

TILLVÄXT AV OLIKA STAMMAR AV *CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* OCH ANDRA *CLOSTRIDIUM*-ARTER I ENSILAGE MED HÖG TS-HALT

Rolf Spörndly, SLU, Institution för husdjurens utfodring & vård, Uppsala

Thomas Pauly, SLU, Institution för husdjurens utfodring & vård, Uppsala

Anders Christiansson, Svensk Mjölk, Lund

Daniel de Paula Sousa, University of São Paulo, College of Agriculture, Piracicaba, Brasil

Bakgrund

Mejeriindustrin upplever åter stora problem med mjölkråvara som inkommer till mejerierna förorenade med smörsyrabildande bakterier i sporform. Det har konstaterats att en kritisk punkt är förökning av klostridier (*Clostridium* spp.) i ensilage. När mjölkkor konsumerar ett ensilage med hög sporhalt går sporer ostörda genom matsmältningskanalen och återfinns i träcken och därmed även i miljön som omger djuren. Även om stora ansträngningar läggs på att rengöra spenarna vid mjölkkningsarbetet så är en hög halt av sporer i träcken associerat med hög halt i mjölken. Sedan 1990 har ett strukturerat forskningsarbete, syftande till åtgärder för att begränsa smörsyrabildande bakteriers tillväxt i ensilage, utförts. Man har trots sig ha problemet under relativt bra kontroll. När problem med sporhalt i mjölkråvaran åter kraftigt aktualiseras vintern 2005/06 kan orsaken sökas i ett av följande påstående avseende ensilageberedning: 1) Mjölkproducenterna följer inte rekommendationerna, eller 2) Det är fel på rekommendationerna. En undersökning rörande påstående 1) har utförts vid ett examensarbete vid inst. för HUV (Johansson, 2007). Avseende påstående 2) har indikationer inkommit som gör gällande att smörsyrasporer förekommer även i ensilage med hög ts-halt. De rådande rekommendationerna baseras på att vi tror oss veta att *Clostridium tyrobutyricum* och andra sporbildare hämmas mycket effektivt av höga TS-halter i ensilaget. Detta baseras på att vi i Sverige och på andra håll i många år gjort studier där vi tillsatt *Cl. tyrobutyricum* som en störflora för att testa effekten av olika åtgärder som påverkar klostridietillväxten, såsom bl.a. olika TS-halter. I samtliga fall sedan 1990 har man i Sverige då använt en och samma stam av *Cl. tyrobutyricum* som kallas av SLU "209" och av SMR "213".

Hypotesen i arbetet har varit att de rekommendationer som ligger till grund för att begränsa tillväxten av sporbildande bakterier genom att förtorka grönmassan kan vara fel då de till stora delar baseras på förhållanden som gäller en enskild stam av *Cl. tyrobutyricum*. I ensilage förekommer många olika stammar av *Cl. tyrobutyricum*, som troligtvis kan skilja sig åt vad gäller egenskaper som pH-tolerans och tolerans för låg vattenaktivitet (d.v.s. hög TS-halt).

Anders Christiansson vid Svensk Mjölks forskningsavdelning i Lund förfogar över en bakteriebank med ett stort antal inifrån bakterier som i de flesta fall har blivit isolerade från mjölkråvara eller ost mellan åren 1986 till 1992. 24 olika *Clostridium*-arter och -stammar har valts ut i det nedan beskrivna försöket där dessa sporer tillsattes ensamt eller i kombination med andra stammar till grönmassan strax före ensileringen.

Syftet har därför varit att jämföra ensilagens hygieniska kvalitet efter en kontaminering av grönmassan med ett antal olika *Clostridium*-arter och -stammar för att kunna ta reda på om den av oss hittills använda *Clostridium*-stammen (cocktail 1, Tab.1) utgjort en bra mätare för tillväxt av många vanligt förekommande clostridiestammar.

Material och metoder

En vall med ca 65% gräs (främst timotej och ängssvingel) och 35% rödklöver skördades i första (16 juni) och i andra skörd (11 sept. 2007) med en slätterkross. Grödan från varje skördetillfälle förtorkades på fält till ca 30% TS och ca 42% TS. Därefter hackades grön-

massan i en liten stationärhack (hackelselängd ca 50 mm). Dessa fyra olika grönmassepartierna homogeniserades var och en, vägdes sedan upp i 11 partier à 3 kg. Tio olika sporcocktails som vardera innehöll 1-3 *Clostridium*-stammar (se Tabell 1) tillsattes till de olika gräspartierna. Det elfte partiet utgjorde en obehandlad kontroll. Varje gräsparti ensilerades sedan i 3 små glasburkar (volym 1700 ml; Bild 1). Fyllmängden var för den lägre TS-halten ca 700 g och för den högre ca 570 g / burk. Totalt producerades 4 x 11 x 3 = 132 silor.

Under inläggningen togs 2 prov från varje grönmasseparti för analys av TS-halt (torkning vid 60°C i 18 tim., malning och sluttorkning vid 103°C i 5 tim.), vattenaktivitet (se nedan), aska (föraskning vid 550°C i 3 tim.), råprotein (Kjeldahl-kväve x 6,25), socker (SLL-method nr.22, Larsson & Bengtsson, 1983), nitrat (Autoanalyser II system, Bran & Luebbe, Hamburg, Tyskland) och buffertkapacitet (McDonald & Henderson, 1962). Från varje kontaminerad parti togs ett prov och från den icke kontaminerade kontrollen togs 3 prov för bestämning av antalet *Clostridium*-sporer (se nedan). Mjölksyrabakterier bestämdes enbart i den icke kontaminerade kontrollen (3 prov). Från varje prov (40 g) gjordes minst 3 tiofaldiga spädningar med Ringer-lösning (Merck 1.15525). En ml från varje spädning gjöts in i petriskålar med Rogosa-agar som hade sänkts med ättiksyra till pH 5,5. Räkning av kolonierna skedde efter anaerob odling i 3 dygn vid 30°C.

Alla 24 *Clostridium*-stammar som användes härrörde från Svensk Mjölks samling i Lund. Stamsuspensionerna med de olika *Clostridium*-stammarna odlades upp efter en kort värmebehandling. Odlingen skedde medels ytspridning på RCM-agarplattor (Merck 1.05410) med tillsats av 200 ppm D-cykloserin (Sigma C-6880). Plattorna placerades i en anaerobklocka vid 37°C i 5-7 dagar. De individuella sporsuspensionerna gjordes genom att skölja av kolonierna från plattorna med steril Ringer-lösning. Sportätheten i suspensionerna (sporer/ml) bestämdes dels med en Bürker räknecammare (första skörd) och dels genom odling på RCM-plattor efter värmebehandling vid 80°C i 10 minuter (andra skörd). Suspensionerna resp. cocktails förvarades fram till användningen i kyla (+2°C).

Mellan 1- 3 *Clostridium*-stammar inom samma art kombinerades slumpvis ihop för att producera 10 olika sporcocktails (Tabell 1). Dessa cocktails tillsattes sedan till grönmassan genom att spreja suspensionen över den utspridda grönmassan som låg i en stor platsäck. Ca 10³ sporer/g gräs tillsattes. Grönmassan blandades genom intensiv skakning av den uppblåsta platsäcken. Vid fyllningen av glasburkarna användes vinylhandskar som byttes efter varje behandling. Efter fyllningen förslöts glasburkarna. Vattenlåsen på locken (Bild 1) fylldes dock med vatten först 18 timmar efter förslutningen. Det innebar att silorna blev gastäta först efter 18 timmar. Detta förfarande gjordes för att fördröja mjölksyrabakteriernas aktivitet och för att efterlikna den långsammare förslutningsprocessen som är vanlig i stora silor.

Siloburkarna vägdes vid flera tidpunkter under lagringen för att kunna följa förloppet av viktsförlusterna. Glasburkarna lagrades vid rumsvärme (19-22°C) i 103 dagar (första skörd) resp. 126 dagar (andra skörd). Därefter öppnades burkarna, innehållet blandades i en plastpåse och prov togs för att bestämma antalet *Clostridium*-sporer, TS-halt, vattenaktivitet (a_w), ammonium-kväve (Am-N), pH och fettsyror. Am-N bestämdes med ett AutoAnalyzer II System (Bran & Luebbe, Hamburg, Germany). Fettsyror (mjölk-, ättik-, smör-, bärnstensyra), etanol och 2,3-butandiol bestämdes medels HPLC (Andersson & Hedlund 1983). Vattenaktivitet bestämdes i alla ensilage från första skörden och från ett samlingsprov från 3 silo-upprepningar i andra skörden. Alla a_w -mätningarna utfördes hos ett ackrediterat laboratorium (SVA, Uppsala; apparat: Aqua-Lab CX-2).



Bild 1. Glasburk med lock och vattenlås.

Tabell 1. Sammansättning av *Clostridium*-cocktails för kontamineringen av grönmassan. Stammen i cocktail nr.1 användes tidigare som störflora i ensileringsförsök. *Clostridium*-stammarna kommer från Svensk Mjölks samling (SM).

Cocktail nr.	<i>Clostridium</i> -art	SM-nr.	Original märkng.	Ursprung enligt SM
1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	213	SLU 209	SLU, Uppsala
2	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	216	SLU 217	SLU, Uppsala
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	231		NIZO-rör från Kalmar
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	366	5, 23-8-89	Ostutvecklingsst. i Voll, Norge
3	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	223	26	Hörby
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	352		Ost från Falkenberg, jäst
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	360	NCDO 1755	Norsk Lantbruksuniversitet
4	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	194		RCM-rör från Hörby
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	210	NCDO 1753	NCDO
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	263		RCM-rör från Hörby
5	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	186		I osten från Falkenberg
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	362	6, 12-9-88	Ostutvecklingsst. i Voll, Norge
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	368	DK 5 I: 2	Danmark
6	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	192		RCM-rör från Hörby
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	221	6	Hörby
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	365	1, 28-8-89	Ostutvecklingsst. i Voll, Norge
7	<i>Cl. butyricum</i>	196		NIZO-rör från Kalmar
	<i>Cl. butyricum</i>	203	192	SLU, Uppsala
	<i>Cl. butyricum</i>	219		Kristianstad-ost
8	<i>Cl. bifermentans</i>	217	76	Lev.mjolk, Caroline
	<i>Cl. bifermentans</i>	233		NIZO-rör från Kalmar
9	<i>Cl. sporogenes</i>	199	NCDO 1710	NCDO
	<i>Cl. sporogenes</i>	234		NIZO-rör från Kalmar
10	<i>Cl. sticklandi</i>	195		Lev.mjolk från Alnarp

Innan ensileringsdelen genomfördes, undersökte vi hur mycket själva bestämningsmetoden för klostridier påverkade värden i våra sporsuspensionerna (antal sporer/ml). Vi använde två vanliga kvantitativa bestämningsmetoder: a) optisk räkning av sporer i faskontrastmikroskop med hjälp av en Bürker-räknekammare (s.k. microscopic count) och b) odling på RCM-agarplattor och några dagar senare räkning av kolonierna på dessa plattor (s.k. viable count).

Skillnader i ensilagens analysvärden mellan olika sporcocktails beräknades med hjälp av variansanalys och ett statistikprogram för PC-bruk (SAS 9.1 for Windows, 2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). På grund av signifikanta samspel mellan skördar och TS-nivåer användes för varje grönmassaparti en fullkomligt randomiserad modell med endast en faktor: sporcocktail. Mikrobiologiska värden uttrycktes som logaritmiska värden enligt Niemeläs (1983) förslag. Värden som låg under analysens detektionsgräns (t.ex. $<\log 1,7$) användes i den statistiska beräkningen som halva gränsvärdet (t.ex. $1,7 / 2 = \log 0,85$). Om sannolikheten, att två behandlingsmedelvärden var lika, var mindre än 5% enligt Tukey's t-test ($P < 0,05$), så bedömdes skillnaden som statistiskt signifikant. I tabellerna nedan indikeras signifikanta skillnader mellan medelvärden genom olika upphöjda bokstäver inom samma kolumn. Ifall inga upphöjda bokstäver visas för en parameter, så hade de olika sporcocktails ingen statistiskt signifikant effekt på parametern.

Resultat

Grödorna skördades den 16 juni och 11 sept. 2006 från samma gräsvall nära vårt försökscentrum. Växtmaterialet bestod av främst gräs (ängssvingel + timotej i stråskjutningsfasen) med 20% (första skörd) resp. 35% (andra skörd) rödklöver i. Vid de båda skördarna uppnåddes liknande TS-halter och vattenaktiviteter för de båda TS-nivåerna (Tab.2). De torrare grödorna var lättensilerade ($FC > 45$) och de blötare något mer svårensilerade ($FC < 45$).

Tabell 2. Sammansättningen av de 4 gräspartierna som ensilerades (2 prov/gräs).

Skörd + TS-nivå	TS %	Vatten- aktivitet a_w	Aska	Rå- protein % av TS	Socker	Nitrat g/kgTS	Buffert- kapacitet g mjölks. /100gTS	FC* kvot	MSB log cfu / g	Klostridier
1:a sk. Låg TS	28.6	0.986	9.5	13.2	9.9	0.8	6.10	42	-	<1.7
1:a sk. Hög TS	42.3	0.976	9.2	13.0	9.4	0.5	6.35	54	-	<1.7
2:a sk. Låg TS	29.9	0.981	12.2	19.0	10.3	0.8	6.60	44	2.6	<1.7
2:a sk. Hög TS	40.8	0.970	12.2	19.1	9.7	0.5	6.60	54	3.3	<1.7

*FC = Fermentability Coefficient (Weißbach 1996): ifall FC>45 = lätt-ensilerat, ifall FC<35 = svår-ensilerat. Antalet klostridiesporer och mjölksyrabakterier (MSB) i materialet var mycket lågt (klostridier under detektionsgränsen). Askhalten i grödan från andra skörden var relativt hög, vilket kan tyda på jordkontamination (det fanns sorkhögar i vallen). Dock kunde inga synliga spår av jord i grönmassan upptäckas.

Tabell 3. Bestämning av antalet klostridier i de odlade sporsuspensionerna antingen genom räkning i mikroskop med en räknecammare eller genom anaerob odling på agarplattor. Sista kolumnen anger den genomsnittliga skillnaden mellan dessa två bestämningsmetoderna.

Cocktail nr. <i>Clostridium</i> -art	<i>Clostridium</i> stammar SM-#	Synliga sporer i räknecammare		Odlade kolonier på agarplattor (RCM)		Skillnad, medelvärde log / ml
		1:a skörd log / ml	2:a skörd log / ml	1:a skörd log cfu / ml	2:a skörd log cfu / ml	
1 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	213	9.5	9.8	5.8	6.9	3.3
2 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	216	9.5	8.9	5.6	5.7	3.5
	231	9.0	9.1	3.5	3.7	5.4
	366	9.2	9.4	4.0	4.2	5.2
3 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	224	9.5	9.6	4.1	4.2	5.5
	352	9.4	9.5	6.7	6.6	2.8
	360	9.3	9.7	4.9	5.3	4.4
4 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	194	8.9	9.0	6.1	5.9	3.0
	210	7.9	8.5	5.5	5.8	2.5
	263	9.4	9.2	6.5	6.4	2.9
5 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	186	9.2	9.1	7.5	7.7	1.6
	362	9.2	9.4	5.5	5.6	3.7
	368	9.4	9.1	4.6	5.6	4.1
6 <i>Cl. tyrobutyricum</i>	192	9.2	9.2	5.7	5.3	3.7
	221	9.2	9.3	3.4	2.0	6.6
	365	9.3	9.7	2.0	2.2	7.4
7 <i>Cl. butyricum</i>	196	9.3	9.3	6.4	6.3	2.9
	203	8.5	9.0	6.4	5.4	2.9
	219	8.9	9.3	6.0	6.2	3.0
8 <i>Cl. bifermentans</i>	217	8.6	9.1	6.2	6.1	2.7
	233	7.9	8.6	7.1	6.6	1.4
9 <i>Cl. sporogenes</i>	199	7.8	7.1	5.3	5.9	1.8
	234	9.0	9.0	8.5	8.5	0.6
10 <i>Cl. sticklandi</i>	195	8.1	8.6	7.2	7.3	1.1
<i>Medelvärde:</i>		9.0	9.1	5.6	5.6	3.4

Tabell 4. Mängden *Clostridium*-sporer (viable counts) i grönmassan direkt efter kontamineringen med olika spor-cocktails. Mängden sporer som tillsattes (10^3 sporer/g) baserades i första skörd på sporräkning i räknekammare och i andra skörd på odling på agarplattor. Utan = ej kontaminerat gräs.

Cocktails (behandlingsar)	<i>Clostridium</i> -sporer	
	1:a skörd	2:a skörd
	log cfu / g gräs	
Utan	<1.7	<1.7
1	<1.7	4.0
2	<1.7	2.7
3	<1.7	3.9
4	<1.7	3.2
5	<1.7	3.7
6	<1.7	2.0
7	<1.7	3.0
8	2.5	3.6
9	1.7	4.1
10	1.7	1.7

Tabell 5. TS-halt och vattenaktivitet före och efter ensileringen.

Skörd - TS-nivå	TS-halt (vikts-%)			Vattenaktivitet (a_w)		
	Gräs	Ensilage	Skillnad	Gräs	Ensilage	Skillnad
1 - låg	28,6	26,9	-1,7	0,986	0,984	-0,002
1 - hög	42,3	42,5	0,2	0,976	0,968	-0,008
2 - låg	29,9	29,6	-0,3	0,981	0,971	-0,010
2 - hög	40,8	39,3	-1,5	0,970	0,957	-0,013

Innan grönmassan ensilerades undersöktes sporkoncentrationen (antal/ml) i våra sporsuspensionerna med två olika metoder. Därvid framkom att det fanns mycket stora avvikelser mellan de olika klostridiestammarna beroende på hur sporhalten bestämdes (Tab. 3). Skillnaden mellan de två bestämningsmetoderna var minst hos *Cl. sporogenes* #234 (log 0.6/ml; cocktail 9) och högst hos *Cl. tyrobutyricum* #365 (log 7.4/ml; cocktail 6).

Tabell 4 visar hur många sporer vi hittade i grönmassan med omlingsmetoden direkt efter kontamineringen med sporcocktails från Tab.3. Det är logiskt att spörvärden ligger högre i grönmassaproven från andra skörden där antalet tillsatta sporer baserades på odlingsmetoden. Spörvärden är lägre i proven från första skörden eftersom en stor del av de i mikroskop räknade spörerna inte växte ut på agarplattorna. Under ensileringen sjönk vattenaktiviteten i ensilagen med mellan 0,002 och 0,013 enheter. Sänkningen var större i 2:a än i 1:a skörden. Därmed blev vattenaktiviteten i ensilagen från hög TS-ledet lägre i andra skörden (0,957 a_w) än i första skörden (0,968 a_w) trots en lägre TS-halt (Tab.5).

Hygienisk kvalitet av ensilagen från första skörden (Tab.6+7)

De obehandlade kontrollensilagen i det lägre TS-området blev riktigt dåliga och innehöll ett högt antal klostridiesporer (log 6.3/g), höga halter ammoniumkväve (206 g/kgN) och smör-syra (2.25% av TS). De skiljde sig från de kontaminerade ensilagen endast genom högre mjölksyrhalt och något lägre pH. För övrigt var skillnaderna mot de kontaminerade ensilagen små.

Tabell 6. Första skörd: TS-halt, viktsförluster under lagringen, pH-värde, vattenaktivitet (a_w) och antal klostridiesporer i ensilagen efter drygt 100 dagars lagring. Medelvärden från 3 silor/cocktail.

Cocktail nr.	TS-halt % av färsk	a_w	pH	<i>Clostridium</i> log cfu/g	Viktsförluster % av initial TS
Låg TS-nivå (27%):					
Utan	27.2	0.983 ^B	5.56 ^A	6.3 ^A	8.5 ^A
1	26.4	0.983 ^B	5.81 ^B	6.6 ^B	9.3 ^B
2	26.9	0.984 ^{AB}	5.72 ^{CD}	6.4 ^{AB}	9.3 ^{BC}
3	26.6	0.985 ^A	5.76 ^{BD}	6.5 ^{AB}	9.0 ^{ABC}
4	26.8	0.985 ^A	5.73 ^{BCD}	6.3 ^{AB}	9.0 ^{ABC}
5	26.8	0.985 ^A	5.77 ^{BD}	6.3 ^{AB}	9.3 ^{BC}
6	27.2	0.985 ^A	5.65 ^C	6.2 ^A	8.7 ^{AC}
7	27.1	0.985 ^A	5.80 ^{BD}	6.3 ^A	9.0 ^{ABC}
8	27.1	0.985 ^A	5.74 ^{BCD}	6.3 ^{AB}	9.0 ^{ABC}
9	27.0	0.985 ^A	5.78 ^{BD}	6.3 ^A	9.1 ^{ABC}
10	26.7	0.985 ^A	5.82 ^B	6.4 ^{AB}	9.3 ^{BC}
Hög TS-nivå (42%):					
Utan	43.6 ^A	0.969 ^{AB}	5.54 ^A	1.8 ^{AB}	4.1 ^B
1	42.9 ^{AB}	0.968 ^B	5.40 ^B	2.3 ^{AB}	5.9 ^A
2	42.8 ^{AB}	0.966 ^C	5.36 ^{BC}	0.9 ^B	5.4 ^A
3	42.6 ^{AB}	0.966 ^C	5.37 ^{BC}	1.4 ^{AB}	5.5 ^A
4	42.4 ^B	0.969 ^{AB}	5.29 ^C	0.9 ^B	5.4 ^A
5	42.1 ^B	0.968 ^B	5.35 ^{BC}	2.4 ^{AB}	5.5 ^A
6	41.9 ^B	0.968 ^B	5.33 ^{BC}	1.4 ^{AB}	5.4 ^A
7	41.9 ^B	0.969 ^{AB}	5.13 ^D	0.9 ^B	5.2 ^A
8	42.1 ^B	0.970 ^A	5.18 ^{DE}	1.4 ^{AB}	5.9 ^A
9	42.5 ^B	0.971 ^A	5.28 ^{CE}	2.7 ^A	5.3 ^A
10	42.7 ^{AB}	0.969 ^{AB}	5.01 ^F	1.5 ^{AB}	5.2 ^A

Tabell 7. Första skörd: Halten ammoniumkväve, fettsyror, 2,3-butandiol och etanol i ensilagen efter drygt 100 dagars lagring. Medelvärden från 3 silor/cocktail.

Cocktail nr.	Am-N	Mjölksyra	Ättiksyra	Smör-syra	Propion-syra	2,3-Butandiol	Etanol
	g / kg N	% av TS					
Låg TS-nivå (27%):							
Utan	206	1.19 ^A	0.36 ^{AB}	2.25 ^A	0.13 ^A	3.24 ^A	2.45 ^A
1	263	0.10 ^G	0.43 ^{ABC}	3.22 ^B	0.30 ^A	3.70 ^{BC}	2.66 ^{BC}
2	190	0.37 ^{DEF}	0.50 ^{ABC}	2.82 ^{BCDE}	0.24 ^A	3.77 ^{BC}	2.59 ^{ABC}
3	198	0.16 ^G	0.65 ^C	2.83 ^{BCE}	0.23 ^A	3.97 ^C	2.70 ^C
4	202	0.52 ^{CD}	0.41 ^{ABC}	2.76 ^{CDE}	0.13 ^A	3.72 ^{BC}	2.54 ^{AB}
5	206	0.19 ^{FG}	0.45 ^{ABC}	3.02 ^{BE}	0.18 ^A	3.87 ^C	2.69 ^{BC}
6	168	0.85 ^B	0.30 ^A	2.55 ^{ACD}	0.13 ^A	3.35 ^A	2.70 ^C
7	252	0.44 ^{CDE}	0.63 ^C	2.47 ^{ACD}	0.18 ^A	3.51 ^{AB}	2.63 ^{BC}
8	202	0.62 ^C	0.61 ^{BC}	2.40 ^{AD}	0.13 ^A	4.00 ^C	2.65 ^{BC}
9	196	0.44 ^{CDE}	0.64 ^C	2.44 ^{ACD}	0.17 ^A	4.03 ^C	2.58 ^{ABC}
10	256	0.25 ^{EFG}	0.98 ^D	2.42 ^{ACD}	0.52 ^B	4.05 ^C	2.64 ^{BC}
Hög TS-nivå (42%):							
Utan	71 ^A	1.38 ^A	0.29 ^A	<0.04 ^A	<0.15	0.82 ^{AB}	1.09 ^A
1	119 ^B	2.31 ^{BC}	0.42 ^{BC}	0.04 ^B	<0.15	1.38 ^{CD}	1.45 ^B
2	105 ^{AB}	2.27 ^B	0.39 ^C	<0.04 ^A	<0.15	1.40 ^{CD}	1.34 ^B
3	95 ^{AB}	2.15 ^B	0.38 ^C	<0.04 ^A	<0.15	1.34 ^{CDE}	1.40 ^B
4	96 ^{AB}	2.39 ^{BCD}	0.45 ^{BCD}	<0.04 ^A	<0.15	1.18 ^E	1.43 ^B
5	97 ^{AB}	2.33 ^{BC}	0.42 ^{BC}	<0.04 ^A	<0.15	1.35 ^{CDE}	1.39 ^B
6	92 ^{AB}	2.40 ^{BCD}	0.41 ^C	<0.04 ^A	<0.15	1.47 ^C	1.43 ^B
7	87 ^{AB}	2.80 ^E	0.52 ^D	<0.04 ^A	<0.15	0.94 ^A	1.52 ^B
8	115 ^B	2.72 ^{DE}	0.51 ^D	<0.04 ^A	<0.15	1.48 ^C	1.39 ^B
9	88 ^{AB}	2.36 ^{BCD}	0.45 ^{BCD}	<0.04 ^A	<0.15	1.26 ^{DE}	1.38 ^B
10	70 ^A	2.64 ^{CDE}	0.50 ^{BD}	<0.04 ^A	<0.15	0.66 ^B	1.43 ^B

Om man jämför ensilagen från det lägre med det högre TS-området, så ligger pH-värden något lägre och mjölksyrahalterna högre i de *torra* ensilagen trots en TS-skillnad på ca 16%-enheter (27% versus 43% TS). Sporhalten i de torra ensilagen höll sig samtidigt på en låg nivå (<log 2.7/g), mängden ammoniumkväve var måttlig och smörsyrhalten var nästan obefintlig. Skillnaderna mellan de kontaminerade ensilagen var för övrigt mycket små.

Hygienisk kvalitet av ensilagen från andra skörden (Tab.8+9)

Ensilagen i det lägre TS-området hade nästan samma TS-halt som i första skörden, men antalet klostridiesporer samt mängden smörsyra och ammoniumkväve var lägre än i första skörden. I det högre TS-området var förhållanden omvända. Här var de nyss nämnda parametrarna högre i andra än i första skörden trots lägre vattenaktivitet och lägre pH.

Skillnaderna mellan ensilagen som kontaminerades med de olika *Clostridium*-cocktails framkom tydligare under andra skörden. Ensilagen som behandlades med cocktail #1 hade i båda

Tabell 8. Andra skörd: TS-halt, viktsförluster under lagringen, pH-värde, vattenaktivitet (a_w) och antal klostridiesporer i ensilagen efter drygt 100 dagars lagring. Medelvärden från 3 silor/cocktail.

Cocktail nr.	TS-halt % av färsk	a_w	pH	<i>Clostridium</i> log cfu/g	Vikts-förluster % av initial TS
Låg TS-nivå (30%):					
Utan	30.0 ^{AB}	0.972	4.85 ^A	2.7 ^A	6.9 ^A
1	28.9 ^C	0.970	5.19 ^B	5.7 ^B	8.7 ^B
2	29.9 ^{AB}	0.970	4.82 ^A	3.9 ^{CD}	7.1 ^{AC}
3	29.6 ^{BDE}	0.970	5.19 ^B	4.7 ^{CE}	8.8 ^B
4	29.1 ^{CD}	0.972	5.16 ^B	4.9 ^{BE}	8.7 ^B
5	29.6 ^{BDE}	0.971	5.05 ^{BC}	4.0 ^{CD}	8.4 ^{BD}
6	29.6 ^{ABE}	0.971	4.85 ^A	3.6 ^D	7.5 ^{CE}
7	29.9 ^{AB}	0.972	4.94 ^{AC}	3.3 ^{AD}	7.3 ^{AC}
8	29.9 ^{AB}	0.971	4.88 ^A	3.2 ^{AD}	7.3 ^{AC}
9	29.3 ^{CDE}	0.972	5.04 ^{BC}	3.7 ^D	7.9 ^{DE}
10	30.1 ^A	0.972	4.82 ^A	3.3 ^{AD}	7.2 ^{AC}
Hög TS-nivå (39%):					
Utan	39.4 ^A	0.956	5.03 ^{BCD}	2.6 ^{BCD}	2.6 ^A
1	39.1 ^{AB}	0.955	5.11 ^A	3.8 ^{AB}	3.9 ^B
2	39.1 ^{AB}	0.957	4.94 ^{EF}	2.4 ^{CD}	3.1 ^{CD}
3	39.5 ^A	0.957	5.02 ^{BCD}	2.0 ^{CDE}	3.3 ^{CE}
4	39.2 ^{AB}	0.958	5.06 ^{ABC}	1.8 ^{DE}	3.1 ^{CD}
5	39.0 ^B	0.957	5.08 ^{AB}	4.1 ^A	3.6 ^{BE}
6	39.4 ^{AB}	0.957	4.97 ^{DEF}	<1.7 ^E	2.8 ^{AD}
7	39.3 ^{AB}	0.958	4.94 ^{EF}	2.3 ^{CD}	3.0 ^{ACD}
8	39.1 ^{AB}	0.955	5.01 ^{BCD}	3.2 ^{ABC}	2.8 ^{AD}
9	39.3 ^{AB}	0.956	4.93 ^F	4.0 ^A	2.8 ^{AD}
10	39.4 ^A	0.956	5.00 ^{CDE}	2.6 ^{BCD}	2.8 ^{AD}

TS-områden höga sportal, höga halter smörsyra och höga pH-värden. De övriga cocktailbehandlingar reagerade olika beroende om det var låg eller hög TS-halt. I det låga TS-området ledde cocktail #3, #4 och #5 till förhöjda sportal (log 4,0-4,9/g) samt höga smörsyra- (2,1-2,4% av TS) och butandiolvärden (2,1-2,5% av TS), medan cocktail #5 och #9 reagerade med förhöjda sporhalter (log 4,0-4,1/g) i det höga TS-området. Skillnader mellan behandlingarna i halten ammoniumkväve var inte signifikanta.

Tabell 9. Andra skörd: Halten ammoniumkväve, fettsyror, 2,3-butandiol och etanol i ensilagen efter drygt 100 dagars lagring. Medelvärden från 3 silor/cocktail.

Cocktail nr.	Am-N g / kg N	Mjölksyra	Ättiksyra	Smör-syra	Propion-syra % av TS	2,3-Butandiol	Etanol
Låg TS-nivå (30%):							
Utan	122	4.75 ^{AB}	1.10 ^C	0.68 ^D	<0.12 ^A	2.03 ^{BC}	1.25 ^{DEF}
1	128	1.50 ^E	1.22 ^C	2.74^A	0.54 ^C	2.55 ^A	1.31 ^{CDE}
2	115	4.54 ^{ABC}	1.14 ^C	0.89 ^{CD}	<0.12 ^A	1.71 ^{DE}	1.18 ^F
3	124	1.89 ^{DE}	1.08 ^C	2.36^B	0.29 ^B	2.45 ^A	1.42 ^{ABC}
4	142	2.19 ^{DE}	1.27 ^{BC}	2.39^B	0.29 ^B	2.49 ^A	1.44 ^{AB}
5	135	2.60 ^D	1.18 ^C	2.14^B	0.28 ^B	2.11 ^B	1.32 ^{BCDE}
6	136	4.49 ^{ABC}	1.57 ^A	1.01 ^{CD}	<0.12 ^A	1.85 ^{CD}	1.47 ^A
7	128	3.95 ^{BC}	1.26 ^{BC}	0.97 ^{CD}	<0.12 ^A	1.91 ^{BC}	1.36 ^{ABCD}
8	111	4.30 ^{ABC}	1.13 ^C	0.94 ^{CD}	<0.12 ^A	1.89 ^{CD}	1.22 ^{EF}
9	130	3.61 ^C	1.52 ^{AB}	1.12 ^C	<0.12 ^A	1.99 ^{BC}	1.43 ^{ABC}
10	140	5.00 ^A	1.28 ^{BC}	0.94 ^{CD}	<0.12 ^A	1.61 ^E	1.26 ^{DEF}
Hög TS-nivå (39%):							
Utan	87	3.50 ^{BC}	0.59 ^C	<0.04 ^a	<0.15	0.69	0.66 ^A
1	84	2.61 ^E	0.29 ^E	1.30^B	<0.15	0.75	0.63 ^A
2	84	3.76 ^{AB}	0.73 ^A	0.15 ^A	<0.15	0.81	0.86 ^B
3	81	3.21 ^{CD}	0.54 ^{CD}	0.57 ^C	<0.15	0.70	0.64 ^A
4	86	3.28 ^{CD}	0.54 ^{CD}	0.42 ^C	<0.15	0.75	0.67 ^A
5	83	3.10 ^D	0.46 ^D	0.85 ^D	<0.15	0.79	0.68 ^{AB}
6	81	3.71 ^{AB}	0.69 ^{AB}	0.05 ^A	<0.15	0.75	0.73 ^{AB}
7	85	3.85 ^A	0.73 ^A	<0.04 ^A	<0.15	0.77	0.79 ^{AB}
8	85	3.68 ^{AB}	0.62 ^{BC}	<0.04 ^A	<0.15	0.81	0.74 ^{AB}
9	83	3.85 ^A	0.70 ^{AB}	<0.04 ^A	<0.15	0.78	0.73 ^{AB}
10	78	3.64 ^{AB}	0.70 ^{AB}	<0.04 ^A	<0.15	0.73	0.77 ^{AB}

Diskussion

De här använda blandvallarna med ca 30% och 40% TS representerar ett ganska typiskt ensilage för lantbrukare med plansilor, tornsilor eller slangsilor. Man kan också förvänta sig att en blöt vallgröda blir mer lättensilerad när den förtorkas och TS-halten stiger. Den svagare klostridieaktiviteten i de torrare ensilagen är dels en effekt av den lägre vattentillgängligheten (lägre a_w) som hämmar klostridier mer än mjölksyrabakterier och att sockret i grödan koncentreras under förtorkningen, vilket gynnar mjölksyrabakteriernas konkurrensförmåga gentemot andra mikroorganismer. Det var därför väntat att antalet klostridiesporer samt mängden smör-syra och ammoniak blir lägre i de torrare ensilagen.

Vattenaktiviteten i växt- eller ensilagesaften är en funktion av dess molaritet: $a_w = e^{-\text{molaritet}}$ (Greenhill 1964). Det innebär att vattenaktiviteten sjunker under ensileringens gång eftersom substratet i grönmassan omvandlas av de olika bakterierna till fler och mindre molekyler. Vattenaktiviteten i grönmassan är därför i regel något högre än den som mättes i ensilagen (Tab.5). I Figur 1 visas en modell av Leibensperger & Pitt (1987) som anger den lägsta tolererbara vattenaktivitet och pH för tillväxt av *Cl. tyrobutyricum* (omarbetad data från Wieringa 1957). Värden som ligger under linjen borde enligt Leibensperger & Pitt:s modell ge upphov till närmelsevis klostridiefria ensilage. Medelvärden av våra ensilage från 2 skördar och 2 TS-nivåer representeras av stjärnorna i figuren. Modellen förklarar klostridieaktiviteten i ensilagen från första skörden (hög aktivitet vid låg TS, ingen aktivitet vid hög TS), men inte i ensilagen från andra skörden där relativt höga sporhalter hittades (t.ex. $\log 5,7$ cfu/g i cocktail 1-ensilagen vid 0,97 a_w och pH 5,2). I de torra ensilagen var nivån på sporantalet högre i andra skörden (lägre grå stjärna) än 1:a skörden (lägre vit stjärna), vilket

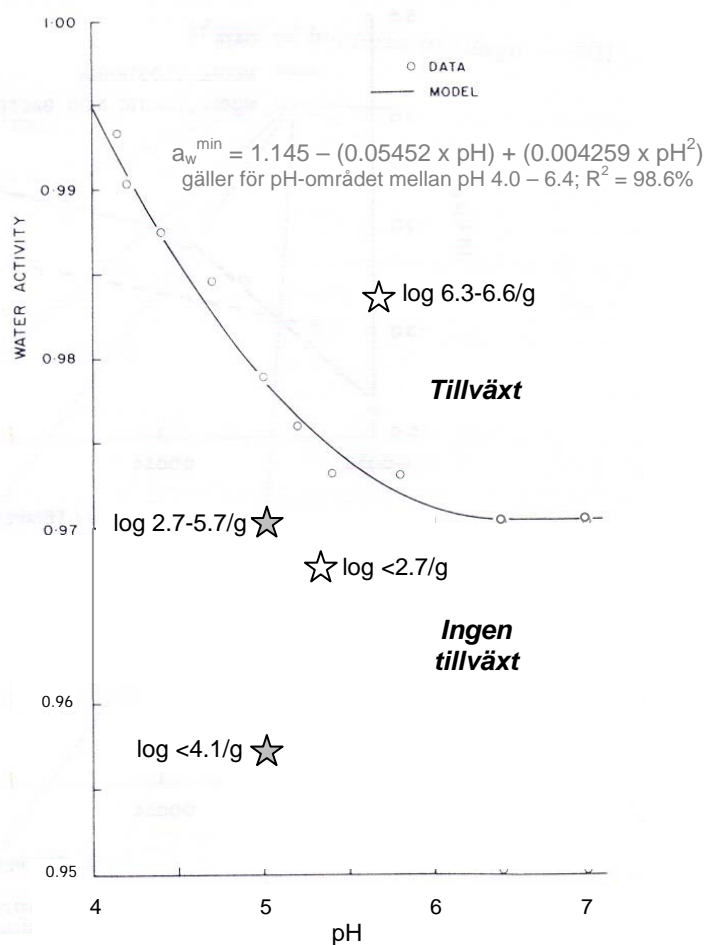
med tanke på de lägre pH- och a_w -värden verkar ologiskt. En förklaring kan dock vara att flertalet stammar vid öppnandet av silorna befann sig i vegetativt tillstånd och antagligen inte hann bilda livskraftiga sporer. Därför kunde de inte heller påvisas med sporanalysmetoden. De relativt höga halterna smörsyra i ensilage som gjordes bl.a. med cocktail 1 och 5 kan bara förklaras om mängden vegetativa klostridier har legat på en hög nivå (troligtvis $>\log 6/g$) under en period före öppnandet av silorna.

Det är också möjligt att variationen mellan de olika klostridiearter och -stammar beträffande känslighet för miljöfaktorer som begränsar bakterietillväxten var större än vad vi trodde. Mängden nitrat, vars nedbrytningsprodukter nitrit och kväveoxid kan hämma vegetativa klostridier (Woods et al. 1981), skiljde sig inte mellan första och andra skörden (Tab.2). Nitralhalten låg tydligt under det för korna kritiska värde ($<1.2 \text{ g/kgTS}$; Spörndly 2003), men tillräckligt högt för att kunna utöva en viss hämmande effekt på klostridierna (Wieringa 1966).

Att man får lägre sporantal vid odling på agarplattor än vid räkning i mikroskop var väntat eftersom de på agarplattor framodlade kolonier endast kan bildas från livskraftiga sporer medan de i mikroskop räknade sporer kan till stor del bestå av döda eller ej livskraftiga sporer. Det var dock överraskande att skillnaden i sporantalet mellan de två bestämningsmetoderna var så stor mellan olika klostridiearter och -stammarna (Tab.3). Odlingsmetoden låg som bäst 0,6 log-enheter lägre (cocktail 9) och som sämst 7,4 log-enheter lägre (cocktail 6). Att sporkontaminationen hade en så svag effekt på ensilage från första skörden och en bättre effekt på ensilagen från andra skörden beror troligtvis på att antalet tillsatta klostridier i första skörden baserades på i mikroskop räknade sporer och antalet sporer i andra skörden på antalet livskraftiga sporer. Det gör således stor skillnad vilken metod man baserar sporantalet på när man kontaminerar grönmassan med en viss mängd sporer. Man kan dock på goda grunder anta att det verkliga sporantalet ligger närmare antalet som bestämdes med odlingsmetoden än medels räkning i mikroskop.

Slutsatser

- *Cl. tyrobutyricum* av olika stammar hämmas i olika utsträckning av hög TS-halt. Det finns stammar som tillväxer och bildar sporer även i ensilage med 40 % TS
- Sporsuspensioner med *Cl. tyrobutyricum* stam #213 (cocktail #1) som vi tidigare använde för att kontaminera grönmassa, visade sig vara en lämplig klostridiestam för ensilerings-



Figur 1. Modell för tillväxtgräns av *Cl. tyrobutyricum* vid olika pH och vattenaktivitet (Leibensperger & Pitt 1987). pH- och a_w -medelvärden samt sporhalter från ensilagen i denna undersökning: 1:a skörd = vita stjärnor, 2:a skörd = gråa stjärnor.

försök, där effekten mot klostridier ska testas. Denna stam hävdade sig väl i jämförelse med 23 andra stammar, både vid ca 30% och vid ca 40% TS-halt.

- Jämfört med icke kontaminerad grönmassa gav en tillsats av ca 1000 odlingsbara *Cl. tyrobutyricum* #213 per gram grönmassa en förhöjd klostridieaktivitet i de resulterande ensilagen. Detta gällde både vid ca 30 % TS och, i mindre utsträckning dock, vid 40 % TS.
- Antalet tillsatta klostridiesporer bör, om möjligt, inte baseras på antalet som bestäms med mikroskop utan på antalet som bestäms genom odling på lämpligt substrat, exempelvis RCM-agar. Med den metoden räknas enbart livskraftiga sporer men kräver en odlingstid på 5-7 dagar.

Publikationer och övrig resultatsförmedling

Publicering accepterad i *Grassland Science in Europe* vol 13 (2008) och presenteras på EGF:s General Meeting i juni 2008 i en referee-granskad summering på 3 sidor. Mer fullständig vetenskaplig publikation för en peer-review tidskrift inom detta ämnesområde är planerad.

Resultaten sprids även via föredrag till rådgivare och lantbrukare, via Svensk Mjölks Rådgivarsajt samt via undervisning till SLU-studenter. Resultaten tillämpas omedelbart i forskningsverksamhet och produktutveckling mot industrin vid inst. för HUV, SLU.

Litteraturreferenser

- Andersson R. & Hedlund B. 1983. HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 176: 440-443.
- Greenhill W.L. 1964. Plant juices in relation to silage fermentation. III. Effect of water activity of juice. *Journal of the British Grassland Society* 19, 336-339.
- Johansson, H. 2007. Dokumentation av ensilering med fokus på clostridiesporer i mjölk. Examensarbete 236. Inst. f. HUV. SLU. Uppsala
- Larsson K. & Bengtsson S., 1983. Bestämning av lätt tillgängliga kolhydrater i växtmaterial. *SLL-metodbeskrivning nr.22*, Statens Lantbrukstekniska Laboratorium (SLL), Uppsala.
- Leibensperger R.G. & Pitt R.E. 1987. A model of clostridial dominance in silage. *Grass and Forage Science* 42(3), 297-317.
- McDonald P. & Henderson A.R. 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. *Journal of the Science of Food & Agriculture* 13: 395-400.
- Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude-Elfering S.J.W.H. & Spoelstra S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: *Silage Science and Technology* (Buxton D.R., Muck R.E. & Harrison J.H., eds.), Agronomy series #42, American Society of Agronomy Inc., Madison Wis., USA. s.43.
- Spörndly, R. 2003. Fodertabeller för idisslare 2003. *Rapport 257*. SLU, Inst. för husdjurens utfodring & vård, Uppsala. Tab.23, s.79.
- Weißbach, F. 1996. New developments in crop conservation. In: *Proceedings of the XIth International Silage Conference* (eds.: Jones, Jones, Dewhurst, Merry & Haigh, sept.1996), University of Wales, Aberystwyth, Wales. s.11-25.
- Wieringa, G.W. 1957. The effect of wilting on butyric acid fermentation in silage. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 6, 204-210.
- Wieringa, G.W. 1966. The influence of nitrate on silage fermentation. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*, Helsingfors, Finland. s.537-540.
- Woods, L.F.J., Wood, J.M. & Gibbs, P.A. 1981. The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoriclastic system in *Cl. sporogenes* by sodium nitrite. *Journal of General Microbiology* 125, 339-406