

Slutrapport projekt H1047026: Svampflora och förekomst av mykotoxiner i inplastat vallfoder för hästar

Huvudsökande och rapportförfattare: AgrD Cecilia Müller, Inst. för husdjurens utfodring och vård, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala. Cecilia.Muller@slu.se

Bakgrund, syfte och frågeställningar

Det generella syftet med detta projekt var att kartlägga förekomsten av mögelsvamp och mykotoxiner i inplastat vallfoder (hösilage) som används för utfodring av hästar i Sverige och Norge, samt att identifiera faktorer som leder till förekomst av mögel och mykotoxiner i inplastat vallfoder. Dessutom planerades en jämförelse mellan en molekylärbiologisk analysmetod (pyrosekvensering) och konventionell mikrobiologisk odling inkluderande identifiering av mögelarter via PCR-sekvensering av DNA, i syfte att utvärdera lämplighet hos molekylära analysmetoder för detektion och identifiering av relevanta svamparter i inplastat vallfoder. Detta för att på sikt få fram snabbare och billigare analyser av vilka mögelarter som förekommer i vallfoder, då sådan information sannolikt är mer relevant än totalantal mögel, vilket är ett vanligt ”kvalitetsmått” i dagsläget.

De specifika frågeställningarna var:

- 1) Vilka mögelsvampar förekommer i hösilage som används till hästar, och i vilka mängder?
- 2) Vilka mykotoxiner (aflatoxin B1, B2, G1, G2; ochratoxin A; gliotoxin; fumonisin B1, B2; deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), T2 och HT-2) förekommer i hösilage till hästar, och i vilka mängder? Är förekomst av dessa mykotoxiner korrelerade till förekomst av synlig/icke-synlig mögeltillväxt i fodret?
- 3) Vilka faktorer under produktion, lagring, hantering och utfodring av hösilage till hästar leder till förekomst av mögel och/eller mykotoxiner i fodret?
- 4) Kan hälsostörningar hos hästar korreleras till förekomst av mögelsvampar/ mykotoxiner i vallfodret, och i sådana fall vilka hälsostörningar och vilka mögelsvampar/mykotoxiner?

Material och metoder

Provtagning och provpreparering

Under det första året av projektet provtogs inplastat vallfoder enligt beskrivning i ansökan, dvs från 25 häststall i Sverige och 25 häststall i Norge (figur 1). I samband med provtagningen togs även olika mått på plasten runt balarna, andel svamp på balytan registrerades och täthetsmätning enligt Spörndly *et al.* (2008) av de balar som sedan provtogs utfördes, samt en intervju med vallfoderproducenten som fick besvara en enkät med frågor om hur fodret producerats och lagrats (tabell 1). Data från besvarade enkäter och analysresultat bearbetades statistiskt. I projektet inkluderades även prov och data från provinsamling i ett annat projekt (SLF, projektnr H0947219), i enlighet med vad som beskrevs i ansökan. Under hösten 2012 och våren 2013 har proverna preparerats för pyrosekvensering (454-sekvensering) vilken dock ännu ej har kunnat genomföras, då vi inväntat andra projektprover för att erhålla lägsta möjliga pris på analysen (utförs av externt laboratorium). Tester av primers har dock utförts (Ihrmark *et al.*, 2012), vilket varit en nödvändighet för såväl PCR-sekvensering av mögelisolat som för 454-sekvensering. Vi räknar med att kunna få pyrosekvenseringen genomförd under hösten/vintern 2013, vilket tillsammans med arbetstiden som behövs för den bioinformatiska tolkningen av analysvaren kommer att förbruka kvarvarande medel i projektet.



Figur 1. Provtagningsplatser i Sverige och Norge år 1 och 2, 124 gårdar sammanlagt. En punkt representerar en provtagningsplats (gård).

Detektion och karaktärisering av mögelarter

Mögel analyserades på tre olika sätt: i) synlig koloni på balens yta via direktutlägg på agarplatta (kvalitativ); ii) direktutlägg på agarplatta av borrhade prov (kvalitativ); iii) spädningsserie på agarplatta (kvantitativ och kvalitativ). Alla kolonier identifierades via sina makro- och mikromorfologiska karaktärer med hjälp av nycklar: *Aspergillus* enligt Klich (2002) och *Penicillium* enligt Pitt (2000), samt resterande kolonier enligt Samson *et al.* (2010). Arterna verifierades via PCR-sekvensering enligt följande: små delar av mögelkolonierna från omympade renkulturer användes för DNA-extrahering enligt Stewart och Via (1993). Extraherat DNA användes för PCR-sekvensering där sekvensamplifieringen utfördes i en total volym av 50 µl innehållande de slutgiltiga koncentrationerna av 50 ng templatDNA, 137.5 mM MgCl₂, 2 mM av varje deoxynukleosidtrifosfat, 10 µM av två primers och 1.25 U DreamTaq™ DNA polymeras (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) med inkluderande reaktionsbuffert. Alla reagenser mixades och värmdes enligt följande: 94°C i 5 min, 35 cykler av amplifiering (94°C i 30 sekunder, 55°C i 30 sekunder och 72°C i 30 sekunder) följt av 72°C i 7 minuter. Mögelisolat tillhörande släktet *Fusarium* amplifierades i EF (elongation factor)-1α-regionen enligt O'Donnell *et al.* (1998), medan isolat från släktena *Aspergillus* och *Penicillium* amplifierades i β-tubulin-regionen enligt Glass and Donaldson (1995). Okända mögelisolat amplifierades i ITS-regionen (White *et al.*, 1990; Gardes och Bruns, 1993). Mögelamplikonerna sekvenserades på båda hållen och de två resulterande sekvenserna komponerades i SeqMan 8.1.2 (DNASar Lasergene, Madison, Wisconsin, USA). GenBanks databas på NCBI's hemsida, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, användes för att jämföra mögelisolatsekvenserna med tidigare rapporterade sekvenser, med hjälp av BLASTN algoritm (Altschul *et al.*, 1997). På så sätt konfirmerades den identifieringen av mögelarterna som gjordes på morfologisk karaktär vid den mikrobiologiska odlingen.

Det laborativa arbetet med de mikrobiologiska analyserna och tolkningen av data från PCR-sekvenseringen har tagit upp stora delar av projekttiden. Detta har resulterat i ett stort informationsbibliotek som behövs för vidare tolkning av data, t ex för jämförelsen mellan resultat från mikrobiologisk odling (inklusive PCR-sekvensering av isolat) och pyrosekvensering av svamp-DNA direkt från foderproverna. Informationsbiblioteket kan även användas framöver i andra studier av mögelsvampar likväl som vid rutinmässig analys av mögelförekomst i foder (om DNA-sekvensering utförs).

Tabell 1. Frågor som ställdes under intervju med foderproducenten, samt svarsresultat

Egenskap	Andel gårdar i % (och antal)	Egenskap	Andel gårdar i % (och antal)
Baltyp		Typ av förtorkning (n=115)	
Små rundbalar	3 % (4)	Bredspridet	55 % (63)
Stora rundbalar	65 % (81)	I sträng	45 % (52)
Små fyrkantsbalar	5 % (6)	Antal plastlager (n=123)	
Mellanstora fyrkantsbalar	13 % (16)	6	15 % (19)
Stora fyrkantsbalar	9 % (11)	8	47 % (58)
Dubbelbal, fyrkantsbalar	3 % (4)	10	12 % (15)
Annan typ	2 % (2)	12	9 % (11)
Plastfärg		14	7 % (9)
Vit	95 % (118)	≥16	9 % (11)
Grön	5 % (6)	Skördenummer (n=120)	
Lagring av balar (n=109)		1 ^a skörd	73 % (88)
Sand/grus	27 % (29)	2 ^a skörd	23 % (27)
I fält (gräs)	60 % (65)	3 ^e eller 4 ^e skörd	4 % (5)
På pall	5 % (5)	Skördetid (n=110)	
Hårdgjord yta	9 % (10)	Sen 1a eller 2 skörd	98 % (107)
Lagringshöjd (n=112)		Sen 1a skörd	3 % (3)
1 lager	13 % (15)	Väder vid skörd (n=116)	
2 lager	32 % (36)	Soligt	70 % (81)
3 lager	39 % (44)	Regnigt	11 % (13)
≥4 lager	15 % (17)	Molnigt	19 % (22)
Synliga plastskador (n=123)		Vallålder (n=111)	
ja	16 % (20)	≤1 år	18 % (20)
nej	84 % (103)	2 år	16 % (18)
Vallen gödslad med (n=116)		3 år	26 % (29)
NPK eller N ¹⁾	51 % (59)	4 år	17 % (19)
Stallgödsel	20 % (23)	≥5 år	23 % (25)
Inget	23 % (27)	Balarna skyddas med nät under lagring	
Annat (t ex pressvatten, fruktsaft etc)	6 % (7)	ja	11 % (14)
Tid mellan pressning och inplastning (n=117)		Slätterkross (n=116)	
<1h	85 % (100)	Ja	99 % (115)
1-3 h	10 % (12)	Stubbhöjd vid slätter (n=112)	
Samma dag	4 % (5)	<8-3 cm	43 % (48)
Förtorkningstid (n=114)		8-10 cm	21 % (24)
≤1 dag	23 % (26)	>10 cm	36 % (40)
2 dagar	39 % (44)		
3 dagar	23 % (26)		
≥4 dagar	16 % (18)		

¹⁾ NPK= kväve, fosfor och kalium

Mykotoxinanalyser

Under våren 2013 analyserades 100 av proverna för innehåll av mykotoxiner vid Danish Technical University i Århus, Danmark, där mycket god kompetens för analys av svampmetaboliter i foder finns. Efterhand som mögelsammansättningen i proverna blivit känd, har några av de i ansökan angivna mykotoxinerna selekterats bort och ersatts av analys av andra mer relevanta mykotoxiner. Det har också framkommit under projekttiden att det finns större svårigheter än väntat att till rimliga kostnader analysera några av de ursprungligen tänkta mykotoxinerna (pga att matrisen är komplicerad och ger ett alltför lågt utbyte av vissa mykotoxiner). Ny forskning har också tillkommit under perioden som påvisat att vissa mykotoxiner (t ex mykofenolsyra) sannolikt är av mindre intresse, och dessa har då valts bort. De mykotoxiner som selekterades bort var: aflatoxiner, ochratoxin A, mykofenolsyra och fumonisiner. De ersattes av analys av patulin, 15-acetyl-deoxynivalenol (15ACDON), alternariol, zearalenon, beauvericin och enniatin B. Analys av mykotoxiner utfördes enligt beskrivning av Rasmussen *et al.* (2010).

Analys av kemisk sammansättning och näringsinnehåll

Proverna analyserades för kemisk sammansättning och näringsinnehåll. Torrsubstanshalten bestämdes efter torkning i 103°C i 20 timmar och askhalten efter 3 timmar i 550°C. Den organiska substansens smältbarhet bestämdes med VOS-metoden (Lindgren, 1979 korr. 1983). Råproteinhalten bestämdes med Kjeldahlmetoden (Bremner och Breitenbeck, 1983). Innehållet av växtfibrer (NDF, neutral detergent fiber) bestämdes enligt Chai och Udén (1998). För analys av pH, ammoniak-kväve och fermentationsprodukter framställdes en vätskefas genom att blanda ett otorkat prov med destillerat vatten (1:1), frysa det och pressa det efter att det tinats. I vätskefasen mättes pH med glaselektrod, halten ammoniak-N med Kjeltec Auto System 1020 (Foss, Höganäs, Sweden) och mängden mjölksyra, ättiksyra, propionsyra, bärnstenssyra, etanol och 2,3-butandiol med HPLC (Andersson och Hedlund, 1983).

Resultat och diskussion

På grund av det begränsade utrymmet för den skriftliga rapporteringen kan alla resultat i studien inte redovisas här. De viktigaste resultaten presenteras därför i denna rapport, och för ytterligare resultat hänvisas till kommande avhandling och vetenskapliga publikationer.

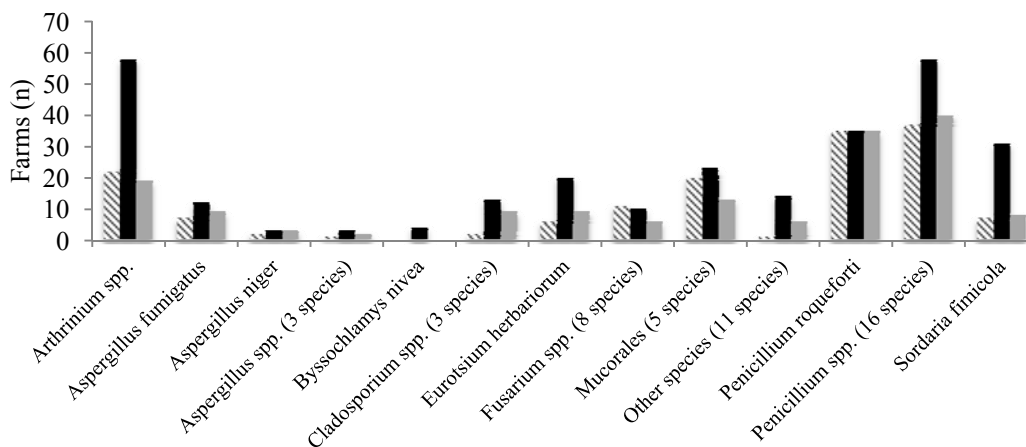
Resultaten visade att mögelarter tillhörande släktet *Penicillium* spp. var vanligt förekommande i foderproverna (figur 2). Av de 50 svenska gårdarna som var med i projektet under 2011 förekom synligt mögel i de provtagna balarna på 20 av gårdarna (40 %). I Norge förekom under 2011 synligt mögel i de provtagna balarna på 9 av 25 gårdar (36 %). Totalt fanns det alltså synligt mögel på öppnade balar på 29 av gårdarna (39 %) under 2011. Under år 2010 (de redan befintliga proven från studie H0947219) fanns det synligt mögel i fodret på 28 av 49 gårdar (57 %). När resultaten från båda åren räknas samman förekom synligt mögel på 57 av 124 gårdar (46 %). Den mest frekvent förekommande synliga mögelsvampen i fodret under 2011 identifierades som *Penicillium roqueforti*, vilken fanns på sju gårdar i Sverige (14 %) och på sex gårdar i Norge (24 %). Motsvarande resultat framkom även under 2010, då *P. roqueforti* fanns som synligt mögel i fodret på 17 av 49 svenska gårdar (35%). Utöver *P. roqueforti* påvisades under 2010 och 2011 även andra *Penicillium*-arter i fodret, samt arter tillhörande *Arthrimum* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. och *Mucorales* spp. (figur 2). Förekomst av *A. fumigatus* och olika *Penicillium*-arter i inplastat vallfoder har tidigare påvisats i både norska (Skaar, 1996) och irländska studier av ensilage med lägre torrsubstanshalt än i denna studie (O'Brien, 2007;

O'Brien *et al.*, 2008).

Mykotoxinanalysen påvisade att ett eller flera mykotoxin fanns i 40 av 100 prov (40 %). Av dessa fanns det ett av de analyserade mykotoxinerna i 27 prov (27 %), två av de analyserade mykotoxinerna i 10 prover (10 %) och tre av de analyserade mykotoxinerna i tre prov (3 %). Fler än tre mykotoxiner återfanns inte i samma prov. Det kvantitativa innehållet av de olika mykotoxinerna redovisas i tabell 2. Mykotoxinerna alternariol, beauvericin, DON, 15-ACDON, enniatin B, HT-2, T-2, nivalenol och zearalenon associeras vanligen till fältfloran av mögelsvampar, dvs dessa metaboliter förekommer i fodret redan innan skörd (Scudamore och Livesey, 1998; Rasmussen *et al.*, 2010). Alternariol produceras av *Alternaria* spp., beauvericin bildas av bl a *Fusarium*-arter liksom DON, 15-ACDON, enniatin B, HT-2, T-2, nivalenol och zearalenon, medan gliotoxin som bildas av *Aspergillus*-arter och patulin som bildas av t ex *Penicillium* spp. och *Byssochlamys nivea* istället är relaterade till lagerskademögel (Scudamore och Livesey, 1998; Rasmussen *et al.*, 2010).

På ungefär 40 % av gårdarna förekom synligt mögel i fodret. Motsvarande andel gårdar hade även mykotoxinförekomst i fodret, men det var inte nödvändigtvis samma gårdar. Mykotoxiner påvisades i foder både med och utan mögelförekomst. Detta kan bland annat förklaras av att de organismer som bildat mykotoxinerna inte nödvändigtvis är aktiva vid provtagningstillfället eller går att odla i laboriemiljö (Clarke, 1988). Det är också detta som gör det svårt att använda mikrobiologisk odling av mögelsvamp som parameter för hygienisk kvalitet i foder eller för riskbedömning för mykotoxinförekomst.

Ytterligare ett resultat som är intressant, kanske framförallt ur ett rådgivnings- eller resultatförmedlingsperspektiv, var att enkätsvaren beträffande ”om hygienfel förekommit i fodret” så gott som alltid var ”nej”, medan provtagaren upptäckte hygienfel på knappt hälften av de öppnade balarna vid provtagningen. Detta kan bero på slumpen, dvs att just de balar som valts ut för provtagningen hade synlig tillväxt av mögel, men det kan också påvisa att det finns behov av att sprida ytterligare information till producenter och användare av vallfoder i såväl ord som bild om vad som räknas som hygienfel i foder och hur mögeltillväxt i foder ser ut.



Figur 2. Mögelarter funna i foderprov från 124 gårdar i Sverige och Norge under 2010 och 2011. Frekvensen (x-axeln) utgör antalet gårdar där respektive mögelart identifierats. Tre olika metoder för mögelanalys användes (streckad stapel = direktutlägg av synliga kolonier på balens yta, svart stapel = direktutlägg av borrade prov, grå stapel = spädningsserie av borrade prov), men dessa gav inte samma resultat.

Korrelationer mellan variabler som beskriver produktion/lagring av ensilage- och hösilagebalar och mögel- eller mykotoxinförekomst, samt mellan fodrets kemiska sammansättning och mögel- eller mykotoxinförekomst, har beräknats och presenteras i tabell 3. Vilka variabler som påverkade mögelförekomsten var något olika för de olika metoderna att analysera mögel. För metod i) (direktutlägg av synliga kolonier på ytan av balen) var högre latitud, kortare uppmätt täthetstid, högre torrsubstanshalt och pH-värde i fodret och bredspridning av fodret vid förtorkning faktorer som alla var relaterade till mögelförekomst. För metod ii) (direktutlägg av material från borrade prov), var mögelförekomst relaterad till högre ts-halt, sen skörd samt om proverna kom från Sverige (lägre risk för mögelförekomst i norska prov). För metod iii) (spädningsserier av proverna och därmed även kvantitativ bestämning av antalet CFU mögel/g), var ökande mögelförekomst relaterad till år (2010 var mögelförekomsten större än 2011), ökande ts-halt, mindre än 10 lager sträckfilm, samt högre innehåll av ättiksyra och etanol i fodret (Tabell 3). Den faktor som gav samma utslag för alla tre metoderna var ts-halt; ju högre ts-halt, desto högre risk för mögelförekomst och desto mer mögel i fodret. Inga säkerställda korrelationer mellan förekomst av mykotoxiner och produktionsvariabler eller kemisk sammansättning förelåg, inte heller mellan förekomst av mykotoxiner och höga mögelhalter.

Tabell 2. Innehåll av olika mykotoxiner ($\mu\text{g}/\text{kg}$) i hösilage provtaget under 2010 och 2011 i fält på kommersiella gårdar $N=100$ (PATU = patulin, NIV = nivalenol, DON= deoxynivalenol, GLIO = gliotoxin, ALT = alternariol, ZEA= zearalenon, BEAU = beauvericin, ENN B =enniatin B). LOD = lower detection limits dvs lägsta detektionsgränsen i $\mu\text{g}/\text{kg}$

variabel	PATU	NIV	DON	15ACDON	GLIO	ALT	HT-2	T-2	ZEA	BEAU	ENN B
Förekomst i antal prov	Nd	Nd	12	2	2	8	4	3	1	10	14
LOD	371	122	20	35	41	10	5	8	5	10	10
Medelvärde av positiva prover ¹	.	.	238	179	51	212	35	9	8	248	56
standardavvikelse ¹			134,7	154,1	9,2	501,7	28,8	1,5	0	376,8	83,9
Maxvärde	.	.	479	288	57	1452	78	11	8	988	283
Minsta värde			69	70	44	11	19	8	8	11	10

¹medelvärdet och standardavvikelse har beräknats endast från prover innehållande värden ovan detektionsgränsen. Värden under detektionsgränsen har bortsetts från i denna sammanställning.

Slutsatser – nyttan med råd till näringen

Resultaten i detta projekt föranleder följande slutsatser:

- Torrsubstanshalten i fodret har stor inverkan på risken för mögelförekomst. Ju högre torrsubstanshalt desto större risk för mögelförekomst.
- Att få balarna så täta som möjligt är viktigt för att motverka mögelförekomst. Detta uppnås bl a genom att applicera minst tio lager plast på hösilagebalar, särskilt om de har skördats i ett sent botaniskt utvecklingsstadium och med hög ts-halt (över ca 60-65%).
- Mykotoxiner kan förekomma i inplastat vallfoder, men i nuläget är det okänt vilka faktorer som medför mykotoxinbildning. Fortsatta undersökningar är därför påkallade.

Tabell 3. Korrelationer mellan variabler (klassindelade och kontinuerliga) för balproduktion samt fodrets sammansättning och förekomst av mögel i fodret. Mögelförekomsten analyserades med tre olika metoder (i, ii) och iii)

Metod	Variabel	P-värde	Effekt-riktning
Direktutlägg av synliga kolonier (i)	Latitud*	P<0.001	Högre risk för mögelförekomst vid högre latituder.
	Baltäthet ^a	P<0.03	Högre risk för mögelförekomst vid kort täthetstid (<10 sek)
	Torrsubstanshalt*	P<0.03	Högre risk för mögelförekomst vid högre torrsubstanshalt.
	pH*	P<0.005	Högre risk för mögelförekomst vid högre pH.
	Behandling vid förtorkning ^b	P<0.01	Högre risk för mögelförekomst vid breddspridning
Direktutlägg av borrade prov (ii)	År ^c	P<0.03	Högre risk för mögelsvampförekomst 2010.
	Torrsubstanshalt*	P<0.001	Högre risk för mögelförekomst vid högre torrsubstanshalt
	Land ^d	P<0.001	Högre risk för mögelförekomst i Sverige.
Spädningsserie för borrade prov (iii)	Skördenummer ^e	P<0.002	Högre risk för mögelförekomst vid sen skörd.
	År*	P<0.008	Ökad mögelförekomst år 2010.
	Skördenummer ^e	P<0.02	Ökad mögelförekomst vid sen skörd.
	Torrsubstanshalt*	P<0.01	Ökad mögelförekomst vid högre torrsubstanshalt
	Antal lager plastfilm ^f	P<0.02	Ökad mögelförekomst vid <10 lager plast
	Ättiksyrahalt*	P<0.04	Ökad mögelförekomst vid högre ättiksyrahalt
	Etanolhalt*	P<0.04	Ökad mögelförekomst vid högre etanolhalt

* Kontinuerlig variabel

^a Klassindelad variabel: 0=bibehållet undertryck <10s; 1=bibehållet undertryck 10-100s; 2≥ bibehållet undertryck >100s

^b Klassindelad variabel: 1=breddspridning; 2= strängläggning

^c Klassindelad variabel: 1= år 2010; 2= år 2011

^d Klassindelad variabel: 1=Sverige; 2=Norge

^e Klassindelad variabel 1= första skörd; 2= andraskörd eller senare

^f Klassindelad variabel: 1>9 lager; 2≤9 lager

Avvikelser från projektplanen

Efter att alla gårdsbesök med foderprovtagning genomförts och enkätsvar sammanställts konstaterades att inga hälsostörningar rapporterats, varför punkt 4 fick utgå. Antingen har inga hälsostörningar relaterade till fodret inträffat, eller så är sådana störningar klart underrapporterade. Det är från detta datamaterial inte möjligt att dra några slutsatser om vilket.

Ekonomisk redovisning för norsk del av projektet (ingen förändring sedan föregående lägesrapport)

Kostnader för provinsamling i Norge:

Flygresa, 6 resor (25 prov), flygbiljett samt hyrbil 5000 NOK/resa, 30 000 NOK
Kostnader för provförsändelser till Sverige, andra resor, 7000 NOK
Lön för A Johansen (provinsamling, planering, publicering (ca 105 h)), 110000 NOK
Summa **207 000 NOK**

Publikationer i projektet

- Schenck, J., Spörndly, R., Müller, C., Djurle, A., Jensen, D.F. 2010. Molecular methods for detection of fungi in haylage. *Proceedings of the 1st Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden*. pp. 83-85.
- Müller, C. 2012. Undersökning av svampflora och mykotoxiner i inplastat vallfoder för hästar. *Svenska Vallbrev*, Svenska Vallföreningen nr 1 Feb. 2012. pp. 1-2.
- Schenck, J., Müller, C.E., Spörndly, R. 2012. Composition of fungi in wrapped forages of high dry matter content in Sweden and Norway. *Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland, 2-4 July 2012*. University of Helsinki and MTT Agrifood Research Finland. pp. 334-335.
- Schenck, J., Müller, C., Spörndly, R. 2013. Methods for examining fungal prevalence in haylage. *Proceedings of the 4th Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden*. Report 287, Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. pp.43-47.
- Johansen, A. 2013. Hygienisk kvalitet av innplastade grovfoder til hest. *In: Husdyrforsøksmøtet 2013. Thon Hotel Arena 28-29 februar 2013 (ed. Brodin, J.), www.umb.no/husdyrforsoksmoter, ISBN: 978-82-7479-025-4, 397-400.*
- Ingeborg Bjørnstad Jensen, *Hygienisk kvalitet i høyensilage*. Masteroppgave 30 studiepoeng 2012, Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, Institutt for Husdyr- og Akvakulturvitenskap, 73 s.

Manuskript under bearbeiting:

- Schenck, J., Müller, C.E., Funck Jensen, D., Djurle, A., O'Brien, M., Johansen, A., Spörndly, R. 2013. Fungal species in wrapped forages with high dry matter content in Sweden and Norway. Skickas till tidskriften *Grass and Forage Science*.
- Schenck, J., Müller, C.E., Spörndly, R. 2013. Methods for examination of fungal prevalence in haylage. Skickas till tidskriften *Grass and Forage Science*.
- Schenck, J., Spörndly, R., Rasmussen, P.H., Müller, C.E. 2013/2014. Presence of selected mycotoxins in wrapped forages in Sweden and Norway. Skickas till vetenskaplig tidskrift, sannolikt *Grass and Forage Science*.

Resultatförmedling till näringen och andra berörda

- 28 februari 2012: Lunchföredrag om mögel i grovfoder för medlemmar i föreningen Ultuna Hästens vänner. Uppsala (Cecilia Müller).
- 23 april 2012: Kursavsnitt om foderkonservering och djurhälsa i kursen djurhälsa för husdjursagronomstudenter. Uppsala (Rolf Spörndly).
- 21 maj 2012: Kursavsnitt om fodersäkerhet i kursen Infektionssjukdomar för veterinärstudenter årskurs 4 och uppåt. Uppsala 21 maj 2012 (Rolf Spörndly).
- 22 juni 2012: C Müller inbjuden föreläsare till 6th European Workshop of Equine Nutrition i Lissabon, Portugal. Projektet nämndes såväl muntligt som skriftligt vid konferensen (Müller, C.E. 2012. Impact of harvest, preservation and storage conditions

on forage quality. *Forages and grazing in horse nutrition*. EAAP publication no 132. Wageningen Academic Publishers. pp. 237-253).

- 2 juli 2012: C Müller inbjuden föreläsare till *XVI International Silage Conference*, Hämeenlinna, Finland, 2-4 Juli 2012. Projektet nämndes såväl muntligt som i två artiklar i konferenspublikationen (Müller, C.E. 2012. Feeding silage and haylage to horses. *Proceedings of the XVI International Silage Conference*, Hämeenlinna, Finland, pp. 42-53, samt Schenck *et al.* 2012 listad ovan).
- 20 okt 2012: C Müller inbjuden föreläsare vid Stuteriveterinärföreningens årsmöte, Norrköping. Föreläsning om hygienisk kvalitet i vallfoder till hästar, projektet nämndes muntligt.
- 6 feb 2013: Lunchseminarium på Statens Veterinärmedicinska Anstalt om resultaten i projektet, ffa gällande förekomst av mögel. Föreläsningen hölls av Agronom Jessica Schenck, doktorand i projektet.
- 22 juli 2013: inbjuden föreläsare (C Müller) till *III International Symposium on Forage quality and conservation*, Campinas, Brasilien. Resultat från studien presenterades i såväl muntlig som skriftlig form (Müller, C.E. 2013. Feeding silage and haylage to horses. *Proceedings of the III International Symposium on Forage Quality and Conservation*, pp. 21-46).
- 22 aug 2013: Föreläsning om grovfoderhygien för Stig H-Akademien, Ultuna, resultat från projektet presenterades. Cecilia Müller. Deltagare: StigH-stipendiater, journalister, företrädare för travsportens organisationer.
- 12 sept 2013: Föreläsning om hygienisk kvalitet i grovfoder, Lövsta, Uppsala. Resultat från projektet presenterades av C Müller för Nordens djurskyddschefer som var på besök.
- Kursavsnitt i Jordbruksverkets kurs Företagsutveckling och Djurens välfärd för husdjursrådgivare, kontaktpersoner och djurskyddschefer vid länsstyrelserna. Uppsala 11-13 september 2012 (Rolf Spörndly, Inst. för husdjurens utfodring och vård, SLU, Uppsala).
- Projektpresentation Norsk Hestsenter: <http://www.nhest.no/Nyheter/2011/Juni/Sjekker-muggsopp-i-grovfor/>
- Projektpresentation SLU : <http://www.slu.se/sv/fakulteter/nl/om-fakulteten/institutioner/institutionen-for-skoglig-mykologi-och-patologi/kontakt/personliga-hemsidor/jessica-schenck/>

Fortsatt resultatförmedling pågår fortlöpande och vidare bearbetning av resultaten sker så fort alla analysresultat är klara. I skrivande stund föreligger tre manuskript till vetenskapliga artiklar, som fortsatt bearbetas och skickas till vetenskapliga tidskrifter, samt inkluderas i Jessica Schencks avhandling vid SLU under 2013/2014. Så snart denna slutrapport godkänts kommer projektet även att presenteras på www.hastsverige.se

Referenser

Altschul, S.F, Madden, T.L, Schäffer, A.A, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Andersson, R., Hedlund, B., 1983. HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Z. Lebensm. - Unters. Forsch.* 176, 440-443.

- Bremner, J.M., Breitenbeck, G.A. 1983. A simple method for determining ammonium in semi-micro Kjeldahl analysis of soil and plant materials using block digester. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 14, 905-913.
- Chai, W., Uden, P. 1998. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Science and Technology* 74, 281-288.
- Clarke, A.F. 1988. Mycology of silage and mycotoxicosis. In: Stark, B.A. och Wilkinson, J.M (Eds.) *Silage and health*. Chalcombe Publications, Marlow, UK. pp. 19-33.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Ihrmark, K., Bödeke, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol* 82 (3), 666-677.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- Lindgren E., 1979 (corr. 1983). Forage analysis-method descriptions for sampling and analysis [in Swedish]. Report 45. Research Information Centre, Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P.D. and Fuller, H.T., 2008. Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: predominant mould and yeast species and features of bales and silage. *Grass and Forage Science*, 63, 121–137
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044-2049.
- Pitt, J.I., 2000. *A laboratory guide to common Penicillium species*. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.
- Rasmussen, R.R., Storm, I.M.L.D., Rasmussen, P.H., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F. 2010. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 397, 765-776.
- Samson, R.A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. 2010. *Food and Airborne Fungi*. [CBS Laboratory Manual Series no. 2.] Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Skaar, I., 1996. Mycological survey and characterisation of the mycobiota of big bale grass silage in Norway, PhD thesis. Norwegian College of Veterinary Medicine, Norway.
- Spörndly, R., Nylund, R., Hörndahl, T., Algerbo, P-A. 2008. Handling round bale silage after stretch-film application. *Grassland Science in Europe vol 13*, pp. 681-683.
- Stewart, C.N., Via, L.E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14, 748-749.
- White, T.J., Bruns, T., Lee S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. New York: Academic Press.