is considered to be the initiating factor of aerobic deterioration of the silage after opening the silo. By respiring glucose and lactate, producing carbon dioxide, water and heat, the quality of the feed is lowered with increased pH, heating of the forage and further deterioration by mould and aerobic bacteria starts. The purpose of this study was to screen the field flora of yeast in fresh grass at 15 different farms in different parts of Sweden, and to analyze connections between different management factors and yeast counts.

The most common species that were found were all from the genus *Cryptococcus*. These species are however generally not considered to be involved in aerobic deterioration since they lack the ability to ferment and assimilate lactate. The species identified were rather evenly spread over all farms in the study. A tendency could be seen for yeast counts to be higher in the second harvest compared to the first harvest, and also to increase with increased sward age. To gain more knowledge about yeast species that initiate aerobic deterioration, further research involving determination of yeast species surviving the ensiling period is recommended.

Sammanfattning

Oönskade mikroorganismer som jäst och mögel finns naturligt på grönmassan som körs in från åkern. Det är viktigt att minska antalet av dessa eftersom foderkvalitén kan påverkas negativt. Ett sätt att göra detta är att konservera grönmassan genom ensilering. Ett fenomen som kan uppkomma när silon öppnas är varmgång i ensilaget, och jäst anses vara den initierande faktorn till detta. Genom att jästen respirerar glukos och laktat och producerar koldioxid, vatten och värme sänks den näringsmässiga kvalitén på fodret, pH höjs och fodret blir varmt. Eftersom olika jästarter har olika egenskaper är det viktigt att veta vilka som finns närvarande innan, under och efter ensilering. Mängden jäst som finns på grönmassan kan också variera. Därför var syftet med denna studie att bestämma fältfloran av jäst i grönmassan på 15 olika gårdar runt om i Sverige. Vidare studerades hur mängden jäst påverkas av olika managementfaktorer och förhållanden vid skörd. Samband mellan olika managementfaktorer samt förhållanden under skörd och mängden jäst studerades också.

De vanligaste arterna som hittades var alla av släktet *Cryptococcus*, som generellt inte anses vara bidragande till varmgångsprocessen eftersom dessa inte kan fermentera laktat. De olika arterna var jämnt spridda mellan de olika gårdarna. Grönmassan från andra skörden tenderade ha en högre mängd jäst jämfört med grönmassan från förstaskörden och mängden jäst tenderade att öka med ökad vallålder. För att få ökad kunskap om vilka jästarter som initierar varmgång vid uttag rekommenderas vidare forskning där även de jästarter som överlever ensileringen analyseras.

1. Introduktion

Mikroorganismer som jäst, mögel och bakterier finns naturligt på grönmassan som körs in från åkern (Pahlow *et al.*, 2003). Genom syretät lagring erbjuds goda betingelser för mjölksyrabakterier (LAB) att tillväxa och en konserveringseffekt uppstår, kallad ensilering. Genom ensilering kan antalet oönskade mikroorganismer som bakterier (t.ex. klostridier) och jäst minskas vilket är av största vikt för att producera ett ensilage som är av bra foderkvalité, både när det gäller näring och hygien (Holmes och Muck, 2007). Ett fenomen som ofta uppkommer vid öppning och uttag av ensilage är varmgång. Jäst anses vara den initierande orsaken till detta (Jonsson och Pahlow, 1984; McEniry *et al.*, 2007; Koc *et al.*, 2009). Genom att jästen respirerar substrat som glukos och laktat vilket bildar värme, koldioxid och vatten sänks fodervärdet och torrsubstanshalten (ts-halten), medan pH höjs (Lindgren *et al.*, 1985; Holmes och Muck, 2007). Detta underlättar tillväxt för andra oönskade mikroorganismer som är känsliga för lågt pH.

Jästsläktet har stor diversitet och de finns också i många olika nischer i naturen. En del har förmågan att fermentera, en del kan använda laktat som substrat vid utvinning av energi och de kan växa under både aeroba och anaeroba förhållanden. Beroende på omständigheterna växlar den dominerande arten (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988; Jonsson *et al.*, 1990). Omständigheterna kring skörd och lagring har stor inverkan på hur mycket jäst som finns i silon under lagring. Det har t.ex. visats att förtorkning till ts-halter runt 50 % leder till att antalet jäst ökar i den färska grönmassan (Jonsson och Pahlow, 1984; McEniry *et al.*, 2007) och att om syre läcker in under lagring ökar risken för varmgång när silon sedan öppnas (McEniry *et al.*, 2007).

Syftet med föreliggande studie var att undersöka fältfloran av jäst på ett antal gårdar på olika platser i Sverige, och bestämma vilka arter som var vanligast förekommande. Hur olika managementfaktorer samt förhållanden vid skörd påverkade mängden jäst i grönmassan undersöktes också.

1.1 Ensileringsprocessen

Växternas respiration och utvinning av lösliga kolhydrater pågår fortfarande då grödan skördats och läggs in i silon. Restprodukterna blir koldioxid, vatten och värme (Muck *et al.*, 2003). Hur mycket substrat som finns tillgängligt för respiration beror på snittlängden hos grödan, skördetidpunkt, grödans art, och hur lång tid det tar innan grödan tas hem från fältet (Muck *et al.*, 2003). Hur lång tid det tar innan allt syre är förbrukat när silon väl är täckt beror på ett antal faktorer, som grödans snittlängd och packningstid (Holmes och Muck, 2007).

Jäst, mögel och andra bakterier är också fortfarande aktiva. Efter att silon stängts och syret har förbrukats påbörjas fermentationsfasen, där LAB kan börja arbeta. Denna fas pågår intensivt ungefär en vecka (Pahlow *et al.*, 2003). En lyckad fermentering innebär en hög produktion av laktat vilket ger en snabb pH-sänkning. Under denna period konkurrerar dock LAB med andra fakultativa och obligata anaeroba mikroorganismer om substraten från grönmassan, vilket påverkar fermenteringsfasens utgång. När pH sänks upphör aktiviteten av alltfler konkurrerande bakterier för att till slut helt domineras av LAB som tål lågt pH bäst. Till slut inhiberas också LAB genom det låga pH-värdet i silon och under själva lagringen av ensilaget händer relativt lite, så länge som silon är syretät (Muck *et al.*, 2003; Pahlow *et al.*, 2003). Bakterier är avdödade eller inaktiverade som endosporer. Även syra-toleranta jästarter är inaktiverade (Pahlow *et al.*, 2003).

När silon väl öppnas får syret fritt tillträde. När detta sker kan framförallt jäst men även bakterier börja växa till. Genom att vissa arter av jäst använder laktat som substrat vid respiration höjs pH i silon, temperaturen ökar och näringsvärdet minskar, vilket är negativt för både djur och lantbrukare. Detta fenomen kallas ofta för varmgång (Pahlow *et al.*, 2003).

1.2 Jäst

Jäst är fakultativt aeroba, eukaryota mikroorganismer som förökar sig genom knoppning. De huvudsakliga fermenteringsprodukterna för jäst är etanol och koldioxid (Pahlow *et al.*, 2003). Även flyktiga fettsyror (VFA) som acetat, butyrat, propionat och koldioxid bildas i små mängder (Middelhoven och van Baalen, 1988). Under aeroba förhållanden respirerar jästen där vissa arter använder laktat som substrat (Yimin *et al.*, 1999).

Flera olika arter av jäst har isolerats från olika grödor, och sammansättningen verkar skilja sig mellan olika faser i ensileringsprocessen (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven *et al.*, 1990). I studier av färsk majs hittades *Candida ingeniosa*, *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus salmonicolor* och *Rhodotorula rubra*. När majsen ensilerades och ensileringsprocessen hade påbörjats och pågått i två dagar hittades följande arter i majsensilage: *Candida holmii*, *C. milleri*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. famata*, *Geotrichum candidum* och *Wickerhamomyces anomalus* (kallades tidigare *Hansenula anomala* och *Pichia anomala*) (Middelhoven och van Baalen, 1988). Även *Saccharomyces dairensis* har hittats i majsensilage (Middelhoven och Franzen, 1986). När ensilage utsattes för syre förekom *Candida holmii*, *C. lambica* och *C. milleri* (Middelhoven och van Baalen, 1988). Antalet jäst (colony forming units/g) ändrades under hela ensileringsprocessen. På den färska majsen fanns ca log 5 cfu/g. Efter att ha ensilerats i två veckor var jästantalet under ensileringen som högst, log 7 cfu/g. Därefter minskade antalet åter till ca log 5 cfu/g. Efter att ha utsatts för syre i 100-150 timmar var antalet log 8,5-9,5 cfu/g (Middelhoven och van Baalen, 1988). På färsk grönmassa av gräs hittades jäst från flera olika släkter, t ex *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium* och *Torulopsis*. Under anaeroba förhållanden var arter av *Saccharomyces*-släktet de dominerande i ensilage, men några isolat av släktena *Candida* och *Hansenula* hittades också (Jonsson och Pahlow, 1984). Under aeroba förhållanden förekom flera arter av släktet *Candida*, men även isolat av *Wickerhamomyces anomalus* och *Trichosporon variabile* hittades (Jonsson och Pahlow, 1984; Jonsson *et al.*, 1990). Vid ytan på balar som drabbats av varmgång hittades *Candida lambica* och *Wickerhamomyces anomalus* (Jonsson *et al.*, 1990).

Det är troligtvis jästens fysiologiska egenskaper som gör att sammansättningen av arter skiljer sig under ensileringsprocessen. Dessa egenskaper verkar också kunna skilja sig mellan olika stammar av samma art. I färsk grönmassa hittas främst aeroba jästarter, under ensilering och under lagring ökar laktatassimilerande och fermentativa jästarter (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988; Pahlow *et al.*, 2003). När varmgång uppträder ökar dessutom diversiteten hos de laktatassimilerande jästarterna (Lindgren *et al.*, 1985). Ett ensilage kan innehålla log 2 cfu laktatassimilerande jäst/g torrs substans utan att varmgång uppkommer (Jonsson och Pahlow, 1984).

Arter som hittats på färsk majs (*Candida ingeniosa*, *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus salmonicolor* och *Rhodotorula rubra*) är alla arter som är känsliga för ättiksyra och som inte heller kan assimilera denna syra vid pH 4. Däremot har alla utom *C. ingeniosa* befunnits kunna tillgodogöra sig laktat och etanol i varierande mängd

(Middelhoven och van Baalen, 1988). Arter av släktena *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium* och *Torulopsis* som isolerats från färsk grönmassa ansågs generellt inte kunna fermentera eller tillgodogöra sig laktat alls (Jonsson och Pahlow, 1984). Under ensileringen hittades andra arter som fermenterade glukos i stor utsträckning men som också visade sig kunna fermentera laktat (*Candida lambica*, *Candida krusei*, *Wickerhamomyces anomalus* och vissa arter av *Saccharomyces*) (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988; Jonsson *et al.*, 1990).

1.3 Varmgång vid uttag

Aerob stabilitet definieras som det antal timmar ensilage kan utsätts för syre innan en temperaturökning på 2° C över omgivande temperatur sker (O'Kiely, 1993 citerad av Cherney och Cherney, 2003). En ökning av pH-värdet till över 7 på tre dagar, samt en ökning av jästantal till log 9 i silon, anses båda vara tecken på att varmgång har initierats (Jonsson och Pahlow, 1984). Varmgång uppträder i närvaro av syre, ett tillräckligt högt antal jästsvampar, tillgång på substrat för dessa mikroorganismer, temperatur över 4° C och en ts-halt under 80 % (Holmes och Muck, 2007).

Förtorkning på fält sker för att höja ts-halten och koncentrera VFA, och olika förtorkningstid (och då också ts-halt) kan påverka jästsvampars tillväxt och därmed hur mycket jäst som följer med grödan in i silon (McEniry *et al.*, 2007). I ett försök provades olika förtorkningstid på olika vallsammansättningar för att titta på hur detta kunde påverka ensileringsegenskaper hos rundbalar. Förekomsten av jäst i grönmassan ökade med ökande förtorkningstid och var som högst efter 24 timmar (log 3 cfu/gram) vid en ts-halt på 46,5 % (McEniry *et al.*, 2007).

I början av ensileringen (den första veckan) kan antalet jäst nå ett antal på ca log 7 cfu/gram. Allt eftersom lagringen fortgår minskar antalet jäst (Jonsson och Pahlow, 1984). Vid öppningen av silon kommer syre återigen bli tillgängligt för den jäst som finns kvar och den börjar då respirera. Denna respiration orsakar ts-förluster eftersom substraten främst är VFA och laktat (Lindgren *et al.*, 1985; Holmes och Muck, 2007). Så småningom höjs pH-värdet, och mögel och bakterier kan då börja tillväxa. Detta accelererar varmgången och fodret blir snabbt förstört (Ranjit och Kung, 2000). Hur snabbt det går påverkas också av temperaturen utanför silon. I ett försök jämfördes mängden jäst (log cfu/g) och koldioxidproduktionen (CO₂) från densamma. Vid inläggning fanns det log 5 cfu/g majsensilage. Efter ensileringen fanns det vid temperatur 20° C, 30° C och 37° (i kontrollensilagen) log 6, log 5 och log 2 cfu jäst/g. Efter att ensilaget hade utsatts för syre i fem dagar vid de olika temperaturerna hade antalet jäst i ensilagen vid de högre temperaturerna ökat upp till log 6 cfu/g. Ensilaget som förvarats vid 20° C var i stort sett oförändrat. Högst koldioxidproduktion hade ensilaget i den högsta temperaturen (114 g/kg ts), medan ensilaget som förvarats vid 20° C hade en produktion på 30 g CO₂/kg ts (Koc *et al.*, 2009).

Förekomst av syre under lagring ökar chanserna för jästsvampar att överleva och växa till, speciellt de laktatassimilerande jästarterna (Jonsson och Pahlow, 1984; Lindgren *et al.*, 1985). Borreani och Tabacco (2010) jämförde förekomsten av antalet jäst och mögel i olika delar av 54 olika plansilos. Torrsubstanshalten och pH var andra variabler som mättes. I mitten av silon uppmättes ett jäst- och mögelantal på log 2,93 respektive log 1,76 cfu/g (medelvärden). Ts-halten var i medeltal 34,3 %, och pH ca 3,64. I de perifera områdena var jäst- och mögelantalet högre (5,48 respektive 3,71 log cfu/g). Torrsubstanshalten var lägre (34,1 %) och pH högre (4,97). Där mögel var direkt synligt var siffrorna log 6,33 cfu/g för jäst och log 8,0 cfu/g för mögel. Torrsubstanshalten var 33,4 % och pH 6,84. Temperaturen i mitten av

silon användes som referenstemperatur (medeltemperatur 18,6° C), och i de perifera områdena var temperaturen förhöjd med mellan 10° C och 13,3° C (medelvärden). Den omgivande temperaturen påverkade temperaturen ungefär 200 mm in i silon vid utfodringsfasen. Detta fynd stöds även av Lindgren *et al.* (1985) som fann att stabiliteten hos ensilaget var som kortast vid ytan av silon, och betydligt bättre på 1,6 meters djup. Även i detta försök hittades flest jästsvampar på ytan av silon där syre troligtvis kunnat passera in under fermenteringsprocessen.

Densiteten i det packade ensilaget avgör hur långt in i silon syret når, och då också hur stora ts-förlusterna blir. En högre densitet gör också att mer ensilage får plats i silon (Holmes och Muck, 2007). Torrsubstanshalten spelar stor roll. För plansilo finns rekommendationer på en ts-halt mellan 30-40 %. Torrare gröda är mer porös och svårpackad vilket ökar risken för syreintrång djupare in i silon (Holmes och Muck, 2007). Hackad grönmassa har visat sig ge färre porer i ensilaget, troligtvis för att det kortare gräset är lättare att packa (McEniry *et al.*, 2007). Andra faktorer som påverkar densiteten i en plansilo är hur tjockt lager grönmassa som packas varje gång, samt förhållandet mellan vikten på maskinen som packar och packningstid per ton grönmassa (Muck och Holmes, 2000).

2. Material och metoder

2.1 Insamling av prover

Grönmasseprover samlades in från 15 olika gårdar på varierande platser runt om i Sverige. Urvalskriterier för gårdarna var att tillsatsmedel inte användes annat än sådana som är baserade på mjölksyrabakterier. Ensilaget skulle helst lagras i plan- eller slangsilos. Gård 1 och 2 fanns i norra delen av landet, gårdarna 3-8 fanns i mellersta, östra delen och gårdarna 9-15 fanns i sydöstra delen (figur 1). Åtta prover samlades in under första skörden, resterande sju under andra skörden (tabell 1). Provets volym var på ca en liter och togs från en specifik åker på den enskilda gården. Insamlingsdatum, insamlingsställe, silotyp och eventuell användning av tillsatsmedel noterades (tabell 1). Lantbrukarna intervjuades i samband med provtagning angående väderförhållanden vid skörd, vallsammansättning, maskinpark etc. (bilaga 1). Uppföljning gjordes genom telefonintervjuer huruvida lantbrukarna haft problem med varmgång i ensilaget varifrån grönmasseproven togs.

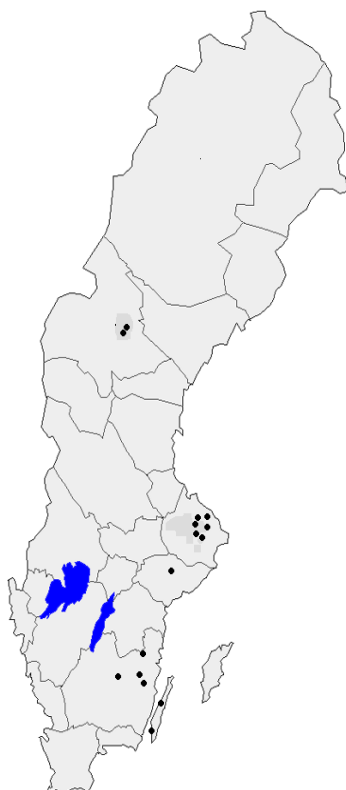
2.2 Transportering och lagring av prov

Grönmassaprovet transporterades i en kylväska med kylklampar. I vissa fall skickades proven med post och då i vadderade kuvert, också med kylklampar i. På laboratoriet förvarades de i kylskåp till dess att det var dags att odla fram mikroorganismer från dem. Tiden som förflöt mellan provtagning och odlingsstart var olika för de olika proven (2-36 timmar). Det var mer praktiskt än att odla ett prov för sig varje gång.

2.3 Odling av prov

För att isolera mikroorganismerna från grönmassan blandades 30 gram prov (våtvikt) med 270 ml autoklaverad Ringerlösning (0,04 M) (två tabletter till en liter avjoniserat vatten). Grönmassan vägdes upp i en Stomacher-påse, därefter tillsattes Ringerlösningen. Provet behandlades i Stomacherapparat (Laboratory blender Stomacher 3500, Seward Ltd, Worthing,

West Sussex, UK) i 60 sekunder i två omgångar vid ”Normal hastighet”. Därefter fördes en del av vätskan över till ett provrör. Denna vätska späddes därefter stegvis i tiondelar (dvs. 1 ml pipetterades till ett provrör med 9 ml ringerlösning osv). Därefter togs 0,1 ml från varje spädning och racklades ut på två malt extrakt agar-plattor (MEA-plattor) med 120 mg cykloserin per liter agar (6 ml/l av cykloserinlösning där 20 g cykloserin lösts i 1 liter vatten). Cykloserinet tillsattes för att inhibera viss bakterietillväxt. Plattorna fick sedan stå i ca 30 minuter och inkuberades sedan (upp och ner) i värmeskåp (Termaks, Bergen, Norge) i 25° C i tre dygn, varefter antalet jästkolonier räknades, innan plattan återigen inkuberades i 25° C under två dygn innan de åter räknades. Därefter renströks ett antal kolonier från varje gård på nya MEA-plattor med antingen cykloserin (120 mg/l, första skörd) eller penicillin och streptomycin (6 ml/l av vardera antibiotika, andra skörd), detta för att inhibera viss bakterietillväxt. Att tre olika antibiotika användes berodde på att plattorna från första skörden blev övervuxna av mikroorganismer väldigt fort, vilket gjorde det svårt att få rena kolonier att arbeta med. Därför byttes antibiotikan ut till andra skörden. Mellan 10 till 19 kolonier valdes från varje gård genom en okulär besiktning. Kolonierna som var luddiga och mögelliknande uteslöts. Helst skulle alla kolonier som valdes vara jäst, men eftersom vissa bakterier kunde växa på plattorna med antibiotika var det oundvikligt att några bakteriekolonier oavsiktligt valdes ut. De utvalda kolonierna inkuberades i 25° C i fem dagar i Yeast Extract Peptone Dextrose-medium (YPD-medium). Genom att återigen besiktiga kolonierna okulärt bestämdes därefter vilka som var jäst och de som ansågs vara bakteriekolonier uteslöts.



Figur 1. Geografisk placering av de gårdar som deltog i studien.

Tabell 1. Insamlingsdatum, insamlingsställe, silotyp och eventuell användning av tillsatsmedel på de 15 gårdar som inkluderades i studien

Gårds-nummer och plats	Datum för insamling	Insamlingsställe	Packat/ej packat	Silo-typ	Användning av tillsatsmedel?
Gård 6 (1:a skörd) Uppsala	5 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo	Nej
Gård 8 (1:a skörd) Uppsala	5 juni	Hackat, hemkört	Packat	Plansilo	Ja, mjölksyrebakterier
Gård 7 (1:a skörd) Storvreta	6 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Slangsilos	Nej
Gård 3 (1:a skörd) Tierp	7 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Slangsilos	Nej
Gård 5 (1:a skörd) Månkarbo	11 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Slangsilos	Nej
Gård 4 (1:a skörd) Örbyhus	12 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Slangsilos	Nej
Gård 1 (1:a skörd) Östersund	13 juni	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo med tak	Nej
Gård 2 (1:a skörd) Östersund	13 juni	Hackat, hemkört	Packat	Plansilo med tak	Nej
Gård 14 (2:a skörd) Målilla	6 juli	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo	Ja, mjölksyrebakterier
Gård 15 (2:a skörd) Horn	14 juli	Hackat, på åkern		Plansilo	Nej
Gård 10 (2:a skörd) Eksjö	16 juli	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo	Nej
Gård 13 (2:a skörd) Flen	17 juli	Hackat		Plansilo	Nej
Gård 12 (2:a skörd) Köpingsvik	18 juli	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo	Nej
Gård 11 (2:a skörd) Degerhamn	21 juli	Hackat, hemkört	Ej packat	Plansilo	Nej
Gård 9 (1:a skörd) Hultsfred	26 juli	På åkern, hackat på labb	Ej packat	Rundbal	Nej

2.4 Uträkning av antalet jästkolonier

För att få ett ungefärligt värde på mängden jäst i grönmassan från varje gård gjordes en uppskattning genom formeln

$$\frac{C_1+C_2+\dots+C_n}{W_1+W_2+\dots+W_n}$$

där $C_1+C_2+\dots+C_n$ är antalet kolonier räknade på olika plattor och $W_1+W_2+\dots+W_n$ är motsvarande spädningfaktor (enligt Niemelä, 1984).

2.5 Odling av jästisolat till fryskultur och för DNA-extraktion

De renstrukna kolonierna ympades sedan över i odlingsrör med 4 ml YPD-agar (10 g jästextrakt/l, 20 g bakteriologiskt pepton/l, båda från Becton Dickinson Company, Sparks, Maryland, USA samt 20 g glukos/l). De inkuberades på skakbord i 25° C i 48 timmar. För att säkert veta att det var jäst och inte bakterier som växte i odlingsröret gjordes därefter en undersökning i mikroskop. Endast de prover som var jäst användes vidare. 1 ml av varje prov blandades med 1 ml glycerol och frystes in i -70° C. 1 ml av denna kultur användes sedan till DNA-extraktion (se nedan).

2.6 DNA-extraktion

DNA-extraktion gjordes enligt Liberal *et al.* (2005) med några modifieringar. 1 ml av provet centrifugerades i eppendorf-rör i två minuter (21 000 varv, Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA), supernatanten togs därefter bort. Pelleten löstes upp i 200 µl TE-buffer (100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA), 200 µl 6 % natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)-lösning tillsattes och lösningen skakades med vortex (Vortex genie 2, Scientific Industries, New York, USA) i en minut på högsta hastighet. 50 µl 3 M K-acetat tillsattes därefter och lösningen lämnades i rumstemperatur i fem minuter och centrifugerades sedan i fem minuter. 400 µl av supernatanten överfördes till ett 2 ml eppendorf-rör och 1200 µl kall etanol (-20° C) tillsattes. Lösningen stod i fem minuter i rumstemperatur och centrifugerades sedan i fem minuter (21 000 varv) och supernatanten togs bort. Pelleten torkades i sterilbänk i ca 30-60 minuter tills den var helt torr och löstes sedan upp i 50 µl RNase-fritt vatten.

2.7 PCR-körning

Till varje PCR-prov gjordes en blandning i eppendorf-rör som bestod av 1 µl 5' forward primer (NL 1), 1 µl 3' reverse primer (NL 4) samt 21 µl RNase-fritt vatten. Detta överfördes sedan till IllustratTM purReTaq Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Till detta togs sedan 2 µl av det extraherade DNA:t. Koncentrationen i varje rör av varje dNTP blev då 200µM, 50 mM KCl och 1,5 mM MgCl₂. Detta centrifugerades sedan i ca en minut (Microspin FV-2400, Biosan, Riga, Lettland). I den inledande fasen av PCR-programmet skedde initial denaturering (94°C i 2 minuter), därefter 30 cykler (94°C i 30 sekunder, 50°C i 30 sekunder och 72°C i 1 minut) och till sist elongering (72°C i 5 minuter) (MiniCyclerTM, MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, Kanada).

2.8 Gel-elektrofores

2 µl loading dye (6X), 8 µl avjoniserat vatten samt 2 µl av PCR-provet tillsattes i 1.5 ml eppendorfrör. 10 µl av varje prov överfördes sedan i brunnar på agaros-gel (10 g/liter) med 30 µl etidiumbromid. Som buffer användes 0,5X TE-buffer. Proven kördes sedan i ca en timme, med 100 V och 80 mA. Proven avlästes sedan i Bio-Rad Gel Doc™ XR Universal Hood (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA). De prov som hade ett tydligt band fungerade och gick sedan vidare till rening. Detta steg gjordes för att se att alla prov innehöll DNA inför sekvensering (se nedan).

2.9 Rening av PCR-produkt

För rening av PCR-produkt användes QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Düsseldorf, Tyskland). 5 volymer av PB-buffer tillsattes till 1 volym av PCR-produkt (23 µl PCR-produkt och 115 µl PB-buffer, i eppendorf-rör) och vortexades. Blandningen flyttades sedan över till en QIAquick kolumn och centrifugerades i en minut (13 000 rpm, Heraeus Biofuge Pico, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Den överflödiga vätskan kastades. 750 µl PE-buffer tillsattes till kolumnen och provet centrifugerades i en minut (13 000 rpm). Den överflödiga vätskan kastades innan provet återigen centrifugerades i en minut (13 000 rpm). Kolumnen flyttades sedan över till ett rent eppendorf-rör, och 50 µl EB-buffer tillsattes. Provet centrifugerades sedan i en minut (13 000 rpm) och den reade PCR-produkten frystes ner i -20°C.

2.10 Förberedelse inför sekvensering

5 µl av 5 µM NL4-primer tillsattes i eppendorf-rör och därefter tillsattes 5 µl av den reade PCR-produkten. Dessa skickades sedan iväg till Macrogen (Amsterdam, Holland) för sekvensering.

2.11 Artbestämning av jäst

De olika jästsekvenserna jämfördes med sekvenser i NCBI's (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) databas med hjälp av programmet BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990).

2.12 Statistisk analys

Det statistiska analyspaketet SAS (SAS 9.3, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) användes och samtliga uppgifter från enkäten som beskrev skörden och hanteringen av grönmassan testades för korrelation (Pearson korrelationskoefficient) med den totala mängden jäst (log cfu jäst/g), och med antalet jästarter funna i provet från grönmassan på respektive gård. Variabler som kunde förväntas påverka mängden jäst i grönmassan och som uppvisade en antydning till korrelation ($p < 0,15$) studerades vidare i variansanalys med SAS och proceduren General Linear Models.

3. Resultat

3.1 Antalet mikroorganismer i ursprungslösningen (jäst och bakterier) och andelen jäst

Redovisningen av antalet jästsvampar baseras på antalet mikroorganismer som räknades dag tre på plattorna. Plattorna räknades även dag fem och då korrigerades det för eventuella mögelsvampar som felräknats som jäst dag tre eller missad jäst/bakterier. Dock var tillväxten på plattorna så kraftig att många plattor var övervuxna dag fem, vilket gjorde dessa mycket svårräknade. Därför användes dessa värden endast för att korrigera räkningen av det som ansågs vara jäst dag tre. Antalet jäst och bakterier varierade mellan log 5,15 till log 7,23 cfu/g. Efter renstrykningen av 10-19 kolonier per gård på MEA-plattor och efterföljande inkubering i YPD-medium visade det sig vid okulärbesiktning i mikroskop att ett varierande antal av det som antagits vara jäst istället var bakterier. Andelen som konstaterades vara jäst efter YPD-inkubering i förhållande till totalantalet YPD-inkuberingar användes för att uppskatta den verkliga jästförekomsten i grönmassan på respektive gård (tabell 2). Därefter multiplicerades procentsatsen jäst med antalet räknade mikroorganismer på plattan för att få fram ett ungefärligt värde på jästantalet. Det var en stor variation mellan gårdarna när det gäller antalet jäst, från 0 eller lägsta detektionsgränsen till log 7,08 cfu/g. På fyra gårdar visade det sig att inget av de prov som renstruktits och inkuberats i YPD-medium var jäst.

Tabell 2. Antalet jäst och bakterier (log cfu/g) i grönmassa beräknad efter odling på agarplattor, andelen kolonier konstaterad som jäst efter om ympning av slumpmässigt urval, samt resulterande totalantal cfu jäst per g grönmassa

Gård	Jäst och bakterier, log cfu/g	Andelen jäst	Jäst, log cfu/g
1	5,15	0,25	4,54
2	5,54	0,13	4,66
3	6,41	0,31	5,91
4	6,95	0,05	5,65
5	7,20	0 (<0,06) ¹⁾	0 (5,64) ²⁾
6	5,59	0,84	5,52
7	5,30	0,23	4,66
8	6,76	0 (<0,06) ¹⁾	0 (5,23) ²⁾
9	5,52	0 (<0,10) ¹⁾	0 (4,22) ²⁾
10	7,23	0,29	6,69
11	6,45	0 (<0,10) ¹⁾	0 (5,15) ²⁾
12	6,40	0,89	6,35
13	7,11	0,92	7,08
14	7,08	0,2	6,38
15	6,51	0,75	6,38

¹⁾ Halva detektionsgränsen

²⁾ Halva detektionsgränsen av andelen jäst multiplicerat med antalet jäst och bakterier

3.2 Resultat från BLAST-sökning för jästsekvenser

Totalt var det 75 isolat från 11 olika gårdar som kunde jämföras med sekvenser i NCBI's databas med hjälp av BLAST[®] (tabell 3). Totalt hittades 18 jästarter. De vanligaste isolaten

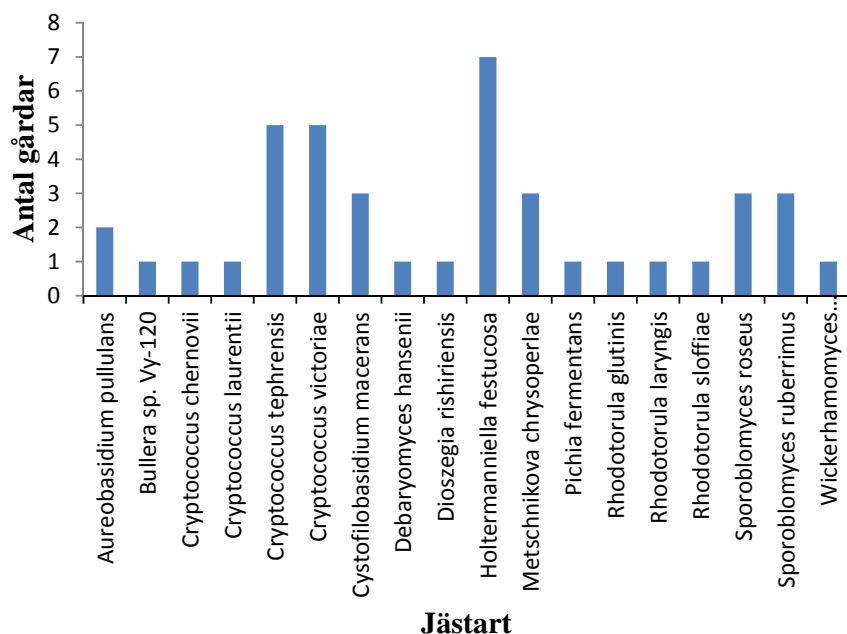
var *Holtermanniella festucosa* (17 isolat) (anamorf *Cryptococcus festucosus*, Wladyslav *et al.*, 2004), *Cryptococcus tephrensis* (13 isolat), *Cystofilobasidium macerans* (anamorf *Cryptococcus macerans*, Libkind *et al.*, 2009) (10 isolat) och *Cryptococcus victoriae* (10 isolat).

Tabell 3. Resultat från sökning i BLAST® för jästsekvenser. De resultat som har en identitetsmatchning på < 98 % kan betraktas som osäkra och är markerade med parentes

Gård	BLAST-resultat	Antal	Identitetsmatchning (%)
(1	<i>Holtermanniella festucosa</i>	3	97,8)
1	<i>Cryptococcus victoriae</i>	1	100
(2	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	1	96)
(2	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	1	96,7)
(3	<i>Holtermanniella festucosa</i>	5	97,5-97,8)
3	<i>Cryptococcus victoriae</i>	2	99,6-100
(3	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	1	97,8)
4	<i>Rhodotorula laryngis</i>	1	98,6
6	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	6	99,5-99,8
6	<i>Holtermanniella festucosa</i>	5	97,7-99
6	<i>Cryptococcus victoriae</i>	4	99,6-100
(6	<i>Bullera sp. VY-120</i>	1	95,7)
7	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	2	99,3-99,4
7	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	1	99,4
7	<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	98,5
(7	<i>Holtermanniella festucosa</i>	1	97,8)
10	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1	100
12	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	8	99,6-100
12	<i>Holtermanniella festucosa</i>	1	99
12	<i>Cryptococcus victoriae</i>	2	99,6-100
12	<i>Sporobolomyces roseus</i>	2	99,4-99,8
12	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	1	99,8
12	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	1	100
12	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	100
12	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	1	98,5
13	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	3	99,6-99,8
13	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	2	99,8-100
13	<i>Cryptococcus victoriae</i>	1	99,6
13	<i>Cryptococcus chernovii</i>	1	99,8
13	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	99,8
(13	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	95,6)
13	<i>Holtermanniella festucosa</i>	1	99
13	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	98,4
13	<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	99,4
14	<i>Pichia fermentans</i>	1	99,8
15	<i>Dioszegia rishiriensis</i>	1	100
15	<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	96,6-98,3
15	<i>Holtermanniella festucosa</i>	1	99,4
15	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	2	100
15	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	1	99,8
15	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	1	99,6

3.3 Förekomsten av olika jästarter på gårdarna

Figur 2 visar de 18 jästarter som isolerats med en identitetsmatchning överstigande 98 % och det antal gårdar som de påträffats på. *Holtermanniella festucosa*, *Cryptococcus tephrensensis* och *Cryptococcus victoriorae* var de som förekom på flest gårdar i studien. Några arter av *Sporobolomyces* hittades på flera gårdar, liksom *Aureobasidium pullulans*, *Cystofilobasidium macerans* samt *Metschnikova chrysoerlae*. Arter av släktet *Rhodotorula* hittades också på flera olika gårdar. *Bullera*, *Cryptococcus chernovii*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Dioszegia rishiriensis*, *Pichia fermentans* och *Wickerhamomyces anomalus* hittades på enstaka gårdar.



Figur 2. Antalet gårdar där olika jästarter i grönmassan påträffats. Jästarterna identifierades genom mikrobiologisk odling och de framtagna DNA-sekvenserna jämfördes med identifierade jästsekvenser i NCBI's databas BLAST®. De jästarter som hade en identitetsmatchning på 98%≤ redovisas här.

3.4 Sammanställning av enkätsvar

Provtagning på de olika gårdarna skedde antingen under förstaskörd (gård 1- 9) eller under andraskörd (gård 10-15). Åldern på vallarna varierade mellan 1 till 8 år (på en gård togs prov från helsädesgröda till ensilage). De flesta vallar var gödslade antingen med flytgödsel (10-25 ton/ha) eller kvävegödning (40-300 kg N/ha), i vissa fall användes både flytgödsel och kvävegödning. Samtliga vallar gödslades tidigt på våren, och några hade även fått ytterligare en giva av antingen flytgödsel eller kvävegödning efter förstaskörden. Den botaniska sammansättningen i vallarna varierade kraftigt, så också ogräsförekomsten. Timotej, vit- och rödklöver, rajgräs, rörsvingel och ängssvingel var de vanligast förekommande arterna, även om mer ovanliga arter som lucern, kummin och käringtand förekom på två gårdar. Förekomsten av ogräs var oftast högre på de äldre vallarna och arter som förekom var bland annat maskros och skräppa. På en av vallarna hade isbrännor förekommit. Hösten innan skörd hade de flesta vallar används till bete eller slåtter, men någon var insådd med vete och en var vårplöjd efter åkerböna. Den vanligaste typen av maskin som användes vid slåtter var

slätterkross med krimprar, men en gård använde sig av slagkross. Arbetsbredden på slätterkrossarna varierade mellan 2,8-9 meter. Det vanligaste var att stränglägga vid skörd även om fyra gårdar använde sig av bredspridning. Vädret vid slätter var soligt till halvklart på alla gårdar. Den avsedda stubbhöjden varierade mellan 5-10 cm. Arbetsbredden på strängläggaren varierade mellan 1-3,5 meter. Grödan hackades alltid i fält med exakthack innan hemkörning, utom på den gården där helsädesensilaget bärgades i rundbalar (fixkammarpres). Avsedd snittlängd på grönmassan varierade mellan 1-5 centimeter. Förtorkningstiden var för de gårdar som haft sol under förtorkningen ca 24 timmar (en gård hade 2 timmar förtorkningstid). De som fått regn på grönmassan (3 gårdar) hade längre tid, mellan 2-4 dagar. Den gård som hade den längsta förtorkningstiden hade använt strängluftare för att torka strängarna. Väder vid bärgning och packning var soligt till halvklart på de flesta gårdar, men tre drabbades av regn under denna period. Sju av gårdarna hade haft problem med varmgång tidigare år. Orsakerna till detta varierade mellan gårdar. En gård hade provat att använda syrabaserat tillsatsmedel, en annan hade haft för hög ts (>50 %) på grönmassan som kördes in. Tre gårdar hade fått varmgång i majsensilage. En gård trodde sig ha haft för låg uttagshastighet ur silon. En gård visste inte riktigt varför de fått varmgång. På gård nummer 13 fattades uppgifter kring vallens botaniska sammansättning, gödslingsgiva, vallålder, ogräsförekomst samt vad denna användes till hösten innan skörd. Detta beror på att det var osäkert från vilken åker provet kom. I tabell 4 redovisas antalet jäst (log cfu/g) tillsammans med ett urval av ytterligare variabler som registrerats.

Tabell 4. Gårdarna i studien sorterade efter antalet jäst (log cfu/g) i grönmassan, samt ett urval av de variabler som registrerades på varje gård

Gård	Skörde- nummer	Antalet jäst log cfu/g	Vall- ålder år	Väder vid förtorkning	Förtorkningstid timmar	Strängl./ Bredspr.
13	2	7,08	i.u	Soligt till halvklart	24	Strängläggning
10	2	6,69	2	Soligt till halvklart	24	Strängläggning
14	2	6,38	4≤	Soligt till halvklart	24	Bredspridning
15	2	6,38	4≤	Soligt till halvklart	24	Strängläggning
12	2	6,35	4≤	Soligt till halvklart	24	Bredspridning
3	1	5,91	4	Soligt	24	Strängläggning
4	1	5,65	1	Regn, molnigt	48	Strängläggning
6	1	5,52	1	Soligt	24	Strängläggning
2	1	4,66	2	Regn, soligt	24	Strängläggning
7	1	4,66	5≤	Soligt	24	Strängläggning
1	1	4,54	3	Soligt	24	Strängläggning
5	1	<0,06 ¹⁾	4	Soligt, regn	96	Strängläggning
8	1	<0,06 ¹⁾	3	Soligt	2	Bredspridning
9	2	<0,10 ¹⁾	Helsäd	Regn, molnigt	48	Strängläggning
11	2	<0,10 ¹⁾	1	Soligt	24	Bredspridning

¹⁾ Halva detektionsgränsen

Information samlades också om ensileringens utförande. De flesta gårdar använde plansilo som förvaringsutrymme (9 gårdar), 5 använde slangsilos och 1 använde rundbalar. Storleken på plansilorna varierade mellan 97-1620 m³. För slangsilorna varierade denna mellan 162-390 m³. Maskinvikten på packaren varierade mellan 4,5–17 ton. Vissa gårdar använde sig av två maskiner för packning, vilket gav en totalvikt på max 32 ton. Mängden inkörd grönmassa varierade mellan 10-20 ton ts/timme och mellan 50-280 m³/timme. Täckningstiderna för plansilor var mellan 0-4 timmar. Slangsilos tillslöt antingen direkt med ett litet luftningshåll

som stängdes efter 1-2 dagar, eller fick ligga öppna i två dagar innan de stängdes. Samtliga gårdar täckte silorna med vit plast, tre gårdar använde också folie. 1-3 lager plast användes. Gården som använde rundbalar använde 6 lager plast. Lagertjockleken på plasten i plansilorna var 0,2-0,7 mm, medan slangsiloplasten var 1- 2 mm. Plasten täcktes med spån, nät med och utan vikter, hjulsidor, sand och bildäck. Uttagare som användes var snöskopa, grepskopa, skopa, blockuttagare och fräs. Silon skulle komma att öppnas från inom tre veckor efter skörd till efter nyår (alltså 2014). Lantbrukarna intervjuades efter att silona öppnades huruvida varmgång förekommit. Två av dessa gårdar (12 och 7) uppgav detta som ett problem. Den troliga orsaken, enligt lantbrukaren själv, var att gård 7 haft för låg uttagshastighet medan gård 12 haft problem med fåglar som gjort hål i plasten.

3.5 Statistisk analys av samband

En statistisk analys genomfördes dels med värdet 0 för gårdar där ingen jäst hittades och dels med tillämpning av halva detektionsgränsen enligt tabell 2. Antalet jästarter på gården var starkt positivt korrelerat till totalmängden jäst (log cfu/g). Likaså fanns en stark positiv korrelation mellan totalmängden jäst och skördenummer, dvs. högre jästantal vid andraskörd jämfört med förstaskörd. Gårdarnas placering i landet (longitud respektive latitud) uppvisade ingen linjär korrelation med mängden jäst eller antalet jästarter. I tabell 5 redovisas de korrelationer som uppvisade en viss tendens att avvika från 0 ($p < 0,12$). Vädret noterades som mm regn under förtorkningen. Historiken, dvs. om varmgång var ett vanligt problem på gården tidigare år, var en av de variabler som inte tycktes vara korrelerad med antalet jästsvampar i grönmassan detta år ($p > 0,45$). Inte heller variabeln ”varmgång under innevarande år”, dvs. om lantbrukaren uppgivit att ensilaget tagit värme under tömningen innevarande år (alltså av det ensilage som blev resultatet av den grönmassa som analyserades i denna studie) visade någon statistiskt säkerställd korrelation med mängden jäst eller antalet jästarter i grönmassan.

Variabeln ”regn vid förtorkningen” studerades i en variansanalys (Proc GLM) tillsammans med ytterligare att antal variabler som kunde förväntas påverka mängden jäst i grönmassan och som visat antydning till statistiskt säkerställd linjär korrelation med mängden jäst eller antalet jästarter. Dessa var ”nord” (breddgrad), ”skörd” (första eller andra skörd), ”bredspridning” (bredspridning eller strängläggning av grönmassan), ”gödsling” (stallgödsel eller inte), ”vallålder” (hur länge vallen legat), ”stubbhöjd” (cm), ”strängbredd” (m), ”förtorkningslängd” (dagar) och ”väder under förtorkning” (mm regn) där ”skörd” och ”bredspridning” var klassvariabler medan övriga var kontinuerliga variabler. Modellen där värdet ”0” användes för gårdar där ingen jäst detekterades var i sin helhet inte signifikant ($p < 0,22$) men sedan de variabler som uppvisade högst p-värden tagits ur modellen och endast ”skörd”, ”bredspridning”, ”vallålder” och ”väder under förtorkningen” återstod uppvisade modellen statistiskt säkerställda skillnader ($p < 0,03$) (tabell 6). Den enda faktor som påverkat mängden jäst i grönmassan var ”bredspridning” (tabell 6). Grönmassa som förtorkats genom bredspridning innehöll log 1,89 cfu jäst per g grönmassa, medan grönmassa som förtorkats i sträng innehöll log 5,49 cfu jäst per g grönmassa. Ungefär samma skillnad sågs mellan förstaskörden och andraskörden där andraskörden hade högre antal jäst. Även vallens ålder uppvisade en tendens till att påverka jästförekomsten där grönmassan innehöll högre jästantal ju fler år vallen legat (en ökning med cirka log 0,5 cfu jäst/g per vallår). Vädret vid förtorkning påverkade, då mer regn gav färre antal jästsvampar. Motsvarande analys genomfördes där värdet ”halva detektionsgränsen” användes för gårdar där ingen jäst detekterades (tabell 7). Här kom faktorerna skörd, stubbhöjd och vallålder att kvarstå med en tendens till samband. Påverkan av skördenummer på antalet jästsvampar föll ut med stark

statistiskt säkerställd skillnad med log 4,92 cfu/g i första skörd jämfört med log 6,24 i 2:a skörd. Effekten av bredspridning befanns emellertid inte vara statistiskt säkerställd medan det fanns en tendens till högre antal jäst vid högre stubbhöjd. Även i denna analys fanns en viss tendens ($p < 0,12$) till högre jästantal vid högre vallålder.

Förutom mängden jäst (log cfu/g) testades också antalet jästarter som kunde isoleras på respektive gård mot förhållanden vid skörd (samma variabler som beskrivits ovan) i samma statistiska modell (GLM) men ingen faktor var i närheten av att ha statistiskt säkerställd effekt. Inte heller kunde några statistiskt säkerställda samband påvisas då en jästart i taget (av de tre mest frekventa arterna *Holtermanniella festucosa*, *Cryptococcus tephrensensis* och *Cryptococcus victoriae*) analyserades för samband med skördevariabler.

Tabell 5. Korrelationer (Pearson korrelationskoefficienter) mellan mängden jäst (log cfu/g), antalet jästarter och managementfaktorer med viss tendens till sannolikhet (minst $p < 0,12$)

	Ingen jäst funnen = 0		Ingen jäst funnen = halva detektionsgränsen	
	Jäst, log cfu/g	Antal jästarter	Jäst, log cfu/g	Antal jästarter
Antal jästarter	0,65 ($p < 0,01$)		0,52 ($p < 0,05$)	
Skörd	0,37 ($p < 0,17$)	0,41 ($p < 0,13$)	0,72 ($p < 0,003$)	0,41 ($p < 0,13$)
Vallålder	n.s.	0,44 ($p < 0,12$)	n.s.	0,44 ($p < 0,11$)
Stubbhöjd	n.s.	n.s.	0,48 ($p < 0,07$)	n.s.
Regn vid förtorkn.	-0,49 ($p < 0,07$)	n.s.	n.s.	n.s.

Tabell 6. Skördefaktorer som påverkade eller tenderade att påverka antalet jästsvampar (log CFU/g) i grönmassa. Beräknat med värdet "0" i de prov där ingen jäst detekterades

	Signifikansnivå	Jäst, LSM log cfu/g			
		1:a skörd	2:a skörd	Bredspridn.	Stränglagt
Modellen som helhet	$P < 0,03$				
Skörd	$P < 0,06$	2,26	5,12		
Bredspridning	$P < 0,03$			1,89	5,49
Vallålder	$P < 0,07$	2,038 + 0,495 x Vallår			
Regn vid förtorkning	$P < 0,05$	2,038 - 0,159 x mm regn			

Tabell 7. Skördefaktorer som påverkade eller tenderade att påverka antalet jäst (cfu/g) i grönmassa. Beräknat med ett värde motsvarande halva lägsta detektionsgränsen i de prov där ingen jäst detekterades

	Signifikansnivå	Jäst, LSM log cfu/g			
		1:a skörd	2:a skörd	Stubbhöjd ≤ 6 cm	Stubbhöjd ≥ 7 cm
Modellen som helhet	$P < 0,02$				
Enskild faktor					
Skörd	$P < 0,01$	4,92	6,24		
Stubbhöjd	$P < 0,1$			5,3	5,9
Vallålder	$P < 0,12$	6,54 + 0,11 x Vallår			

4. Diskussion

4.1 Jästarter samt totalantalet jäst

De vanligast förekommande jästarterna i färsk grönmassa i detta projekt var alla av släktet *Cryptococcus* (*Holtermanniella festucosa* anamorf *Cryptococcus festucosus*) men även arter av *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Debaryomyces* och *Aureobasidium* isolerades. Enstaka isolat av andra släkten förekom också. Dessa har tidigare hittats på färsk grönmassa både från majs och olika vallblandningar (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988). Släkterna som hittades i denna studie anses generellt inte vara bidragande till varmgångsprocessen vid öppning av silor eftersom de varken är fermenterande eller kan tillgodogöra sig laktat (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988).

I tidigare studier har laktatassimilerande, fermenterande arter av släkterna *Candida* och *Hansenula* hittats. De har påvisats kunna initiera varmgång vid siloöppning samt vara närvarande under fermenteringsprocessen både under aeroba och anaeroba förhållanden. (Jonsson och Pahlow, 1984; Middelhoven och van Baalen, 1988; Jonsson *et al.*, 1990). Jonsson och Pahlow (1984) fann att jästarter från släkterna *Saccharomyces*, *Candida* och *Hansenula* var vanligast under anaeroba förhållanden där *Saccharomyces* var det dominerande släktet. Under aeroba förhållanden hittades i samma studie endast arter av *Candida*-släktet, men även en art av *Wickerhamomyces anomalus* som ansågs kunna fermentera glukos under anaeroba förhållanden samt assimilera laktat under aeroba förhållanden (Jonsson och Pahlow, 1984).

I föreliggande studie hittades inga arter från varken *Candida*- eller *Hansenula*-släktet, troligtvis eftersom studien gjordes på färsk grönmassa och inte på ensilage. Dock hittades ett isolat av *Wickerhamomyces anomalus* (på gård 10). Denna art skulle kunna bidra till varmgångsprocessen eftersom den kan assimilera laktat när syre finns tillgängligt. Gården uppgav dock att de inte haft problem med varmgång i silon detta år. De vanligast förekommande jästarterna tillhörde släktet *Cryptococcus* och förekom på flest antal gårdar, tillsammans med arter av *Sporobolomyces* och *Rhodotorula*, *Aureobasidium pullulans*, *Cystofilobasidium macerans* samt *Metschnikova chrysoperlae*, som också förekom på flera olika gårdar. Detta tyder på att den geografiska placeringen av gårdarna inte spelar någon roll för vilka jästarter som är vanligast förekommande, samt att det finns en diversitet bland jästarter som förekommer i grönmassa eftersom det i studien isolerades 18 olika jästarter från tio olika gårdar. Exempelvis hittades *Holtermanniella festucosa* och *Cryptococcus victoriae* på gårdar i norra, mellersta och södra Sverige. Uppföljningen på gårdarna visade att endast två gårdar haft problem med varmgång, men att det troligtvis var andra orsaker än mängden jäst samt vilka jästarter som förekom som låg bakom t.ex. för låg uttagshastighet och skador på plasten. Detta gör det svårt att dra några slutsatser om jästarternas inverkan på varmgången på dessa gårdar.

4.2 Managementfaktorer och totalantalet jäst

Studien bestod av ett begränsat antal gårdar och resultaten bör tolkas med försiktighet. Både när gårdar utan detekterad jäst analyserades som "0" och som "halva detektionsgränsen" fanns emellertid indikationer på att grönmassa från andraskörden innehöll mer jäst än grönmassa från förstaskörden. Även vallens ålder fanns med som en variabel med tendens till högre mängd jäst vid högre vallålder i båda analyserna. Detta tyder på viss stabilitet i

materialet som kan tolkas som att dessa två variabler sannolikt har en påverkan på antalet jäst. Effekter av bredspridning, stubbhöjd och regn vid förtorkningen gav emellertid motstridiga resultat och bör därför tolkas med större försiktighet.

Grönmassa som förtorkades med bredspridning innehöll färre jästsvampar per g (log 1,89 cfu) jämfört med grönmassa som förtorkats i sträng (log 5,49 cfu/g) ($p < 0,03$). Det låga värdet för bredspridning påverkades i stor utsträckning av att ingen jäst detekterades på två av dessa gårdar och gav stort utslag när värdet "0" användes i analysen. Eftersom det i denna studie finns indikationer på att mängden jäst ökar med vallålder kan det tänkas att det är en kombination av bredspridning och vallålder som gör att förekomsten av jäst var så låg (tabell 4). Att bredspridning påverkar jästen skulle kunna bero på att grönmassan i högre grad är exponerad för solljus än när massan lagts i sträng, vilket kan påverka jästens överlevnadsmöjligheter. I strängen exponeras det översta skiktet, vilket kan göra att grönmassan i de undre skikten är mer "skyddad". Det är rimligt att tro att ts-halten skulle kunna vara högre vid bredspridning just för att en större andel grönmassa exponeras, vilket skulle kunna göra att jästens tillväxthastighet minskar då tillgången på vatten minskar. Tyvärr mättes inte ts-halten i detta försök, vilket hade kunnat ge en bättre uppfattning om detta. Bredspridning har tidigare visat sig haft en liknande effekt på mögelförekomst i rundbalsensilage (Schenck *et al.*, 2014).

Som tidigare nämnts så innehöll andraskörden ett högre antal jäst ($p < 0,06$) än förstaskörden. Mängden jäst som förekommer på grönmassan påverkas av flera olika faktorer. Lin *et al.* (1992) fann att den epifytiska mikrofloran på lucern ökade med ökad temperatur under växtsäsongen. Det kan vara så att klimatet varit mer gynnsamt för jästen inför andraskörden, med t ex högre temperatur. Det är också så att grödan är äldre vid andraskörden, och detta har i tidigare studier visat sig öka antalet jästsvampar (Fehrman och Müller, 1990; Müller, 2009). Det kan också tänkas att mängden jäst på grönmassan skiljer sig mellan gårdar eftersom detta kan påverkas av ett flertal faktorer som temperatur, tillgängligheten på vatten i grönmassan, vallålder etc. (Pahlow *et al.* 2003; Muck *et al.* 2003). I detta försök uppmättes inte ts-halt men det är rimligt att tro att denna varierade mellan de olika gårdarna, så också fuktigheten i gräset och då också tillgängligheten på vatten för jästen. Tillväxten av jäst går långsammare om tillgängligheten är låg (Muck *et al.* 2003). Proven från förstaskörden respektive andraskörden togs inte från samma gårdar vilket kan ge en missvisande bild av resultatet. Av logistiska skäl var många prover från andra skörden tagna i Småland och en misstanke att den erhållna effekten med högre jästantal i andraskörden kunde vara bunden till lokaliseringen kan finnas. Ingen statistiskt säkerställd skillnad fanns dock av samspel mellan skördenummer och gårdens placering i form av breddgrad. I denna studie finns indikationer på att mängden jäst ökar med ökad vallålder så det skulle kunna vara en kombination av dessa egenskaper (äldre vall tillsammans med andraskörd) som gör att det var ett högre jästantal i andraskörden jämfört med förstaskörden. Med ökad vallålder uppvisades en tendens till att grönmassan innehöll mer jäst ju längre vallen legat (en ökning med cirka log 0,5 cfu per vallår). Müller (2009) visade att antalet jäst var högre i en extensivt skött vall jämfört med en intensivt skött vall. Det skulle kunna vara så att växterna i den extensivt skötta vallen innehåller en högre andel av dött material som jästen kan livnära sig på. Det kan också ha ett samband med att de flesta av de äldre vallarna provtogs under andraskörden. I denna studie ingick endast ett litet antal gårdar så därför bör resultaten från den tolkas med försiktighet, både när det gäller den ökade mängden jäst med ökande skördenummer, såväl som ökad mängd jäst med ökande vallålder.

Vädret vid förtorkning verkade också ha en effekt i den föreliggande studien, där mer regn (i mm) gav ett lägre jästantal per g grönmassa. På gården som fick mest regn kunde ingen jäst

identifieras. Enligt Muck *et al.* (2003) är studierna på hur väder vid förtorkning påverkar jästantalet väldigt begränsade. Fuktigheten i gräset påverkar dock tillväxten av jäst genom att den påverkar tillgängligheten på vatten. En låg tillgänglighet på vatten inhiberar inte tillväxten av jäst, men gör att den går långsammare (Muck *et al.* 2003). Vädret vid tidpunkten för slåtter på den gård som fick mest regn i den föreliggande studien var soligt och varmt. Det är därför rimligt att tro att ts-halten i grönmassan var relativt hög. Tyvärr drabbades lantbrukaren av regn under förtorkningsperioden. Grönmassan lades i sträng på denna gård så en del av grönmassan var relativt skyddad från regnet, vilket kan ha gjort att mängden jäst ändå hållits på en låg nivå genom att ts-halten inte förändrades så mycket. Enligt McEniry *et al.* (2007) ökade antalet jäst med ökad förtorkningstid. Resultaten i föreliggande studie tyder på att också vädret under förtorkningen påverkar mängden jäst i grönmassan, inte enbart förtorkningstiden.

4.3 Felkällor

Vilka arter som isolerades från de olika gårdarna beror delvis på metoden som valdes för jästidentifiering. Denna görs under aeroba förhållanden vilket favoriserar jästarter som lever under dessa förhållanden. Jästkolonierna har valts ut genom en okulär besiktning, så därför kan andra jästarter ha funnits på plattorna, som inte tagits med i studien och på så sätt påverkat resultatet. På de gårdar där ingen jäst hittades kan det ha funnits jäst på plattorna som helt enkelt inte kom med i provtagningen. Eftersom vissa av plattorna var övervuxna kunde inte kolonier väljas från dessa. Att de var övervuxna berodde troligtvis på att temperaturen i kylskåpet inte var tillräckligt låg för att inhibera tillväxten av mikroorganismerna som växte på plattorna. Antibiotikan som tillsatts kanske inte var den bästa att inhibera bakterietillväxt. Det inträffade också en gång att temperaturen i värmeskåpet där plattorna inkuberades var några grader för hög, troligtvis för att temperaturen i rummet där det förvarades var högre än normalt. Tiden som förflöt mellan provtagning och odlingsstart kan givetvis också haft en effekt. Vissa prov sattes direkt, medan andra förvarades kallt (8° Celsius) upp till 1,5 dygn innan de odlades. Författarens ovana med att arbeta med denna typ av analyser har givetvis en stor påverkan på resultatet, både när det gäller räkning av antalet jäst och tillvägagångssätt. Studien innehöll endast ett fåtal gårdar (15 st) vilket gjorde det svårt att hitta några statistiskt säkerställda resultat. Generellt hade de gårdar som proven kom från haft väldigt lite problem med just varmgång. Det var troligtvis delvis pga detta som så många av dem inte använde sig av något tillsatsmedel alls (13 st). Lantbrukarna verkade väldigt kunniga och insatta i ensilageproduktion. Det hade varit intressant att göra en uppföljning av studien genom att också ensilera proverna i laboratoriesilos för att se hur mängden samt artsammansättningen av jäst ändras över tid, samt att mäta den aeroba lagringsstabiliteten efter siloöppning.

4.4 Slutsats

Slutsatsen från resultaten i denna studie var att fältfloran inte skiljde sig mycket mellan gårdar. De vanligast förekommande arterna var alla av släktet *Cryptococcus* (*Holtermanniella festucosa* anamorf *Cryptococcus festucosus*) vilka inte anses kunna bidra i någon stor utsträckning till varmgångsproblematiken. En tendens till mer jäst i grönmassan i andraskörd jämfört med förstaskörd, samt mer jäst i grönmassan ju äldre vallen var, kunde ses. För att få ökad kunskap om vilka jästarter som initierar varmgång vid uttag av ensilage ur silo rekommenderas vidare forskning där även de jästarter som överlever ensileringen analyseras.

5. Tack

Jag vill rikta ett varmt tack till mina handledare Rolf Spörndly och Johanna Blomqvist för ert stöd och er hjälp och för att ni delat med er av expertkunskaper inom era respektive områden. Tack också till Rainer Nylund för all hjälp med sättning av prover och för instruering på Kungsängens laboratorium. Jag vill också tacka Cecilia Müller som varit min examinator. Till sist vill jag tacka alla er trevliga och kunniga lantbrukare som jag haft nöjet och träffa. Utan er hade detta arbete inte blivit till, och jag hoppas att vi ses igen.

6. Referenser

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool (en). *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Borreani, G., Tabacco, E. 2010. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. *Journal of Dairy Science* 93, 2620-2629.
- Cherney, J.H och Cherney, D.J.R. 2003. Assessing silage quality. In: *Silage Science and Technology* 42. (Eds. D.R. Buxton, R.E. Muck, J.H. Harrison), 141-198. American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Fehrman, E och Müller, T.H. 1990. Seasonal changes of micro-organisms on a grassland plot. (In German, English summary). *Das wirtschaftseigene Futter* 36, 66-78.
- Holmes, B.J. och Muck, R.E. 2007. Packing bunkers and piles to maximise forage preservation. *Proceedings of the 6th International Dairy Housing Conference, Minneapolis*, 16-18 June.
- Koc, F., Coskuntuna, L., Ozduven, M.L., Coskuntuna, A. och Samli, H.E. 2009. The effects of temperature on the silage microbiology and aerobic stability of corn and vetch-grain silages. *Acta Agriculturae Scandinavica* 59, 239-246.
- Jonsson, A och Pahlow, G. 1984. Systemic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Animal Research and Development* 20, 7-22.
- Jonsson, A., Lindberg, H., Sundås, S., Lingvall, P., Lindgren, S. 1990. Effect of additives on the quality of big-bale silage. *Animal Feed Science and Technology* 31, 139-155.
- Liberal, A.T.D., da Silva, E.A., de Moraes, J.O.F., Simoes, D.A., de Moraes, M.A. 2005. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Letters in applied microbiology* 40, 19-23.
- Libkind, D., Gadanho, M., van Broock, M., Sampaio, J.P. 2009. *Cystofilobasidium lacus-mascardii* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes, and *Cystofilobasidium macerans* sp. nov., the sexual stage of *Cryptococcus macerans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 622–630.
- Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Hart, R.A., Dickerson, J.T., Feyerherm, A.M., Aimutis, W.R. 1992. Epiphytic flora on alfalfa and whole-plant corn. *Journal of Dairy Science* 75, 2484-2493.
- Lindgren, S., Pettersson, K., Kaspersson, A., Jonsson, A., Lingvall, P. 1985. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 765-774.
- McEniry, J., O’Kiely, P.O., 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.
- Middelhoven, M.J., Franzen, M.M. 1986. The yeast flora of ensiled whole-crop maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37, 855-861.
- Middelhoven, M.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.

- Middelhoven, W.J., de Jong, I.M., de Winter, M. 1990. Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other ensiled vegetable crops. *Antonie van Leeuwenhoek* 57, 153-158.
- Muck, R.E., Holmes, B.J. 2000. Factors affecting bunker silo densities. *Applied Engineering in Agriculture* 16, 613-619.
- Muck, R.E., Moser, L.E., Pitt, R.E. 2003. Postharvest factors affecting ensiling. In: *Silage Science and Technology* 42. (Eds. D.R. Buxton, R.E. Muck, J.H. Harrison), 251-304. American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Müller, C.E. 2009. Influence of harvest date of primary growth on microbial flora of grass herbage and haylage, and on fermentation and aerobic stability of haylage conserved in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 64, 328-338.
- Niemelä, S. 1984. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations. Nordisk metodkommitté för livsmedel (NMKL), rapport 1. s 10. Livsmedelsverket, Uppsala.
- O'Kiely, P. 1993. Influence of a partially neutralised blend of aliphatic organic acids on fermentation, effluent production and aerobic stability of autumn grass silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 32, 13-26.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: *Silage Science and Technology* 42. (Eds. D.R. Buxton, R.E. Muck, J.H. Harrison), 31-93. American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Ranjit, N.K., Kung L. Jr. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* or chemical preservative on the fermentation and stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 83, 526-535.
- Schenck, J., Müller, C., Spörndly, R. 2014. Mögelsvamp i vallfoder inplastat i balar. In: *Proceedings of Forage Conference*. (Red Nilsson-Linde, N., Bernes, G., Liljeholm, M., Spörndly, R), 101-104. Sveriges Lantbruksuniversitet Uppsala, 5-6 februari, 2014, Sverige.
- Wladyslav, I., Golubev, J. P., Sampaio, L.A., Golubev, N.W. 2004. *Cryptococcus festucosus* sp. nov. a new hymenomycetous yeast in the *Holtermannia* clade. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 1001-1006.
- Yimin, C., Benno, Y., Ogawa, M., Kumai, S. 1999. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science* 82, 520-526.

7. Bilaga

Kontaktinformation

Gård:	
Kontaktperson:	
Adress:	
Telefon:	
E-post:	

Vallinformation

Skördenummer:	1:a 2:a 3:e
Datum för slåtter: (ungefärlig tidpunkt)	
Datum när provet togs: (ungefärlig tidpunkt)	
Vallålder:	
Är vallen gödslad?	Ja Nej Om ja, med vad? Hur mycket? När gödslades den?
Här någon typ av bekämpning gjorts i vallen?	
Botanisk sammansättning i vallen? (olika gräsarter, baljväxtinslag)	
Ogräsförekomst? (omfattning, arter)	
Annan information om vallens utseende:	Sork/vildsvinsskador? Ojämn mark, ej utjämnade slutfåror? Gammal förna kvar? Luckor i vallen med barmark? ”Blöt mark”, risk för mycket jord i grödan?
Annan information forts:	Övrig information:

Hur användes vallen hösten innan skörd? (Bete, slåtter, nysådd ex.)	
Vilken typ av maskin användes vid slåtter? (slåtterbalk, slåtterkross med krimprar, slåtterkross med valsar, slåtterkross som lägger ihop flera strängar m.m.)	
Väder vid slåtter?	Regn Sol Molnigt
Arbetsbredd på slåtter-maskinen?	
När hackas grödan?	
Vilken typ av hack?	
Bredspridning eller Strängläggning strängläggning vid slåtter?	Bredspridning Strängläggning
Arbetsbredd på strängen?	
Vilken stubbhöjd avsågs?	
Vilken snittlängd avsågs?	
Hur länge förtorkades fodret? (från slåtter till att det bärgades)	
Väder vid förtorkning:	Regn Sol Molnigt
Behandlades grönmassan under tiden den låg på slag? (mekanisk behandling, ex. strängsyreare)	Ja Nej Om ja, hur, när, vilken maskintyp?
Hur lagras grödan?	Slang Plansilo
Storlek på slang/silo?	
Täckningstid: (hur lång tid från sista lasset packats klart till dess att täckning sker?)	
Väder vid bärgning/packning:	Regn Sol Molnigt

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15, 30, 45 eller 60 högskolepoäng) vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionens examensarbeten finns publicerade på SLUs hemsida www.slu.se.

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. The department's degree projects are published on the SLU website www.slu.se.

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Box 7024
750 07 Uppsala
Tel. 018/67 10 00
Hemsida: www.slu.se/husdjur-utfodring-varld

*Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal
Science
Department of Animal Nutrition and Management
PO Box 7024
SE-750 07 Uppsala
Phone +46 (0) 18 67 10 00
Homepage: www.slu.se/animal-nutrition-management*