

## Inverkan av foderstatens sammansättning på mag-tarmkanalens mikrobiota hos häst



**Frida Petters**

# Inverkan av foderstatens sammansättning på mag-tarmkanalens mikrobiota hos häst

## The effect of diet composition on gastro-intestinal microbiota in horses

### Frida Petters

<b>Handledare:</b>	Cecilia Müller, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård
<b>Examinator:</b>	Jan Erik Lindberg, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård
<b>Omfattning:</b>	15 hp
<b>Kurstitel:</b>	Kandidatarbete i husdjursvetenskap
<b>Kurskod:</b>	EX0553
<b>Program:</b>	Agronomprogrammet - Husdjur
<b>Nivå:</b>	Grund, G2E
<b>Utgivningsort:</b>	Uppsala
<b>Utgivningsår:</b>	2016
<b>Serienamn, delnr:</b>	Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 566
<b>Omslagsbild:</b>	Frida Petters
<b>Nyckelord:</b>	häst, mikrober, GI-system, foder, stärkelse, råprotein
<b>Keywords:</b>	horse, equine, microbes, digestive system, feed, starch, crude protein

## Abstract

The horse is adapted to consume fiber rich feed in small portions, often and evenly distributed over the day. Even so, 98 % of Swedish horse owners feed their horses with concentrates, which are often rich in starch and low in fiber. Feeding only roughage gives a more stable fecal microbiota compared to feeding a combination of roughage and concentrates. Abrupt feed changes between forages similar in nutritional composition but preserved with different methods (i.e. hay and silage produced from the same harvest) has small or no impact on microbial composition in the hindgut. Feeding concentrates rich in starch results in a higher amount of lactic acid bacteria in the different segments of the gastro-intestinal tract and *faeces*. Difference in amount of crude protein in forage seems to have limited effect on microbial composition in the hindgut.

## Sammanfattning

Hästen har utvecklats för att äta fiberrik föda ofta och i små portioner. Trots detta utfodrar 98 % av Sveriges hästhållare sina hästar med kraftfoder, som ofta är stärkelsesrika men fiberfattiga foder. Utfodring av endast grovfoder ger en stabilare mikrobiell sammansättning i *faeces* jämfört med om foderstaten består av både grovfoder och kraftfoder. Abrupta foderbyten mellan vallfoder som har samma näringsmässiga innehåll men konserverats på olika sätt (det vill säga hö eller inplastat vallfoder från samma vall) verkar ha liten eller ingen påverkan på hästens mikrobiota i grovtarmen. Utfodring av stärkelsesrika foder har visat sig påverka mikrobiotan framförallt på så sätt att andelen mjölksyraproducerande bakterier stiger i magtarmkanalens olika segment och *faeces*. Skillnad i råproteinhalt i grovfoder ger liten påverkan på grovtarmens mikrobiella sammansättning.

## Introduktion

Hästen är anpassad för att äta gräs och har ett stort grovtarmskomplex vars innehåll upptar två tredjedelar av hästens totala mag-tarminnehåll (Argenzio *et al.*, 1974). Hästen kan tillgodose upp till 75 % av sitt dagliga energibehov genom absorption av flyktiga fettsyror (volatile fatty acids, VFA) producerade i grovtarmen (Sjaastad *et al.*, 2010). VFA bildas av mikroorganismer som specialiserat sig på att bryta ned fiberrikt material, såsom gräs, vilket hästens egna enzymer inte kan ta hand om. När stärkelsesrikt foder når grovtarmen produceras mer VFA än vad fermentationen av fiberrikt foder skulle gjort och även mjölksyra bildas, vilket leder till att pH sjunker i grovtarmen (Sjaastad *et al.*, 2010). Om pH i grovtarmen blir för lågt störs det mikrobiella ekosystemet och hästen kan hamna i subklinisk eller fullt utvecklad metabolisk acidosis (Biddle *et al.*, 2013). Förändringar i mikrobiotan har också förknippats med sjukdomar såsom kolik, diarré (Larsen, 1994), fång (Milinovich *et al.*, 2006) och magsår (Nadeau *et al.*, 2003).

Trots detta utfodrade 98 % av 2215 tillfrågade hästhållare sina hästar med någon form av kraftfoder år 2010, antingen kommersiellt kraftfoder eller spannmål (Jordbruksverket, 2012). Både kommersiellt kraftfoder och spannmål är stärkelsesrikt och fiberfattigt och därmed inte särskilt likt hästens ursprungliga föda.

Problem med magtarmkanalen var år 2000 den fjärde vanligaste utslagningssorsaken hos häst i Sverige, där 70 % av problemen i magtarmkanalen definierades som diverse olika koliksymtom (Wallin *et al.*, 2000). Det väcker ett intresse för hur olika fodermedel och foderstatssammansättningar påverkar mikrobiotan i hästens mag-tarmkanal. Hypotesen för litteraturstudien var att en hög andel stärkelsesrikt foder och abrupta foderbyten orsakar störningar i magtarmkanalens mikrobiota.

## Litteratursammanställning

### Hästens digestion

Hästen var ursprungligen ett stäpplevande djur som rörde sig över stora ytor för att söka föda och har specialiserat sig på att bryta ner strukturella kolhydrater i grovtarmen. I sin naturliga miljö konsumerar hästen fiberrik föda ofta och jämt fördelat över dygnet (Salter & Hudson, 1979). För att bryta ner strukturella kolhydrater som återfinns i till exempel gräs, krävs hjälp från mikroorganismer för att tillgodogöra sig energin (Sjaastad *et al.*, 2010).

### **Förekommande mikroorganismer i hästens magtarmkanal**

Mikroorganismerna, eller mikroberna, i mag-tarmkanalen har olika funktioner. Det finns bland annat cellulolytiska bakterier, som är en typ av fibrolytiska bakterier, vars uppgift är att omvandla de strukturella kolhydraterna till VFA som tas upp genom tarmväggen och transporteras ut via blodet (Sjaastad *et al.*, 2010). *Ruminococcus flavefaciens* och *Fibrobacter succinogenes* är exempel på kända cellulolytiska bakterier i våmmen hos idisslare (Fondevila & Dehority, 1994). Cellulolytiska bakteriearter som hittats i hästens *caecum* är *R. flavefaciens*, *Ruminococcus albus* och *F. succinogenes* (Julliard *et al.*, 1999), där de två första tillhör fylumet *Firmicutes* och ordningen *Clostridia* och den sistnämnda fylumet *Fibrobacteres* och ordningen *Fibrobacterales* (Prescott, 2005). Amylolytiska bakterier är organismer som bryter ned stärkelse, till exempel olika arter av *Lactobacillus* spp. och *Streptococcus* spp. (Harlow *et al.*, 2015), som båda är medlemmar i ordningen *Lactobacillales* (lactic acid bacteria, LAB) och därmed producerar mjölksyra som fermentationsprodukt (Willey, 2012). Om det produceras för mycket mjölksyra i grovtarmen sjunker pH och pH-känsliga bakterier som exempelvis fibrolytiska bakterier dör, medan LAB som tål lågt pH kan växa till (Biddle *et al.*, 2013). Laktatutnyttjande bakterier använder mjölksyra som substrat, till exempel *Megasphaera elsdenii* har återfunnits i hästens *faeces* (Biddle *et al.*, 2013) och i våmmen hos får (Mackie & Heath, 1979). Även den laktatutnyttjande bakterien *Veillonella montpellierensis* har påvisats i *faeces* från häst (Biddle *et al.*, 2013). Ökning i förekomst av *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. och *Veillonella* spp. i *caecum* har förknippats med de tidiga skedena av akut fång (Moreau *et al.*, 2014). Det finns även protozoer, *archaea* och anaeroba svampar i grovtarmen men de utgör en mycket liten andel av mikroberna (Dougal *et al.*, 2012). Det kan dock vara svårt att veta exakt vilka mikroorganismer som finns i hästens magtarmkanal, då alla bakterier inte går att odla. Molekylärbiologiska analyser av bakteriefloran i hästens mag-tarmkanal har visat att det finns många mikroorganismer där som inte går att identifiera som någon art som tidigare kunnat kultiveras i laboratorium (Daly *et*

al., 2001).

### **Magsäcken**

Magsäcken hos en häst är mindre jämfört med andra enkelmagade djur som till exempel gris, vilket är en anpassning som gör att hästen har begränsad förmåga att lagra foder i magsäcken (Higgins & Snyder, 2006; Al Jassim & Andrews, 2009; Frape, 2010). Den består av en del med körtelfri slemhinna och en del med körtelförsedd slemhinna och kan delas in i tre segment. Där foderstrupen (*oesophagus*) mynnar återfinns det segment som kallas *fundus* (*saccus caecus*) och det är den största delen av den körtelfria regionen i magsäcken (Dyce, 2010). Avgränsningen mellan den körtelfria och den körtelförsedda delen av magsäcken kallas *margo plicatus*. Segmenten *corpus* och *pylorus* representerar den körtelförsedda delen av magsäcken (Dyce, 2010). pH skiljer sig markant i de olika delarna av magsäcken, vilket beror på en rad olika skeenden. Att pH är högst i den körtelfria delen av magsäcken beror dels på att saliven som följer med det tuggade fodret har en buffrande effekt, dels på att det inte sker någon saltsyrautsöndring i denna del av magsäcken (Frape, 2010). I *corpus* utsöndras saltsyra (HCl) vilket gör att pH i *corpus* är lägre än i den körtelfria delen och ligger runt pH 5,40 (Frape, 2010). *Pylorus* är det sista segmentet i magsäcken, där pepsinogen utsöndras och pH-värdet är cirka 2,60 hos en frisk häst med foder i magsäcken men kan hos en fastande häst sjunka till mellan 1,50 och 2,00 (Frape, 2010).

De flesta mikrober som återfunnits i magsäcken tillhör fylumet *Firmicutes* (Perkins *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2015). I *Firmicutes* återfinns både *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. vilka är de vanligaste släktena i magsäcken, där *Lactobacillus* spp. är den mest frekvent förekommande (de Fombelle *et al.*, 2003). Även bakterier från fylumen *Proteobacteria* och *Bacteroidetes* är vanligt förekommande i hästens magsäck (Perkins *et al.*, 2012). Det finns bakterier i hela magsäckens mukosa, men i den körtelförsedda sektionen finns det mer *Streptococcus* spp. än andra bakterier (Perkins *et al.*, 2012). Den högsta koncentrationen av laktatutnyttjande bakterier i hela mag-tarmkanalen återfinns i magsäcken (de Fombelle *et al.*, 2003).

### **Tunntarmen**

Hästen har en relativt kort tunntarm jämfört med andra enkelmagade djur (Frape, 2010). Tunntarmen brukar delas in i tre identifierbara delar, efter magsäcken börjar *duodenum*, som övergår i *jejunum* och avslutas med *ileum*. I *duodenum* finns kanaler för utsöndring av galla och bukspott (Dyce, 2010). När digestan når tunntarmen stimuleras bukspottkörteln (*pancreas*) till att utsöndra bukspott som har en buffrande effekt på tarminnehållet, vars pH stiger till runt 7,00 (Al Jassim & Andrews, 2009; Frape, 2010). Tunntarmen har en viktig funktion hos hästen i att producera stora kvantiteter buffrande bukspott som hjälper till att bibehålla stabila pH-förhållanden i *caecum* och *colon* (Sjaastad *et al.*, 2010). För att vara ett enkelmagat djur har hästen relativt låga koncentrationer av enzymet  $\alpha$ -amylas i tunntarmen (Frape, 2010), som bryter ner stärkelse, och den korta längden på tunntarmen gör att fodret passerar snabbt (Sjaastad *et al.*, 2010).

Den mikrobiella floran i tunntarmen representeras främst av, som i alla delar av det gastro-intestinala systemet (GI-systemet), bakterier som härstammar från fylumet *Firmicutes* (Costa *et al.*, 2015). *Proteobacteria* har visat sig förekomma i högre antal i *duodenum* än i stora kolon, *colon descendens* och *faeces*, även i *ileum* har *Proteobacteria* påvisats förekomma i högre antal än i *colon descendens* och *faeces* (Costa *et al.*, 2015). I *ileum* har *Clostridia* påvisats ha den högsta förekomsten (Costa *et al.*, 2015). I tunntarmen och magsäcken återfinns också den lägsta VFA-koncentrationen i hela GI-systemet (de Fombelle *et al.*, 2003)

## **Caecum**

Där *ileum* slutar återfinns *caecum* som utgör en blindsäck i tarmsystemet innan *colon* tar vid. I *caecum* vänder digestan innan den transporteras vidare. Nedbrytningen av strukturella kolhydrater med hjälp av mikrober är en relativt långsam process och för att tillräckligt med VFA ska produceras krävs att hästen behåller digestan en längre tid i grovtarmen (Frape, 2010). När digestan når *caecum* har den ett pH-värde runt 7,00 men sjunker till ett pH runt 6,50 på grund av den mikrobiella syntetiseringen av VFA (de Fombelle *et al.*, 2003). Lösliga, eller icke-strukturella, kolhydrater som når *caecum* bryts ner snabbare än strukturella kolhydrater, vilket gör att en högre andel propionat produceras i *caecum* jämfört med *colon* (Frape, 2010). Samtidigt finns en större population cellulolytiska bakterier i *caecum* än i *colon* (Frape, 2010; de Fombelle *et al.*, 2003).

*Firmicutes* kan utgöra över 50 % av *caecums* bakteriepopulation, följt av *Bacteroidetes* (18,2 %), *Proteobacteria* (13,8 %) och *Verrucomicrobia* (10,5 %) (Moreau *et al.*, 2014). *Clostridia* som tillhör *Firmicutes* utgjorde den största bakterieklassen i *caecum* relativt mot andra undersökta klasser (Costa *et al.*, 2015) och i *Clostridia* återfinns till exempel *Ruminococcaceae* och *Veillonellaceae* (Moreau *et al.*, 2014). Fem dominerande bakteriefamiljer har påvisats i *caecum*; *Porphyromonadaceae* (27 %), *Prevotellaceae* (9 %), *Lachnospiraceae* (7 %), *Ruminococcaceae* (7 %) och *Verrucomicrobiaceae* (7 %), där de första två familjerna härstammar från fylumet *Bacteroidetes*, de två efterföljande från *Firmicutes* och den sista från *Verrucomicrobia* (Hansen *et al.*, 2015).

## **Colon**

Digestan passerar *colon* i följande ordning; högra ventrala colon (right ventral colon, RVC), vänstra ventrala kolon, (left ventral colon, LVC), *flexura pelvina*, vänstra dorsala kolon (left dorsal colon, LDC) och högra dorsala kolon (right dorsal colon, RDC) för att sedan passera *colon transverse*, *colon descendens* och vidare ut genom *rectum* (Dyce, 2010). Höger och vänster ventral- och dorsalkolon brukar tillsammans kallas stora kolon (Frape, 2010). Metabolismen i ventralkolons tarmvägg är nästan helt beroende av dess inneboende mikrobiota som syntetiserar VFA, essentiella aminosyror, vitamin B och vitamin K<sub>2</sub> (Frape, 2010).

De viktigaste fibro- och cellulolytiska bakterierna i grovtarmen anser Daly *et al.* (2001) vara *Butyrivibrio* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp. och *Ruminococcus* spp. *Verrucomicrobia* är ett fylum av bakterier som hos häst har en högre förekomst i *colon*

*descendens* och *rectum* än i magsäcken (Costa *et al.*, 2015), dock har studier visat att fylumet endast utgör 3 procent av mikrobiotan i grovtarmen (Daly *et al.*, 2001).

## **Faeces**

Mer än hälften av TS-vikten i *faeces* är bakterier (Frape, 2010) och den har ett pH-värde kring 6,60 (Willing *et al.*, 2009; Muhonen *et al.*, 2008). De två största fylumen i *faeces* har både Costa *et al.* (2015) och Shepherd *et al.* (2012) sett vara främst *Firmicutes* och *Verrumicrobia*, där den största klassen inom *Firmicutes* visade sig vara *Clostridia* (Costa *et al.*, 2015). Däremot visade Proudman *et al.* (2015) att det näst största fylumet i *faeces* var *Bacteroidetes*.

## **Skillnader och likheter i mikrobiotans sammansättning i olika anatomiska segment**

Mikrobiotan i *faeces*, taget ur *rectum*, är mest lik mikrobiotan i *caecum* med en relativ likhet på 67 % med avseende på artförekomst när jämförelser gjordes mellan *duodenum*, *ileum*, *caecum*, *pelvina flexura* och *rectum* (Schoster *et al.*, 2013), men det finns ändå skillnader mellan *faeces* och *caecums* mikrobiella sammansättning (Schoster *et al.*, 2013; Dougal *et al.*, 2012). Däremot fann Dougal *et al.* (2012) inga skillnader mellan *caecums* och *colons* mikrobiella population, vilket Schoster *et al.* (2013) fann. Mikrobiotans mångfald och stabilitet har dock påvisats åtminstone till viss del bero på individuella skillnader mellan hästar i *faeces* (Schoster *et al.*, 2013; Willing *et al.*, 2009), *duodenum*, *ileum*, *caecum*, *colon* och *rectum* (Schoster *et al.*, 2013).

## **Inverkan av olika grovfoder på mikrobiotan**

De fyra vallfoder som hästar brukar erbjudas är hö, hösilage, ensilage och bete (Holmquist & Müller, 2002). Skillnaderna mellan dessa foder är framförallt torrsubstanshalten och metod för att göra fodret lagringsdugligt. Hö torkas till en torrsubstans (TS) av minst 84 % medan hösilage och ensilage lagras i anaeroba miljöer (Müller *et al.*, 2008). Hösilage och ensilage skiljer sig framförallt från hö genom TS-halten, där ensilage ligger mellan 20-50 % TS och hösilage över 50 %. Det har även påvisats att ensilage innehåller en högre andel fermentationsprodukter såsom mjölk-, acetat-, smör- och bärnstenssyra (Müller & Uden, 2007). Hur vallfodret konserverats kan påverka mikrobiotan i RVC och *faeces* (Müller *et al.*, 2008). När hö, hösilage och ensilage skördades vid samma tillfälle, och från samma vall, och utfodrades till fyra hästar under 21 dagar visade resultaten att antalet *Streptococcus* spp. var högre i *faeces* vid utfodring av hö än vid utfodring av hösilage eller ensilage (Müller *et al.*, 2008). Hästarna var fistulerade i *caecum* och RVC men provtogs enbart ur fisteln i RVC och ur *faeces*. Lägst antal *Streptococcus* spp. återfanns då hästarna utfodrades med hösilage vid provtagning av digestan i RVC. Molarproportionerna för acetat, propionat, butyrat och valerat förhöll sig liknande i RVC och *faeces* oavsett vilket foder som utfodrades och ett medelvärde för RVC återfinns i tabell 1. Antalet LAB och laktatutnyttjande bakterier var också fler i *faeces* än i RVC generellt sett, men nivåerna av mjölksyra i både RVC och *faeces* var mycket låga oavsett fodertyp (Müller *et al.*, 2008).

## **Inverkan av stärkelserika fodermedel på mikrobiotans sammansättning**

Det finns flertalet olika studier som visar på förändringar i mikrobiota vid introduktion av olika former av stärkelse i foderstaten (Goodson *et al.*, 1988; Julliand *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2002; de Fombelle *et al.*, 2003; Willing *et al.*, 2009; Daly *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2015). Svenska utfodringsrekommendationer säger att maximalt 1,5 g stärkelse per utfodringstillfälle är lämpligt (Jansson *et al.*, 2013).

## **Korn**

Korn är ett stärkelserikt fodermedel som används till häst. Jämfört med stärkelse i havre och majs har kornstärkelse en lägre *preileal* smältbarhet och därför finns en högre risk att stärkelsen når grovtarmen (Meyer *et al.*, 1995). Vid introduktion av kornstärkelse i foderstater till hästar har flera författare påvisat att pH sjunker i både *caecum* och *colon* (Julliand *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2013). Andelen LAB samt laktatutnyttjande bakterier visade sig öka och andelen cellulolytiska bakterier minska i *caecum* och *colon* när kornstärkelse introducerats i foderstaten (Julliand *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2002). Tre hästar fistulerade i *caecum* och RVC utfodrades med tre olika foderstater bestående av hö och korn i respektive proportioner; 100; 70:30; eller 50:50, i perioder om 14 dagar per foderstat och provtogs ur digestan i *caecum* och RVC på den fjortonde dagen (Julliand *et al.*, 2001). Koncentrationerna av LAB och laktatutnyttjande bakterier ökade i både *caecum* och RVC när hästarna utfodrades med någon av kornfoderstaterna jämfört med när de fick en foderstat endast bestående av grovfoder. Koncentrationerna av LAB och laktatutnyttjande bakterier i *caecum* var liknande vid försökets båda kornfoderstater men i RVC observerades att koncentrationerna av dessa bakterier blev högre ju högre andel korn som utfodrades. Liknande resultat fann Medina *et al.* (2002), när åtta hästar utfodrades antingen med koncentrat vars största beståndsdel var korn (53 % av TS) eller ett koncentrat som till störst del bestod av lucern (som är fiberrikt och stärkelsefattigt) i tillägg till vetehalm. Koncentrationerna av cellulolytiska bakterier minskade och laktatutnyttjande bakterier samt LAB ökade i *caecum*, och mjölksyrakoncentrationerna ökade i både *caecum* och RVC vid försökets stärkelserika foderstat jämfört med den fiberrika.

I vilken form korn erbjuds verkar inte påverka mikrobiotan, men däremot dietens fibersmältbarhet (Philippeau *et al.*, 2015). Hästar som var fistulerade i *caecum* och RVC erbjöds koncentrat bestående till 80 % (av TS) av korn i form av pellets, mald, krossad eller hel, tillsammans med ängshö (Philippeau *et al.*, 2015). Pellets och krossat korn var värmebehandlat. Den totala fibersmältbarheten var högst när hästarna utfodrades med pellets, följt av krossat korn men pH och VFA-koncentrationerna (tabell 1) i RVC påverkades inte av hur kornet processats (Philippeau *et al.*, 2015).

## **Havre**

Havre är en av de vanligaste stärkelsekällorna i foderstater för hästar i Sverige. Havre är lättare för hästar att bryta ner i tunntarmen än majs och korn (Meyer *et al.*, 1995). Att inkludera havrestärkelse i foderstaten tillsammans med grovfoder har visat sig ge mikrobiella förändringar i *caecum* (Hansen *et al.*, 2015) och *faeces* (Willing *et al.*, 2009). Hästar som erbjudits ett koncentrat rikt på havrestärkelse visade sig dessutom ha en instabilare



mikroflora i *faeces* över tid jämfört med när de utfodrats med enbart grovfoder (Willing *et al.*, 2009).

Skillnader i förekomst av fylumen *Bacteroidetes*, *Firmicutes* (Willing *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2015) och *Tenericutes* (Hansen *et al.*, 2015) i *caecum* har observerats när havrestärkelse introducerats i foderstater som tidigare bestått av enbart grovfoder. Andelen *Bacteroidetes* har påvisats i högre koncentrationer för både *caecum* (Hansen *et al.*, 2015) och *faeces* (Willing *et al.*, 2009) när havre lagts till i foderstaten jämfört med när hästar utfodrats med enbart grovfoder. Andelen *Firmicutes* noterades vara lägre i *caecum* (Hansen *et al.*, 2015) respektive högre i *faeces* (Willing *et al.*, 2009) när hästar utfodrats med havre och grovfoder jämfört med när de utfodrats med enbart grovfoder. Kraftfoder innehållande havrestärkelse i kombination med grovfoder har också påvisats påverka förekomsten av LAB (Willing *et al.*, 2009). *Streptococcus bovis/equinus* och *Lactobacillus ruminis* noterades i högre respektive förekomst över huvud taget i *faeces* när hästarna fick havre tillsammans med grovfoder jämfört med när de bara utfodrades med grovfoder (Willing *et al.*, 2009). Koncentrationerna av LAB, såsom *Streptococcus spp.* och *Lactobacillus spp.*, kunde öka upp till tio gånger när havrebaserat koncentrat inkluderades i foderstaten jämfört med när bara grovfoder utfodrades (Willing *et al.*, 2009). Att utfodra havrestärkelse tillsammans med grovfoder resulterade också i snabbare och lägre sänkning av pH, generell ökning av VFA-koncentration, minskad andel acetat och ökad andel propionat i *caecum* jämfört med när bara grovfoder utfodrades, vilket indikerade att havrestärkelse gav en högre metabol aktivitet i blindtarmen (Hansen *et al.*, 2015).

### **Majs**

Andelen laktatutnyttjande bakterier och amylolytiska bakterier ökade samtidigt som pH sjönk snabbare och till lägre nivå när en ponny fistulerad i *caecum* utfodrades med majs och sojamjöl (i proportionerna 86,7 % respektive 13,3 % av foderstatens TS) jämfört med när den utfodrades med enbart lusern (Goodson *et al.*, 1988). När ponnyn utfodrades med den fiberfattiga foderstaten bestående av majs och sojamjöl noterades andelen amylolytiska bakterier i *caecum* ligga mellan 77,7 och 85,6 % av totala bakteriepopulationen jämfört med mellan 44,2 och 45,5 % när ponnyn utfodrades med lusern. pH sjönk till 5,90 i *caecum* sju timmar efter utfodringen av majs och sojamjöl men vid utfodring av lusern noterades pH 6,40 vid samma tidpunkt (Goodson *et al.*, 1988). *In vitro*-försök har visat att stärkelse från majs som tillsattes i *faeces*-lösning fick pH att sjunka snabbare och till ett lägre värde än vad stärkelse från vete eller havre, som tillsatts i samma koncentration, gjorde (Harlow *et al.*, 2015).

### **Stärkelserikt koncentrat**

Stärkelserika koncentrat innehåller vanligtvis stärkelsekällor som redan nämnts, dock har författarna till studierna under denna rubrik inte specificerat huvudsakliga stärkelsekälla i koncentratet de utfodrat (de Fombelle *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2012). Tre hästar utfodrades med koncentrat som till störst del bestod av stärkelsefattigt och fiberrikt koncentrat tillsammans med halm medan ytterligare fyra hästar utfodrades med stärkelserikt koncentrat

tillsammans med ängshö under 20 dagar för att sedan sövas ner och avlivas (de Fombelle *et al.*, 2003). Under anestesi togs GI-systemet från magsäck till *colon descendens* ut för vidare studier tillsammans med *faeces*-prov tagna direkt ur *rectum* innan sövningen. Antalet cellulolytiska bakterier visade sig vara lägre i hela GI-systemet för hästar med en foderstat innehållande stärkelsesrikt koncentrat jämfört med hästar som utfodrats med fiberrik foderstat innehållande en lägre andel stärkelse (de Fombelle *et al.*, 2003). Det stärkelsesrika fodret visade sig ha en försurande effekt på pH och gav högre koncentration av mjölksyra i *colon descendens* men även ett högre pH i *caecum* jämfört med det fiberrika fodret (de Fombelle *et al.*, 2003). För hästarna som utfodrades med den stärkelsesrika foderstaten, var koncentrationen av *Lactobacillus* spp. och laktatutnyttjande bakterier i magsäck och *ileum*, samt koncentrationen av *Streptococcus* spp. i *ileum* högre jämfört med när den fiberrika foderstaten utfodrades. Det stärkelsesrika fodret gav även högre koncentration av laktatutnyttjande bakterier i *caecum* och LDC jämfört med fodret med högt fiberinnehåll (de Fombelle *et al.*, 2003). Molarproportioner för hästarna som utfodrades med stärkelsesrikt koncentrat och ängshö återfinns i tabell 1. Andelen *Lachnospiraceae* och *Bacteroidetes* samt bakterier ur gruppen *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (BLS), som härstammar från *Firmicutes*, har också påvisats vara i högre i *pelvina flexura* hos hästar som utfodrats med stärkelsesrikt koncentrat jämfört med hästar som gått på bete (Daly *et al.*, 2012). I samma försök påvisades även att andelen *Fibrobacter* och *Ruminococcaceae* var lägre hos hästarna som utfodrats med stärkelsesrikt foder än för de hästar som haft tillgång till gräs *ad libitum*. Daly *et al.* (2012) mätte inte pH-värden men föreslog att den minskade andelen *Fibrobacter* i grovtarmen hos hästarna i studien som utfodrades med stärkelsesrikt koncentrat indikerade på ett lägre pH i *colon*.

Tabell 1. Gram stärkelse per kg kroppsvikt utfodrat vid fyra till fem timmar före provtagningen och molarproportioner av flyktiga fettsyror i höger ventrala kolon från olika studier

Referens	g stärkelse/kg kroppsvikt	Tid utfodring till provtagning	Proportioner acetat:propionat:butyrat:valerat i höger ventrala kolon
Müller <i>et al.</i> , 2008	0	4 tim	71:19:8:2
Phillipeau 2015	1,21	4 tim	70:22:5:3
de Fombelle <i>et al.</i> , 2003	2,86	4 tim 15 min	65:20:12:3
Medina <i>et al.</i> , 2002	3,4	4 tim	66:21:10:3
de Fombelle <i>et al.</i> 2001	Ej angivet (30 % korn)	5 tim	68:24:7:1
de Fombelle <i>et al.</i> , 2001	Ej angivet (50 % korn)	5 tim	64:28:7:1

### Inverkan av tid efter utfodring på mikrobiotans sammansättning

Mikrobiotans sammansättning kan variera vid olika tidpunkter efter foderintag (Hansen *et al.*, 2013). Den största skillnaden som påvisades var i antalet laktatproducerande bakterier som var som högst i *caecum* sex till åtta timmar efter födointaget när två hästar fistulerade i *caecum* utfodrades med samma foderstat (Hansen *et al.*, 2013). Foderstaten bestod av

timotejhö och korn och hästarna provtogs med avseende på digesta ur fisteln före morgonutfodringen och sedan varje halvtimme under totalt åtta timmar under två dagar, pH mättes var femte minut under 8,5 timmar efter utfodringstillfället (Hansen *et al.*, 2013). Hästarna hade utfodrats med grovfodret nio månader innan försöket och korn introducerades i foderstaten sju dagar innan försökets början. pH i *caecum* nådde det lägsta värdet mellan fyra och fem timmar efter utfodring men understeg inte pH 6,00 vid något provtagningstillfälle. VFA-produktionen ökade de två till fyra första timmarna efter födoinslaget för att sedan avstanna i ökning. Digestaprovens molarproportioner (tabell 1) för acetat och propionat i *caecum* visade sig dock också indikera individuella skillnader mellan hästarna, där den ena hästen hade högre andel acetat och lägre andel propionat än den andra (Hansen *et al.*, 2013).

### **Mikrobiotans svängningar vid abrupta foderbyten eller förändringar**

Plötslig introduktion av stärkelserikt kraftfoder i foderstaten har påvisats inverka på mikrobiotans sammansättning (Goodson *et al.*, 1988; de Fombelle *et al.*, 2001). En ökad koncentration av *Streptococcus* spp. och mjölksyra i kunde påvisas i *caecum* fem timmar ett abrupt foderbyte när tre hästar fistulerade i *caecum* och RVC först utfodrades med bara ängshö och sedan med en foderstat bestående av ängshö och korn i proportionerna 70:30 (av TS) (de Fombelle *et al.*, 2001). Ingen förändring i total VFA-koncentration upptäcktes i *caecum* eller RVC i försöket, däremot kunde en ökning av andelen propionat samt en sänkning av andelen butyrat och valerat noteras vilket ledde till förändrade molarproportioner av syror (tabell 1). I en andra behandling i samma försök bytte hästarna diet från enbart ängshö till en foderstat som bestod av 50 % hö och 50 % korn (av TS) där en snabb ökning av både *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. noterades i *caecum* digesta fem timmar efter utfodringen. Vid samma provtagningstidpunkt påvisades däremot en sänkning av andelen *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. i kolondigestan. Vid provtagning i *colon* 29 timmar efter foderbytet från hö till 50:50 hö och korn hade koncentrationerna av *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. stigit, och likaså mjölksyrakoncentrationerna i både RVC och *caecum* (de Fombelle *et al.*, 2001). Varken i *caecum* eller *colon* kunde några förändringar i pH-värde fastställas i försöket.

Andelen amylytiska bakterier visade sig gå från 73,1 till 92,2 % av totala antalet bakterier hos en ponny fistulerad i *caecum* före och 24 timmar efter ett abrupt foderbyte från lusernhö till en foderstat bestående av enbart kraftfoder i form av majs och sojamjöl (Goodson *et al.*, 1988). Sju timmar efter att foderstaten bytts från lusernhö till majs och sojamjöl noterades att pH sjunkit till 5,90 jämfört med när lusernhö utfodrats, då pH var 6,40 efter sju timmar. Fyrtioåtta timmar efter bytet sjönk koncentrationen till 87,5 % amylytiska bakterier och varierade sedan mellan 77,7 och 85,6 % resten av tiden under de sex veckor kraftfoderstaten utfodrades (Goodson *et al.*, 1988). När foderstaten sedan byttes tillbaka till lusernhö gick andelen amylytiska bakterier ner till 44,2 och 45,5 procent efter två respektive tre veckor. Andelen laktatutnyttjande bakterier hos ponnyn förhöll sig oförändrade direkt efter bytet från lusernhö till majs och sojamjöl men steg snabbt mellan dag tre och sju för att nå en topp på 69,2 procent och hade sedan ett medelvärde på 33,5 procent under vecka två till sex (Goodson *et al.*, 1988). När ponnyns foderstat byttes tillbaka till lusernhö sjönk andelen laktatutnyttjande bakterier till 23,7 procent.

Abrupta byten mellan hö, hösilage och ensilage skördat från samma vall vid samma tidpunkt har inte påvisats resultera i någon större påverkan på mikrobiotans sammansättning eller VFA-koncentrationerna i RVC, eller på pH i RVC eller *faeces* (Muhonen *et al.*, 2009). Tjugoåtta timmar efter grovfoderbytena sågs inga förändringar i mikrobiell sammansättning, VFA-koncentration eller pH i varken RVC eller *faeces* (Muhonen *et al.*, 2009). Resultaten i studien indikerade att abrupta byten mellan olika slags grovfodertyper från samma gröda inte åsamkade några större förändringar i RVC och *faeces* för hästar på underhållsfoderstat.

Effekten på mikrobiotan i RVC av råproteinkoncentration i grovfodret vid abrupta foderbyten har undersökts av Muhonen *et al.* (2008). En högre råproteinhalt i grovfodret orsakade inte några förändringar i den mikrobiella sammansättningen i RVC jämfört med en lägre råproteinhalt, däremot orsakade själva bytet förändringar. Antalet laktatutnyttjande bakterier, proteolytiska bakterier och *Streptococcus* spp. sjönk i RVC fyra timmar efter bytet oavsett råproteinhalt, och de proteolytiska bakterierna höll ett fortsatt lägre antal efter 12 och 24 timmar. Antalet *Streptococcus* spp. steg istället 12 och 24 timmar efter bytet från lägre till högre proteinhalt (Muhonen *et al.*, 2008). Den totala VFA-koncentrationen i RVC steg under de 12 första timmarna oavsett råproteinhalt i grovfodret samtidigt som mjölksyranivåerna höll sig under detekterbar nivå (Muhonen *et al.*, 2008). pH i *colon* och *faeces* förändrades inte av det abrupta foderbytet mellan grovfoder olika råproteinhalter (Muhonen *et al.*, 2008).

### **Inverkan av proteinhalten på mikrobiotan**

Vid utfodring av grovfoder med olika råproteinhalter har vissa skillnader i mikrobiotan i *faeces* uppstått (Connysson *et al.*, 2006). Vid utfodring av grovfoder med högre proteinhalt noterades lägre TS-halt, högre koncentrationer av kväve (N) och lägre pH i *faeces* jämfört med när samma sex hästar utfodrades med ett grovfoder med lägre proteinhalt (Connysson *et al.*, 2006). Hästarna i försöket var i tävlingskondition och intog 1070 respektive 1600 g råprotein/dag från de ensilerade grovfodren. Det sågs däremot ingen skillnad när fyra hästar fistulerade i *caecum* och RVC utfodrades med två ensilerade vallfoder med olika råproteininnehåll där det ena fodret försåg hästarna med 615 g råprotein/dag och det andra 873 g råprotein/dag. Varje foder utfodrades under 22 dagar i ett change-over försök med ett abrupt byte av grovfoder emellan. Hästarna provtogs ur *faeces* och RVC (Muhonen *et al.*, 2008). När hästarna bytte från fodret med lägre proteinhalt till fodret med högre proteinhalt var återfanns inga förändringar efter de första tre veckorna (Muhonen *et al.*, 2009).

### **Diskussion**

Det verkar som att när hästar utfodras med stärkelsrika fodermedel får de en annorlunda mikrobiell sammansättning jämfört med om de utfodras med fiberrika foderstater. I alla studier där stärkelsrikt foder inkluderats i foderstaten och andelen LAB undersökts, har de påvisats stiga jämfört med andelen som uppmätts vid fiberrika foderstater. Goodson *et al.* (1988) visade att andelen amylolytiska bakterier, som bland annat innefattar *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. som ingår i LAB, låg runt 80 % av *caecums* mikrobiella

population och noterade ett pH-värde under 6,00 i ponnyns *caecum* vid utfodring av enbart kraftfoder. I försöket användes dock bara en ponny som utfodrades med enbart stärkelsesrikt kraftfoder och inget fiberrikt foder över huvud taget under behandlingen, vilket inte är representativt för hur de flesta hästägare utfodrar sina hästar idag. Att använda sig av ett enda djur kan också leda till att resultaten inte blir representativa för fler än just den individen, då det finns individuella variationer i mikrobiell sammansättning i GI-systemet hos hästar (Willing *et al.*, 2009; Schoster *et al.*, 2013). Även i Hansen *et al.* (2013) sågs skillnader i molarproportioner i *caecum* som berodde på individuella variationer. På grund av den individuella variationen bör en change-over design användas i försök med få antal hästar för att komma förbi denna problematik. De flesta försöken har använt sig av sådana utformningar men i försök där bara en häst använts eller hästarna avlivats är det av praktiska skäl inte möjligt (Goodson *et al.*, 1988; de Fombelle *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2012). Att de Fombelle *et al.* (2003) fann att pH i *caecum* var högre hos hästar som utfodrades med stärkelsesrikt koncentrat, vilket motsäger de andra studierna, kan bero på att change-over design inte använts.

Trots att Goodson *et al.* (1988) endast hade med en ponny i försöket var det ändå intressant att ta med studien i uppsatsen på grund av de höga koncentrationerna av amylolytiska bakterier som uppmättes, vilket visar hur mycket mikrobiotan eventuellt skulle kunna förändra sig beroende på vad foderstaten erbjuder och dessutom för att det var det enda försök där den stärkelsesrika foderstaten inte kompletterades med någon form av fiberrikt foder. Costa *et al.* (2015) visade att den vanligast förekommande klassen av bakterier i *caecum* var *Clostridia* medan *Bacilli*, som de två amylolytiska bakterierna *Lactobacillus* spp. och *Streptococcus* spp. tillhör, var den minst förekommande. Vid jämförelse av olika grovfoder var den enda skillnaden som kunde påvisas en ökad förekomst av *Streptococcus* spp. i RVC och *faeces* när hö utfodrades jämfört med inplastade vallfoder (Müller *et al.*, 2008). Den ökade förekomsten av *Streptococcus* spp. i försöket av Müller *et al.*, (2008) verkar kanske inte ha haft någon större betydelse då mjölksyranivåerna i försöket ändå var väldigt låga, på gränsen till detekterbara. Grovfoders råproteinhalt verkar inte heller ha särskilt stor inverkan på hästens mikrobiota i *caecum* eller RVC (Muhonen *et al.*, 2008).

Det är dock viktigt att poängtera att användandet av olika analysmetoder kan påverka resultaten. Många av studierna, till exempel Goodson *et al.* (1988), använde sig av mikrobiologisk odling medan några av de nyare studierna, till exempel Costa *et al.* (2015), använde sig av molekylärbiologisk analys. Det finns svårigheter och fördelar med båda metoderna, bland annat har det visat sig att många av mikroorganismerna i tarmen hos hästar inte går att odla (Daly *et al.*, 2001), men samtidigt ger molekylärbiologisk analys ett väldigt stort datamaterial som inte bara innehåller DNA-frekvenser från mikroorganismerna i tarmen, utan även från annat organiskt material som finns vid provtagningstillfället.

Abrupta byten från foderstater med bara grovfoder till foderstater innehållande stärkelsesrika fodermedel verkar också ge ökade koncentrationer av LAB i *caecum* och RVC. I studien av de Fombelle *et al.* (2001) steg andelen *Streptococcus* spp. och *Lactobacillus* spp. i *caecum* fem timmar efter byte från hö till en foderstat bestående av hälften hö (samma hö som före

bytet) och hälften korn, men sjönk i RVC vid samma tidpunkt. Det skulle kanske kunna bero på att det stärkelsesrika fodret ännu inte nått *colon*, för vid provtagning 29 timmar efter foderbytet var koncentrationerna av LAB och mjölksyra högre i både *caecum* och RVC än de var när hö utfodrades. När Goodson *et al.* (1988) gjorde ett abrupt foderbyte från lusernhö till majs och sojamjöl gick koncentrationerna av amylolytiska bakterier i *caecum*, som skulle kunna vara LAB, till ett värde så högt som 92,2 % efter 24 timmar. Andelen amylolytiska bakterier i samma försök efter utfodring av lusernhö i tre veckor var 45,5 %. Koncentrationerna av dessa bakterier i *caecum* rapporterade av Goodson *et al.* (1988) var väldigt höga jämfört med vad som rapporterats av till exempel Hansen *et al.*, (2015). Det skulle kunna bero på att Goodson *et al.*, (1988) inte odlade för så många olika slags bakterier, eller att identifieringsmetoderna för mikroberna inte var så utvecklade på den tiden att de kan ha grupperats felaktigt eller efter annan grövre klassificering. Däremot verkade inte abrupt byte mellan grovfoder med olika råproteinhalt ge några större förändringar i den mikrobiella sammansättningen i RVC eller *faeces* (Muhonen *et al.*, 2008). Vid sökning efter studier gjorda med avseende på mikrobiell sammansättning i grovtarmen vid abrupt introduktion av kraftfoder med hög råproteinhalt återfanns inget sådant material, detta skulle vara intressant att se forskning på.

De två försöken som undersökte effekten av råproteinhalt i grovfoder på mikrobiota i grovtarmen hos hästar fick olika resultat. Muhonen *et al.* (2008) fann inga skillnader mellan olika halter av råprotein i grovfodret, medan Connysson *et al.* (2006) fann vissa förändringar. Det skulle kunna bero på att skillnaden i mängden råprotein som utfodrades per dag var ganska stor, råproteinmängden i grovfodret med hög proteinhalt i respektive försök var dubbelt så hög i studien av Connysson *et al.* (2006) som i studien av Muhonen *et al.* (2008).

Det finns svårigheter med att dra slutsatser om grovtarmens generella mikrobiella sammansättning genom provtagna ur *faeces*, till exempel då mikrobiotan i *faeces* och *caecum* endast har en relativ likhet på ca 67 %, med avseende på artförekomst (Schoster *et al.*, 2013). Hansen *et al.* (2013) fann att det dominerande fylumet i *caecum* var *Bacteroidetes*, medan det visats att *Firmicutes* är det största fylumet i *faeces* (Costa *et al.*, 2015; Shepherd *et al.*, 2012). Därför kan det vara bra att använda fistulerade hästar för att dra slutsatser om specifika segment i grovtarmen.

Tabell 1 visar molarproportioner i RVC från försök där olika mängder stärkelse utfodrats. I tabellen går det att se att proportionerna förändras, och en viss tendens till att andelen acetat minskar till förmån för andra VFA ju högre andel stärkelse som utfodras. På grund av uppsatsens avgränsning tas inte eventuella hälsokonsekvenser av detta upp, utan slutsatsen utifrån tabellen blir att stärkelsesmängden påverkar proportionerna av VFA vilket skulle kunna innebära att den mikrobiella sammansättningen i RVC påverkas. Den enda foderstaten innehållande stärkelse som ligger under svenska utfodringsrekommendationen (Jansson *et al.*, 2013) för andel stärkelse som bör utfodras per mål är foderstaten som utfodrades i studien av Phillipeau *et al.* (2015), vilken också är den som ligger närmast molarproportionerna vid utfodring av enbart grovfoder (Müller *et al.*, 2008). Baserat på studien av Phillipeau *et al.*, (2015) där det inte sågs någon mikrobiell påverkan av hur korn processats, tillsammans med

informationen i tabell 1 verkar det som att mängden stärkelse som utfodras har en större inverkan på mikrobiotan i hästens GI-system än i vilken form stärkelsen utfodrats.

## Slutsats

Utfodring av stärkelsesrika fodermedel, även tillsammans med grovfoder, leder till förändringar i mikrobiell sammansättning i mag-tarmkanalen där främst mjölksyraproducerande bakterier i grovtarmen främjas. Stärkelsesrika fodermedel bör därför utfodras med försiktighet och kunskap om hästens GI-system och dess mikrobiella fermentation.

## Litteraturförteckning

- Al Jassim, R.A.M. & Andrews, F.M. (2009). The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, vol. 25 (2), ss. 199-215
- Argenzio, R.A., Southworth, M. & Stevens, C.E. (1974). Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology*, vol. 226 (5), ss. 1043-1050.
- Biddle, A.S., Black, S.J. & Blanchard, J.L. (2013). An In Vitro Model of the Horse Gut Microbiome Enables Identification of Lactate-Utilizing Bacteria That Differentially Respond to Starch Induction. *PLoS One*, vol. 8 (10): e77599. Tillgänglig: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077599> [2016-04-22]
- Connysson, M., Muhonen, S., Lindberg, J.E., Essen-Gustavsson, B., Nyman, G., Nostell, K. & Jansson, A. (2006). Effects on exercise response, fluid and acid-base balance of protein intake from forage-only diets in standardbred horses. *Equine veterinary Journal*, supplement (36), ss. 648-653.
- Costa, M.C., Silva, G., Ramos, R.V., Staempfli, H.R., Arroyo, L.G., Kim, P. & Weese, J.S. (2015). Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Veterinary Journal*, vol. 205 (1), ss. 74-80.
- Daly, K., Proudman, C.J., Duncan, S.H., Flint, H.J., Dyer, J. & Shirazi-Beechey, S.P. (2012). Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *British Journal of Nutrition*, vol. 107 (7), ss. 989-995.
- Daly, K., Stewart, C.S., Flint, H.J. & Shirazi-Beechey, S.P. (2001). Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 38 (2), ss. 141-151.
- de Fombelle, A., Julliand, V., Drogoul, C. & Jacotot, E. (2001). Feeding and microbial disorders in horses: 1 - Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 21 (9), ss. 439-445.
- de Fombelle, A., Varloud, M., Goachet, A.G., Jacotot, E., Philippeau, C., Drogoul, C. & Julliand, V. (2003). Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Animal Science*, vol. 77, ss. 293-304.
- Dougal, K., Harris, P.A., Edwards, A., Pachebat, J.A., Blackmore, T.M., Worgan, H.J. & Newbold, C.J. (2012). A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 82 (3), ss. 642-652.
- Dyce, K.M. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4. uppl. St. Louis, MO: Saunders Elsevier.
- Fondevila, M., Dehority, B. A. (1994) Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 77, ss. 541-548
- Frape, D. (2010). *Equine nutrition and feeding*. 4. uppl. Chichester: Wiley-Blackwell. ss. 5, 8, 9, 13-14, 18.

- Goodson, J., Tyznik, W.J., Cline, J.H. & Dehority, B.A. (1988). Effect of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 54 (8), ss. 1946-1950.
- Hansen, N.C.K., Avershina, E., Mydland, L.T., Nasset, J.A., Austbo, D., Moen, B., Mage, I. & Rudi, K. (2015). High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microbial ecology in health and disease*, vol. 26, 27216.
- Hansen, N.C.K., Mydland, L.T., Naasset, J.A., Austbo, D., Mage, I. & Rudi, K. (2013). Molecular diversity of the equine caecal microbiota and its correlation to postprandial fermentation metabolites: A preliminary approach. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A - Animal Science*, vol. 63 (4), ss. 208-216.
- Harlow, B.E., Donley, T.M., Lawrence, L.M. & Flythe, M.D. (2015). Effect of starch source (corn, oats or wheat) and concentration on fermentation by equine faecal microbiota in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 119 (5), ss. 1234-1244.
- Higgins, A.J. & Snyder, J.R. (2006). *The Equine manual*. 2. uppl. Edinburgh: Elsevier Saunders. ss. 166.
- Holmquist, S., Müller, C. E. (2002). Problems related to feeding forages to horses. I: *Conference Proceedings XIIIth International Silage Conference* (ss. 152-153). Auchincruive, Storbritannien.
- Jansson, A., Lindberg, J. E., Rundgren, M., Müller, C., Connysson, M., Kjellberg, L., Lundberg, M. (2013). *Utfodringsrekommendationer för häst*. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet (Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Rapport 289).
- Jordbruksverket. (2012). *Hästhållning i Sverige*. Jönköping: Jordbruksverket (Rapport 2012:1).
- Julliand, V., de Fombelle, A., Drogoul, C. & Jacotot, E. (2001). Feeding and microbial disorders in horses: Part 3 - Effects of three hay : grain ratios on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 21 (11), ss. 543-546.
- Julliand, V., de Vaux, A., Millet, L. & Fonty, G. (1999). Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 (8), ss. 3738-3741.
- Larsen, J. (1994). Acid-Base and Electrolyte Balance in Horses with Various Gastrointestinal Disorders. I: *Proceedings of The Fifth Equine Colic Research Symposium*, The University of Georgia. ss. 9.
- Mackie, R.I. & Heath, S. (1979). Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38 (3), ss. 416-421.
- Medina, B., Girard, I.D., Jacotot, E. & Julliand, V. (2002). Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *Journal of Animal Science*, vol. 80 (10), ss. 2600-2609.
- Meyer, H., Radicke, S., Kienzle, E., Wilke, S., Kleffken, D. & Illenseer, M. (1995). Investigations on preileal digestion of starch from gran, potato and manioc in horses. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, vol. 42 (6), ss. 371-381.
- Milnovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C., van Eps, A.W., Thoefner, M.B., Blackall, L.L., Al Jassim, R.A.M., Morton, J.M. & Pollitt, C.C. (2006). Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology*, vol. 8 (5), ss. 885-898.
- Moreau, M.M., Eades, S.C., Reinemeyer, C.R., Fugaro, M.N. & Onishi, J.C. (2014). Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Veterinary Microbiology*, vol. 168 (2-4), ss. 436-441.
- Muhonen, S., Connysson, M., Lindberg, J.E., Julliand, V., Bertilsson, J. & Jansson, A. (2008). Effects of crude protein intake from grass silage-only diets on the equine colon ecosystem after an abrupt feed change. *Journal of Animal Science*, vol. 86 (12), ss. 3465-3472.
- Muhonen, S., Julliand, V., Lindberg, J.E., Bertilsson, J. & Jansson, A. (2009). Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. *Journal of Animal Science*, vol. 87 (7), ss. 2291-2298.
- Müller, C.E. & Udén, P. (2007). Preference of horses for grass conserved as hay, haylage or silage. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 132 (1-2), ss. 66-78.



- Müller, C.E., von Rosen, D. & Uden, P. (2008). Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. *Livestock Science*, vol. 119 (1-3), ss. 116-128.
- Nadeau, J.A., Andrews, F.M., Patton, C.S., Argenzio, R.A., Mathew, A.G. & Saxton, A.M. (2003). Effects of hydrochloric, acetic, butyric, and propionic acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 64 (4), ss. 404-412.
- Perkins, G.A., den Bakker, H.C., Burton, A.J., Erb, H.N., McDonough, S.P., McDonough, P.L., Parker, J., Rosenthal, R.L., Wiedmann, M., Dowd, S.E. & Simpsona, K.W. (2012). Equine Stomachs Harbor an Abundant and Diverse Mucosal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78 (8), ss. 2522-2532.
- Philippeau, C., Sadet-Bourgeteau, S., Varloud, M. & Julliand, V. (2015). Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. *Animal*, vol. 9 (12), ss. 1943-1948.
- Prescott, L.M. (2005). *Microbiology*. 6. uppl. New York: McGraw-Hill. ss. 430-432.
- Salter, R. E., Hudson, R. J. (1979). Feeding Ecology of Feral Horses in Western Alabama. *Journal of Range Management*, vol. 32 (3), ss. 221-225.
- Schoster, A., Arroyo, L.G., Staempfli, H.R. & Weese, J.S. (2013). Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. *BMC research notes*, vol. 6 (91). Tillgänglig: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/6/91> [2016-04-11]
- Shepherd, M.L., Swecker, W.S., Jensen, R.V. & Ponder, M.A. (2012). Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *Fems Microbiology Letters* 326 (1), ss. 62-68.
- Sjaastad, Ø.V, Sand, O., & Hove, K. (2010). *Physiology of domestic animals*. 2. uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. ss. 597, 602-603, 613, 621.
- Wallin, L., Strandberg, E., Philipsson, J. & Dalin, G. (2000). Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock Production Science*, vol. 63 (3), ss. 275-289.
- Willey, J.M. (2012). *Prescott's principles of microbiology*. International edition. Boston: McGraw-Hill Higher Education. ss. 490.
- Willing, B., Voros, A., Roos, S., Jones, C., Jansson, A. & Lindberg, J.E. (2009). Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. *Equine Veterinary Journal*, vol. 41 (9), ss. 908-914.