

Förekomst av mykotoxiner i majsensilage

Bakgrund

Sedan år 2000 till år 2007 ökade majsodlingen i Sverige från ca 2500 ha till 11000 ha och fortsatt ökning förspås. Kunskaperna om majs som foder till kor finns internationellt och uppbyggnad av liknande kunskap sker nu i Sverige, emellertid koncentrerar man sig mest på odling och skörd och kunskapen om den majsensilagens hygieniska kvalitet saknas.

Det är välkänt att foder av nedsatt hygienisk (inbegriper mikrobiologiska, kemiska och fysikaliska egenskaper) kvalitet orsakar störningar inom animalieproduktionen (Pier *et al.*, 1980). I en avhandling (Nyman, 2007) framgick det att i svenska mjölkbesättningar där man utfodrade sina förstakalvare med majsensilage i perioden runt kalvning förelåg det en ökad risk att förstakalvarna skulle drabbas av juverhälsostörningar i tidig laktation. En tänkbar förklaring till detta skulle vara att majsensilaget som dessa förstakalvare utfodrades med hade en sämre hygienisk status. I denna studie togs inte prov på majsensilaget för hygienisk analys, medan man i prover på gräsensilage kunde frekvent finna *Penicillium roqueforti*.

Tillsammans med *Aspergillus fumigatus* har *P. roqueforti* i flera studier visat sig vara en av de vanligaste förekommande mögelsvamparna i ensilage (Frevel *et al.*, 1985; Nout *et al.*, 1993; Auerbach *et al.*, 1998; Boysen *et al.*, 2000; Sumarah *et al.*, 2005). *P. roqueforti* kan bl.a. bilda mykotoxinet roquefortine C, som misstänks vara neurotoxiskt (Wagener *et al.*, 1980) och detta gift har påvisats i flera prov av gräsensilage (Auerbach *et al.*, 1998). Man har också kunnat påvisa att koncentrationen av roquefortine C är högre i majsensilage än i gräsensilage (Auerbach *et al.*, 1998). Roquefortine C har fastställts i samband med klinisk sjukdom och toxikos hos kor i andra studier (Hägglom, 1990; Boysen *et al.*, 2000; Sumarah *et al.*, 2005). En annan sekundär metabolit av *P. roqueforti* är mycophenolic acid (MPA). MPA är en välkänd immunsuppressiv agens så MPA-kontaminerat foder kan främja utvecklingen av smittsamma sjukdomar hos djur (Schneweis *et al.*, 2000).

A. fumigatus producerar bl.a. mykotoxinet gliotoxin som har cytotoxisk och neurotoxisk potential även i små doser (Wenehed *et al.*, 2003, Axelsson, 2006). Produktion av gliotoxin (Scudamore and Livesey, 1998) har tidigare påvisats från *A. fumigatus* som isolerats från ensilage (dos Santos *et al.*, 2002). *A. fumigatus* kan också bilda andra nervpåverkande (tremorgena) mykotoxiner, till exempel fumitremorgin A och B samt verruculogen (Yamazaki *et al.*, 1980, Land *et al.*, 1993). *Aspergillus* spp påvisades i miljön och i blod från flera tävlingshästar på Irland vid utredning av nedsatt prestationsförmåga (Buckley, 2003). Mykotoxiner från en annan *Aspergillus*-art, *A. clavatus*, orsakar neurotoxikos hos nötkreatur och får (Kellerman *et al.*, 1976, Gilmour *et al.*, 1989).

Andra mögelgifter av intresse för fodersäkerhet och djurhälsa (i majsbaserade/-innehållande foder) är mykotoxiner producerade av *Fusarium* spp, t.ex. fumonisiner och zearalenon (ZON). *Fusarium*toxiner medför toxiska egenskaper och kan därför påverka negativt djurhälsan. Ett flertal av *Fusarium*toxiner i foder regleras via [Kommissionens rekommendation av den 17 augusti 2006](#).

Situationen med förekomst av mögelgifter i fodermedel bedöms på sikt att ytterligare kompliceras: ”Ökande problem med angrepp av mikroorganismer i växande gröda men även tillväxt i skördade fodermedel kan förväntas som en följd av högre temperatur men också som en följd av ökad relativ luftfuktighet under lagringssäsongen (vinterhalvåret). Större problem kan förväntas med mögelgifter i inhemskt producerade fodermedel... En ökad odling av nya fodermedel som t.ex. majs kommer att ge problem med andra mögelgifter än de som hittills

förekommit inom stråsåsodlingen.” (SJV:s rapport 2007:16). Mer omfattande angrepp av olika mikroorganismer i växande gröda och lagrade foderprodukter kan medföra att djur exponeras för mögelgifter i fodret. Bland annat kan djurens reproduktion och tillväxt störas allvarligt om halterna av mykotoxiner från mögelsvampar är höga i fodret. Smakligheten av fodret kan också påverkas varför djuren inte äter den mängd som behövs med minskad produktion som följd.

Vilka arter av mögelsvampar som växer i majsensilage under svenska förhållanden och vilka mykotoxiner dessa producerar är inte väl känt. För hög torrsubstanshalt kan t.ex. missgynna mjölksyrabakterierna. Istället kan jäst- och mögelsvampar gynnas, framför allt då dagstemperaturen börjar stiga under våren. Svamparna har ingen konkurrens från andra mikroorganismer och gott om näring. Jästsvamparna anses inte vara patogena men de bildar värme under sin tillväxt. Värmebildningen gynnar i sin tur tillväxt av termofila mikroorganismer som t.ex. *A. fumigatus*. Mögelsvampar bildar sporer och vissa kan bilda mykotoxiner under sin tillväxt. Mängden mögel i inplastat vallfoder ökar med ökande lagringstid och andra lagringsfaktorer (Möller *et al.*, 1999, Borreani and Tabacco, 2005, Müller *et al.*, 2006). Syretrycket i omgivningen påverkar hur olika mögelsvampar växer ut och även vilka mykotoxiner de producerar (Watanabe *et al.*, 2004).

Mykotoxiner bildas av okänd anledning av vissa mögelsvampar under speciella förhållanden. Fram till idag har man identifierat ungefär 400 olika mykotoxiner och antalet nyupptäckta mykotoxiner ökar stadigt (Filtenborg *et al.*, 2000).

En mikrobiologisk analys ger svar på vilken mikrobiell flora som finns i foderprovet, vilket i sin tur ger en fingervisning om vilka mykotoxiner som kan finnas i fodret. En kemisk analys ger ett specifikt/selektivt svar på vilket/vilka mykotoxiner som finns i foderprovet. Kemiska analysmetoder finns beskrivna för vissa kända mykotoxiner i foder (t.ex. aflatoxiner, ochratoxin A, trichotecener och fumonisiner) men för många saknas rapporter.

Syftet med detta projekt var att med hjälp av kemiska metoder undersöka mykotoxininnehåll i majsensilage samt studera samband mellan resultat från hygieniska analyser och de mykotoxiskaanalyserna för att se hur väl de korrelerar.

Material och metoder

Majsensilageprover

Vid SLU i Skara genomförde man under 2007-2008 ett projekt ”Grovfodermajs – från odling till utfodring på mjölk- och köttdjursgårdar” med syftet att få en samlad bild av odling, skörd, konservering och utfodring av majsensilage inom mjölk- och köttproduktionen i Sverige samt att också en uppfattning om skillnader i majsens foderegenskaper. I detta projekt samlades 30 majsensilageprover in som sedan analyserades med avseende på hygienstatus.

Hygienanalysen visade att över 60 % av proverna var infekterade med *P. roqueforti* och 23 % även med *A. fumigatus*. För att få kunskap om betydelsen av dessa mögelsvampfynd för djuren behövde materialet undersökas med avseende på mykotoxiner.

Redan i projektets inledande skede bedömdes det att det var mycket önskvärt att utöka antal provtagningsställen med syfte att på ett avsevärt mer effektivt sätt undersöka förekomst av mykotoxiner i majsensilage inom de angivna finansiella ramarna. Projektets presenterades därför på Svensk Mjölks utfodringskonferens på SLU i Uppsala i augusti 2009. Det resulterade i att prover togs på fler gårdar än vad som tidigare planerats. Ett ökat antal provtagningsgårdar bedömdes ge ett statistiskt säkrare underlag för att uppnå projektets mål. Ingen ökad finansiering söktes i samband med att antalet provtagningsställen utökats.

Med syfte att studera majsensilages hygieniska status, samt ev ändring av dess, under den tid som materialet lagras och utfodras, kontaktades 66 gårdar med inbjudan att medverka i projektet genom att provta och leverera majsensilageprover (frakten betalades av projektet och alla deltagare fick sina analysresultat kostnadsfritt). Provtagningen genomfördes följaktligen av enskilda bönder och provtagningsinstruktionen uppmanade till provtagning vid 3 olika tillfällen:

1. Vid skörd/inläggning för ensilering
2. Vid öppnande av silo
3. Vid slut av utfodringen med majsensilaget i fråga

Sammanlagt har 114 prover inkommit, det var dock inte möjligt att erhålla prover från alla gårdar vid dessa 3 tillfällen.

Geografisk spridning av provtagningsställena visas i Fig 1.

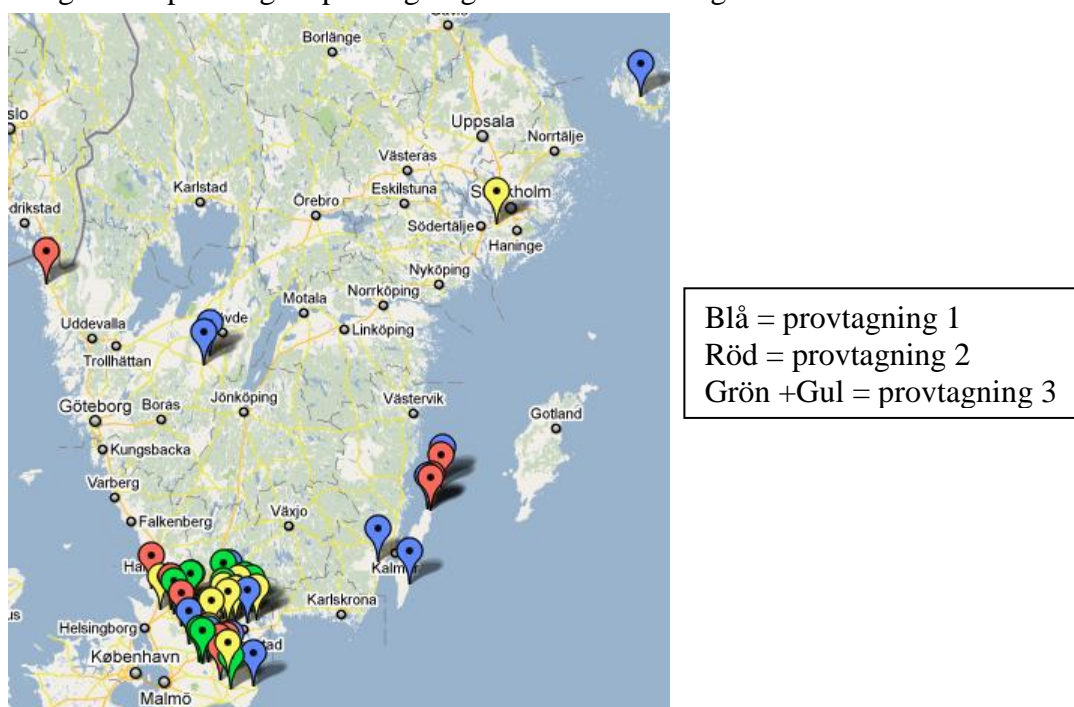


Fig 1. Geografisk spridning av provtagningsställena

Mikrobiologiska undersökningar

Direkt vid ankomst analyserades proverna med avseende på mikrobiologisk status (direkt utlägg vid 25 samt 37 °C) med hjälp av rutinmetoder tillgängliga vid SVA.

Från 11 av de mest mögelsvampkontaminerade proverna isolerades sporer av *Penicillium* spp och odlades på DG18 agar under 25°C i 7 dagar. För profilanalys av sekundära metaboliter ympades konidiesuspensionen på CYA plattor under 25°C i 7 dagar. Sporer av *Aspergillus* spp isolerades och odlades på malt extrakt agar (MEA) under 37°C i 5 dagar. För profilanalys av sekundära metaboliter ympades konidiesuspensionen på Czapek-Dox buljong i 37°C i 4 dagar. Sporodlingen utfördes för att undersöka mykotoxinproducerande förmåga av de mögelstammar som isolerats från svenskt majsensilage (inte alla *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp stammar är kapabla att producera mykotoxiner).

Kemiska undersökningar

Materialet torkades (vid 30 °C), maldes och extraherades med acetonitril/vatten (86:14, v/v). Isolaten från mikrobiologiska undersökningar extraherades direkt med acetonitril/vatten (86:14, v/v). Extrakten filtrerades och indunstades till torrhet under lågt tryck. För att undvika

förekomst av interfererande substanser tillämpades fastfasextraktionsmetoder med hjälp av Myco-/MultiSep kolonner.

Extrakten analyseras för förekomst av:

- fumonisiner B1 och B2 – ej i isolaten;
- ZON – ej i isolaten;
- roquefortine C, penitrem A (misstänkta neurotoxiner som kan produceras av *P. roqueforti*), penicillic acid och mycophenolic acid (MPA) (andra toxiska sekundära metaboliter av *P. roqueforti*);
- verruculogen, fumitremorgin C samt gliotoxin (neurotoxiner som kan produceras av *A. fumigatus*);

med hjälp av vätskekromatografi (HPLC) och i vissa fall denna teknik kopplade till masspektrometri (LC-MS/MS). För fumonisiner B1 och B2 samt ZON tillämpades ackrediterade HPLC-metoder uppsatta vid enheten för kemi, miljö och fodersäkerhet vid SVA. En LC-MS/MS multimetod utvecklades för en simultan analys av mykotoxiner roquefortine C, penitrem A, penicillic acid, MPA, verruculogen, fumitremorgin C och gliotoxin.

Statistisk analys

Syftet med den statistiska bearbetningen var att beskriva fynden av de kemiska analyserna av majsensilage som inkom i projektet, samt att undersöka om det föreligger några samband mellan fynd av mykotoxiner och olika tidpunkter för provtagning. Även samband med olika egenskaper hos ensilaget (mögelförekomst, lagringstyp och tillsats av ensileringsmedel) och förekomst av mykotoxiner undersöktes. Analysresultaten har statistiskt bearbetats med hjälp av beskrivande statistik och univariabla analyser (chi², Fisher's exact samt logistisk regression där hänsyn har tagits till att fler prover kommer från vissa producenter).

Resultat

Prover från projekt "Grovfodermajs – från odling till utfodring på mjölk- och köttdjursgårdar" (SLU Skara; skörd 2007-2008)

Bara i ett av de 30 proverna påvisades förekomst av *Penicillium*-mykotoxin roquefortine C, 130 µg/kg. Ingen statistisk analys kunde därför utföras.

Prover från skörd 2009

Totalt inkom 114 prover från 66 olika majsensilageproducenter. Från 34 av dessa inkom endast ett prov, 31 st sände in 2 prover varav 18 sände in ytterligare 1 prov. En producent sände in totalt 5 prover. Av de 31 som skickat in minst 2 prover var det 8 som skickade in 2 eller 3 prover vid 1:a provtagningstillfället.

Från endast 16 producenter inkom prov vid alla tilltänkta provtagningstillfällena.

Av de 114 proven som inkom hade 37 (32 %) lagrats i plansilo, 29 (25 %) i korv, 2 (2 %) i torn och en (1 %) på hårdgjord platta. För 45 (39 %) prover fanns ingen lagring angiven, varav 32 st togs vid skörd och således inte kunde ha någon lagring angiven.

Mikrobiologiska undersökningar

Signifikant fler av proverna som togs vid inläggning hade förekomst av Aspergillusvampar jämfört med prover som lagrats ($P < 0,01$; se tabell 1).

Tabell 1. Fynd av *Aspergillus* spp i majsensilage vid skörd respektive efter ensilering (direktodling vid 37 °C)

Provtagning	<i>Aspergillus</i> spp	
	ej påvisade	påvisade
Vid inläggning	4 (7 %)	28 (67 %)
Ensilerat	53 (93 %)	14 (33 %)
Total	57	42

I signifikant fler prover från majsensilage lagrat i plansilo kunde man vid direktodling vid 25° påvisa tillväxt av *Fusarium*- eller *Penicillium*svampar ($P < 0,01$; se tabell 2). Inga andra signifikanta samband kunde ses med lagringstyp och mögelförekomst.

Tabell 2. Mikrobiologiska fynd i majsensilageprover fördelat över lagringstyp (direktodling vid 25 °C)

Lagringstyp	<i>Fusarium</i> spp och/eller <i>Penicillium</i> spp		Total
	ej påvisade	påvisade	
Plansilo	11 (32 %)	23 (68 %)	34
Korv	21 (72 %)	8 (28 %)	29
Torn	0	2 (100 %)	2
Hårdgjord yta	1 (100 %)	0	1

Inga statistiska samband kunde ses mellan de olika provtagningstillfällena och fynd vid direktodling vid 25 °C eller 37 °C. I det här materialet kan man således inte säga att det är säkert att man kan påvisa samma fynd vid de olika provtagningstillfällena, d.v.s. bara för att man har hittat t.ex. *Penicillium* spp vid ett tillfälle behöver man inte göra det vid nästa.

Inga samband kunde påvisas mellan användning av ensileringsmedel och mögelförekomst, se tabell 3 och 4.

Tabell 3. Mikrobiologiska fynd i majsensilageprover vid direktodling vid 25 °C i prover där ensileringsmedel tillsats eller ej

Ensileringsmedel	<i>Fusarium</i> spp och/eller <i>Penicillium</i> spp		Total
	ej påvisade	påvisade	
Ja	13 (45 %)	16 (55 %)	29
Nej	20 (54 %)	17 (46 %)	37
Total	33 (50 %)	33 (50 %)	66

Tabell 4. Mikrobiologiska fynd i majsensilageprover vid direktodling vid 37 °C i prover där ensileringsmedel tillsats eller ej

Ensileringsmedel	<i>Aspergillus</i> spp		Total
	ej påvisade	påvisade	
Ja	23 (79 %)	6 (21 %)	29
Nej	29 (78 %)	8 (22 %)	37
Total	52 (79 %)	14 (21 %)	66

Kemiska undersökningar

I totalt 10 av de 114 inskickade majsensilageproverna kunde mykotoxiner påvisas (ZON, fumonisiner samt roquefortine C och MPA).

Mykotoxin ZON påvisades i ett och samma parti vid 1:a (vid inläggning) och 2:a provtagningen (vid öppnande av silo), 319 respektive 59 µg/kg.

Mykotoxiner fumonisiner B1+B2 påvisades i mycket låg halt i ett prov vid 1:a provtagningen (vid inläggning), 76 µg/kg.

Roquefortine C påvisades i 7 majsensilageprover (alla från 3:e provtagning), 30-1700 µg/kg.

MPA påvisades i 3 majsensilageprover (alla från 3:e provtagning), 100-2700 µg/kg.

De statistiska beräkningarna har gjorts enbart för roquefortine C och MPA (för litet underlag för ZON och fumonisiner); de fynden har slagits ihop till ”fynd av *Penicillium*-mykotoxiner” för att förbättra beräkningsförmågan. Som ses av tabell 5 är det endast i prover där *Penicillium* spp kunnat påvisas vid direktodling i 25 °C som man finner roquefortine C eller MPA. Man ser dock också att det inte alltid kunnat påvisas mykotoxiner trots att *Penicillium* spp kunnat påvisas vid direktodling i 25 °C. Inga signifikanta samband mellan fynd av *Penicillium* spp och fynd av mykotoxiner kunde påvisas.

Tabell 5. Fynd av *Penicillium* spp vid direktodling vid 25 °C samt fynd av *Penicillium*-mykotoxiner i lagrade majsensilageprover

Fynd av <i>Penicillium</i> -mykotoxiner	<i>Penicillium</i> spp		Total
	ej påvisade	påvisade	
Ja	0 (0 %)	7 (100 %)	7
Nej	9 (32 %)	19 (68 %)	28
Total	9 (26 %)	26 (74 %)	35

Ett signifikant samband mellan fynd av *Penicillium*-mykotoxiner och *Aspergillus* spp vid direktodling 37 °C kunde påvisas ($P < 0,005$; se tabell 6). Av tabell 6 resultat framgår det att i 71 % av proverna där *Penicillium*-mykotoxiner har påträffats har även *Aspergillus* spp påträffats, medan i 86 % av proverna där inte *Penicillium*-mykotoxiner har påträffats har inte heller *Aspergillus* spp påvisats, detta gör att det blir en statistisk signifikant skillnad. Vad som är förklaringen till denna koppling kan vi inte i dagsläget svara på och då materialet är relativt litet kan sambanden vara av mer slumpmässig natur än vad som man kan tro av p -värdena. Vid analysen har dock Fisher's Exact Test använts som gör det möjligt att analysera små material med godtagbar statistisk säkerhet.

Tabell 6. Fynd av *Aspergillus* spp vid direktodling vid 37 °C samt fynd av *Penicillium*-mykotoxiner i lagrade majsensilageprover

Fynd av <i>Penicillium</i> -mykotoxiner	<i>Aspergillus</i> spp		Total
	ej påvisade	påvisade	
Ja	2 (29 %)	5 (71 %)	7
Nej	24 (86 %)	4 (14 %)	28
Total	26 (74 %)	9 (26 %)	35

Inga signifikanta samband kunde påvisas mellan lagringstyp, användning av ensileringsmedel och fynd av *Penicillium*-mykotoxiner (tabell 7 och 8).

Tabell 7. Fynd av *Penicillium*-mykotoxiner i majsensilageprover fördelat över lagringstyp

Lagringstyp	<i>Penicillium</i> -mykotoxiner		Total
	ej påvisade	påvisade	
Plansilo	14 (74 %)	5 (26 %)	19
Korv	11 (92 %)	1 (8 %)	12
Torn	1 (50 %)	1 (50 %)	2
Hårdgjord yta	1 (100 %)	0	1
Total	27 (79 %)	7 (21 %)	34

Tabell 8. Fynd av *Penicillium*-mykotoxiner i majsensilageprover där ensileringsmedel tillsats eller ej

Fynd av <i>Penicillium</i> -mykotoxiner	Ensileringssmedel		Total
	ej tillsatt	tillsatt	
Nej	14 (52 %)	13 (48 %)	27
Ja	2 (29 %)	5 (71 %)	7
Total	16 (47 %)	18 (53 %)	34

Med syfte att studera mykotoxinbildande förmåga av i projektet påvisade mögelsvampar, isolerades sporer av *Penicillium* spp från 7 mest mögelsvampkontaminerade prover. Sporer av *Aspergillus* spp isolerades från 8 mest mögelsvampkontaminerade prover. 4 isolat innehåll sporer av både *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp. Enbart kvalitativ bestämning av mykotoxinerna utfördes för de isolaten (se tabell 9).

Tabell 9. Mykotoxinförekomst i sporisolat

Isolat från prov nr	Mykotoxiner producerade av <i>Penicillium</i> spp				Mykotoxiner producerade av <i>Aspergillus</i> spp		
	Penicillic acid	Roquefortine C	MPA	Pen A	Fum C	Ver	Glio
2954 ¹	-	påvisats	-	-	påvisats	påvisats	-
4491 ²					-	-	-
4762 ³	-	påvisats	-	-			
5276 ¹	-	påvisats	påvisats	-	påvisats	påvisats	-
5277 ³	-	påvisats	-	-			
5278 ²					påvisats	påvisats	-
5283 ¹	-	påvisats	-	-	påvisats	-	-
5298 ²					påvisats	påvisats	påvisats
5299 ²					påvisats	påvisats	-
5359 ³	-	påvisats	-	-			
5794 ¹	-	påvisats	-	-	påvisats	påvisats	-

1 – sporer av *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp

2 – endast sporer av *Aspergillus* spp

3 – endast sporer av *Penicillium* spp

Diskussion

1. Andel prover från 1:a provtagningen (vid inläggning) kontaminerade med *Aspergillus* spp mögelsvampar var 70 %, som markant avviker från andra jämförbara prover analyserade vid SVA utanför projektet, nämligen betydligt flera prover än vanligt var kontaminerade med *Aspergillus* spp. Det bedöms vara av betydelse för arbetsmiljön därför att sporer av *Aspergillus* spp mögelsvampar är kända och potenta allergener. En anledning kan vara att majskolvar bildar en mer skyddad och gynnsam miljö för tillväxt av olika mögelsvampar tack vare naturlig uppbyggnad av växten. Mer detaljerad undersökning av ev anledning(-ar) till den höga förekomsten av *Aspergillus* spp kontaminerade prover utfördes inom projektets ramar (planerades ej heller).
2. Andel prover kontaminerade med *Aspergillus* spp mögelsvampar sjönk statistiskt signifikant efter ensilering ($p < 0,01$, se tabell 1). Det bevisar att en rätt utförd ensileringsprocess verkar positivt på eliminering av *Aspergillus* spp mögelsvampar, vilket även demonstrerades i ett flertal tidigare studier.
3. Andel prover från 1:a provtagningen (vid inläggning) kontaminerade med *Fusarium* spp mögelsvampar var 70 %, vilket överensstämmer med andra likvärdiga prover analyserade vid SVA utanför detta projekt. Det bör påpekas att ett flertal mykotoxiner kan bildas av *Fusarium* spp. Förekomst av några av dem – nämligen deoxynivalenol, ZON, ochratoxin A, T-2 och HT-2 och fumonisiner – regleras via europeisk lagstiftning ([Kommissionens rekommendation av den 17 augusti 2006](#)). Det är därför önskvärt att regelbundet kontrollera förekomst av de fusariemykotoxinerna med en

lämplig teknik (förutom mer sofistikerade HPLC-baserade metoder finns nuförtiden det enkla snabbmetoder för screening av t.ex. deoxynivalenol).

4. Andel prover från 1:a provtagningen (vid inläggning) kontaminerade med *Penicillium* spp mögelsvampar var 20 %, vilket är relativt låg jämfört med andra likvärdiga prover analyserade vid SVA utanför projektet.
5. Majsensilageprover lagrade i plansilo var i betydligt högre grad (statistiskt säkerställt, $p < 0,01$) kontaminerade med *Penicillium* och/eller *Fusarium* spp mögelsvampar jämfört med andra lagringstyper (se tabell 2). Den observationen belyser ev svårighet att säkra optimalt fortskridande av ensileringsprocessen för majsensilage lagrat i plansilo (t.ex. syre blir kvar i miljön), vilket bör tas i beaktande och hanteras på ett lämpligt sätt om det är omöjligt att använda andra lagringstyper. En rekommendation är att analysera majsensilaget efter att plansilon öppnas för förbrukning med avseende på mögelflora.
6. Samband mellan användning av ensileringsmedel och mögelförekomst kunde ej påvisas, se tabell 3 och 4. Med underlag från det projektet går det följaktligen inte att betrakta ensileringsmedel som ett fungerande verktyg för eliminering av mögelsvampar. Andra faktorer kan spela större roll för att säkerställa att inga mögelsvampar finns i ensilerat majs.
7. Två mykotoxiner producerade av *Penicillium* spp mögelsvampar – roquefortine C och MPA – kunde påvisas i 7 majsensilageprover som var kontaminerade med *Penicillium* spp mögelsvampar (se tabell 5). Den observationen är helt i linje med tidigare studier som visat att mykotoxinerna roquefortine C och MPA kan produceras av enbart *Penicillium* spp mögelsvampar. Det bör framhållas att de mykotoxinfyndningen gjordes bara i prover från provtagning 3, d.v.s. efter att ensileringen avslutats och ensilaget var inte lika skyddat från miljön som under ensileringen. De *Penicillium*svampar som fanns i majsensilaget vid inläggningen (alternativt tillfördes till ensilaget från miljön på ett annat sätt) kunde troligen då börja växa igen och som resultat bilda sekundära metaboliter, inklusive de med toxiska egenskaper, d.v.s. mykotoxiner. En rekommendation är att fortsätta skydda majsensilaget även efter att ensileringen avslutats för att minimera risken för tillväxt av mögelsvampar och eventuell medföljande bildning av mykotoxiner.
8. Inte alla majsensilageprover kontaminerade med *Penicillium* spp innehåll något eller några av de *Penicillium*mykotoxinerna (se tabell 5). Sju *Penicillium*sporisorat av de 7 testade hade dock förmågan att bilda de *Penicillium*mykotoxinerna (se tabell 9). Sju *Aspergillus*sporisorat av de 8 testade hade förmågan att bilda de *Aspergillus*mykotoxinerna (se tabell 9). De observationerna bekräftar teorin att inte alla *Penicillium* spp och *Aspergillus* spp stammar är kapabla att producera mykotoxiner. Vidare forskning (t.ex. baserad på molekylärbiologiska metoder) är önskvärd för att bedöma vilka stammar som kan bilda de mykotoxinerna samt för att sätta upp moderna metoder som skulle påvisa förekomst av de potentiellt farliga mögelsvamparna.
9. Mykotoxin ZON påvisades i ett och samma parti vid 1:a (vid inläggning) och 2:a provtagningen (vid öppnande av silo), 319 resp 59 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Detta kan jämföras med riktvärde på 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (för foder med en vattenhalt på 12 %) i tillskottsfoder och helfoder för kalvar, mjölkboskap, får (inklusive lamm) och getter (inklusive killingar) enligt [Kommissionens rekommendation av den 17 augusti 2006](#).
10. Mykotoxiner fumonisiner B1+B2 påvisades i mycket låg halt i ett prov vid 1:a provtagningen (vid inläggning), 76 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Detta kan jämföras med riktvärde på 60 000

µg/kg (för foder med en vattenhalt på 12 %) i majsbaserade foderråvaror enligt [Kommissionens rekommendation av den 17 augusti 2006](#).

11. Inga gräns-/riktvärden finns tillgängliga för roquefortine C och MPA, vilket gör det svårt att bedöma om de halterna innehar någon fara för djurhälsa eller inte. Mer utförlig toxikologisk bedömning behövs för att kunna diskutera de detekterade halterna.
12. Generellt, mykotoxiner är mycket heterogent fördelade substanser i foder/foderråvaror. För att kunna analysera och jämföra analysresultat från olika provtagningsplatser och kunna fatta ett beslut om att utfodra ett kontaminerat material eller inte är det mycket önskvärt att en effektivt och statistiskt säkert provtagningsförfarande utarbetas och enhetligt tillämpas på alla relevanta provtagningsplatser.
13. Det avslutade projektet är första kartläggande projekt gällande mykotoxinförekomst i svenskt majsensilage. De utförda statistiska analyserna är baserade på ett begränsat antal majsensilageprover med positiva fynd av mykotoxiner och slutsatserna bör därför begränsas enbart till de prover som ingick i projektet. Projektet har dock skapat en utmärkt utgångspunkt för vidare planering av framtida undersökningar kring ev förekomst av mykotoxiner i majsensilage producerat under svenska förhållanden samt dess betydelse för djur-/humanhälsa.

Publikationer/Resultatförmedling

- Solyakov A. 2010. Förekomst av mykotoxiner i majsensilage (SLF-projekt). NOVA majsworkshop "Forage Maize in the Nordic Countries" vid Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap, SLU Umeå, 15-16 februari 2010 (muntlig presentation, se på <http://www.slu.se/en/faculties/nl/about-the-faculty/departments/department-of-agricultural-research-for-northern-sweden/publications/earlier-seminarsworkshops-etc/forage-maize-in-the-nordic-countries/>)
- Karlsson M. 2010. Occurrence of mould and mycotoxins in Swedish maize silage – a pilot study. Uppsala Universitet, Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Biomedicinska analytikerprogrammet, Examensarbete 15 hp C-nivå, VT 2010
- Tevell Åberg A., Stepinska A., Nyman A., Solyakov A. and Bondesson U. 2011. Analysis of Neurotoxic Mycotoxins in Maize Silage with LC/MS. The 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, 5-9 juni 2011 (poster)
- Solyakov A., Tevell Åberg A., Stepinska A., Nyman A. and Bondesson U. 2011. Occurrence of *Penicillium* and *Aspergillus* Mycotoxins in Maize Silage. Gordon Research Conference "Mycotoxins and phycotoxins", Colby College, Waterville, ME, USA, 19-24 juni 2011 (poster)

Litteratur

- Auerbach H., Oldenburg E. and Weissbach F. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 565-72.
- Axelsson V. 2006. Evaluation of neurotoxic properties of gliotoxin, Doctoral thesis in Neurochemistry at Stockholm University, Sweden.

- Borreani, G. and Tabacco, E. 2005. The effects of a new plastic film on the microbial and fermentation quality of Italian ryegrass bale silages. In: Silage Production and Utilization. Proceedings of the XIVth International Silage Conference, Belfast, Northern Ireland, 2005, p.193. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands.
- Boysen M., Jacobsson K-G. and Schnürer J. 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (4), 1523-6.
- Buckley T.C. 2003. Coping with mycotoxin contamination: protecting equine performance and health. In: Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings Alltech's 19th Annual Symposium. Nottingham University Press, pp. 433-7.
- Dos Santos V.M., Dorner J.W. and Carreira F. 2002. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia* **156**, 133-8.
- Filtborg O., Frisvad J. C. and Samson R. A. 2000. Specific associations of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In: Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C. and Filtborg O. (eds.): Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holland. s. 306-320.
- Frevel H-J., Engel G. and Teuber M. 1985. Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. *Milchwissenschaften* **40**, 129-32.
- Gilmour JS, Inglis DM, Robb J, Maclean M. 1989. A fodder mycotoxicosis of ruminants caused by contamination of a distillery by-product with *Aspergillus clavatus*. *Vet Rec.* **124** (6), 133-5.
- Hägglom P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. *Appl Env Microbiology* **56** (9), 2924-6.
- Kellerman TS, Pienaar JG, van der Westhuizen GC, Anderson GC, Naude TW. 1976. A highly fatal tremorgenic mycotoxicosis of cattle caused by *Aspergillus clavatus*. *Onderstepoort J Vet Res.* **43** (3), 147-54.
- Land CJ, Lundstrom H, Werner S. 1993. Production of tremorgenic mycotoxins by isolates of *Aspergillus fumigatus* from sawmills in Sweden. *Mycopathologia* **124** (2), 87-93.
- Müller, C.E., Pauly, T. and Udén, P. 2006. Storage stability of small bale silage and haylage- influence of storage period and rebaling procedure on chemical, biochemical and microbiological variables. Submitted to Grass and Forage Science.
- Möller K., Klaesson T. and Lingvall P. 1999. Correlation between colour and temperature of LDPE stretch film used in silage bales. Proceedings of the XIIth International Silage Conference, Uppsala, Sweden, 1999, pp. 251-252. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Nout, M. J. R., Bouwmeester, H. M., Haaksma, J., and H. van Dijk. 1993. Fungal growth in silages of sugarbeet pulp and maize. *J Agric Sci Camb* **121**, 323-326.
- Nyman, A-K. 2007. Epidemiological studies of risk factors for bovine mastitis. Doctoral Thesis No. 2007:80, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, SLU, Uppsala.
- Pier, A. C., Richard, J. L. and S. J. Cysewski. 1980. Implications of mycotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Assoc* **176** (8), 719-24.
- Schneweis, I, Meyer, K, Hörmansdorfer, S and J Bauer. 2000. Mycophenolic Acid in Silage. *Appl Environ Microbiol* **66** (8), 3639-3641.
- Scudamore K.A. and Livesey C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* **77**, 1-17.
- Statens Jordbruksverks Rapport 2007:16.
- Sumarah, M. W., Miller, D. J., and B. A. Blackwell. 2005. Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* and *P. crustosum* isolated in Canada. *Mycopathologia* **159**, 571-577.

- Wagener R.E., Davis N.D. and Diener E.L. 1980. Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *App. Environ. Microbiol.* **39**, 882-7.
- Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Higurashi H, Ochiai E, Hashimoto Y, Nishimura K. 2004. Cytotoxic substances from *Aspergillus fumigatus* in oxygenated or poorly oxygenated environment. *Mycopathologia* **158** (1), 1-7.
- Wenehed V., Solyakov A., Thylin I., Häggblom P. and Forsby A. 2003. Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. *Food Chem Toxicol* **41** (3), 395-403.
- Yamazaki M, Fujimoto H, Kawasaki T. 1980. Chemistry of tremorogenic metabolites. I. Fumitremorgin A from *Aspergillus fumigatus*. *Chem Pharm Bull* **28** (1), 245-54.