

Slutrapport till Stiftelsen Svensk Hästforskning projekt nr H0747173

Inplastat vallfoder till hästar - Inverkan av botaniskt utvecklingsstadium vid skörd på mikrobiell och kemisk sammansättning samt aerob lagringsstabilitet i hösilage, och på hästars ätbeteende och digestion

Bakgrund

Inplastat vallfoder används alltmer istället för hö i hästfoderstater. Det inplastade vallfoder som används på många hästgårdar, dvs hösilage med en torrsbstanshalt över 50 %, har dock andra egenskaper än både hö och silolagrat ensilage med lägre ts-halt (Jackson & Forbes, 1970; Field & Wilman, 1996; Müller, 2005; Slottner & Bertilsson, 2006). Den biologiska kunskapen om hösilage, ffa med avseende på mikrobiologi och konservering, är i dagsläget mycket begränsad till skillnad från kunskapen om blötare ensilage. Dessutom skiljer sig vallfoder som är producerat för hästar från vallfoder som är avsett för mjölkkor även ur andra aspekter. De flesta hästar har ett lågt näringsbehov i jämförelse med mjölkkor (NRC, 2007), vilket innebär att det vallfoder som används till hästar generellt sett är skördat i ett senare botaniskt utvecklingsstadium. Vallväxterna är då mindre smältbara och mer lignifierade, vilket ger ett lägre näringsvärde (e.g. Hopkins, 2000) som passar de flesta hästars näringsbehov. Det finns dock indikationer på att en sen vallskörd kan inverka negativt på konserveringsresultatet (höga etanolhalter och låg mjölksyrhalt) och på den hygieniska kvaliteten (ökat antal enterobakterier, klostridiesporer, jäst- och mögelsvampar) i fodret (Pahlow, 1991; Behrendt *et al.*, 1997). Detta kan vara av särskilt intresse i hösilage, eftersom det pga sin höga ts-halt inte genomgår någon omfattande fermentation till skillnad från blötare ensilage (Jackson & Forbes, 1970; Müller, 2005). Mikrobfloran på gräset i fält kan därför ha större, eller mindre, inverkan på de mikrobiella och biokemiska förloppen i hösilage under konservering och lagring. Det botaniska utvecklingsstadiet vid skörd kan också påverka fodrets aeroba lagringsstabilitet (dvs fodrets hållbarhet efter öppning). En sent skördad gröda är grövre och mer motståndskraftig mot balpressens komprimering jämfört med en spädare, tidigare skördad gröda, och en sen skördetidpunkt kan därför resultera i porösa balar med låg baldensitet (kg ts/m^3). Ett inflöde av syrerik luft i vallfodret (efter balens öppnande eller vid t ex plastskada, stickhål) kan då leda till en ökad mikrobiell aktivitet, vilket i sin tur orsakar förskämning av fodret och förkortar den aeroba lagringsstabiliteten (Lindgren *et al.*, 1985; Williams, 1994). Detta kan vara av särskild vikt för just hösilage, eftersom det pga den begränsade fermentationen innehåller högre halter restsocker vilket utgör näring för nedbrytande mikroorganismer. Kombinationen hög ts-halt och sent botaniskt utvecklingsstadium (=grov gröda) kan därför innebära en särskilt stor utmaning ur konserverings- och lagringsstabilitetsperspektiv. Den dagliga konsumtionen av vallfoder är dessutom förhållandevis låg på de flesta hästgårdar, delvis på grund av att över 75 % av Sveriges hästar hålls i stallar med endast 1-4 hästar (Persson, 2005) vilket innebär att en öppnad bal utfodras under flera dagar. Aerob stabilitet i öppnade hösilagebalar är därför av särskilt intresse i hästsammanhang.

Kunskapen om hur skillnader i vallfodrets sammansättning (som beror på skördetidpunkten) påverkar hästars ätbeteende och digestion är också mycket begränsad (Cuddeford, 2005; Müller, 2009b). Ett tidigt skördat vallfoder är spädare i sin struktur och kan hypotetiskt ätas upp fortare av hästen än ett sent skördat vallfoder med grövre struktur och högre fiber- och lignininnehåll. Detta kan vara av betydelse för både lättfödda och svårfödda hästar, och för såväl låg- som högpresterande hästar, som har olika höga näringsbehov och får sitt näringsbehov täckt mer eller mindre från endast grovfodret. Alla hästar har beteende- och digestionsfysiologiska behov av att få tillräckligt mycket vallfoder i sin foderstat. En generell minimirekommendation är minst 1 kg ts grovfoder per 100 kg

kroppsvikt och dygn (NRC, 2007), men vallfodrets sammansättning har inte definierats i denna rekommendation. Om hästen utfodras denna lägsta rekommenderade giva av ett vallfoder som är tidigt eller sent skördat spelar sannolikt roll för både ätbeteende, ättid och digestion hos hästen, men det saknas kunskap på detta område.

Med denna bakgrund var det övergripande syftet med detta försök att studera hur det botaniska utvecklingsstadiet vid skörd påverkade mikrobiologisk sammansättning i grönmassa och hösilage; fermentation, hygienisk kvalitet och aerob lagringsstabilitet i hösilage; samt inverkan av det botaniska utvecklingsstadiet på hästars vallfoderkonsumtion och digestion. Projektet löpte över 2 år; år 1 utfördes ett vallfoderkonserveringsförsök i laboratoriesilor, och år 2 utfördes ett vallfoderkonserveringsförsök i balar kopplat till ett hästutfodringsförsök.

Material och metoder

År 1

Ett konserveringsförsök utfördes i laboratorieskala under år 1. Två olika vallar, en extensivt skött permanent gräsvall och en intensivt skött gräs-klövervall i konventionell växtföljd användes i försöket. Från varje vall togs en förstaskörd vid tre olika tillfällen under 2008: 27 maj, 25 juni och 13 augusti. Inför varje skörd togs prognosprover på grönmassan för uppskattning av energiinnehåll. Prognosproverna visade ett energivärde på ca 12, 10 och 8 MJ per kg ts för respektive skörd. Prognosanalyser görs med NIR-teknik, varför dessa energivärden får ses som ungefärliga uppskattningar. När grönmassan förtorkats till ca 50 % ts lades den in i försökssilor rymmande 25 l. I samband med inläggningen togs prover på grönmassan för analys av kemisk och mikrobiologisk sammansättning. Efter 120 dagars konservering öppnades silorna och prov togs ut för analys av kemisk och mikrobiologisk sammansättning, samt för test av hösilagets aeroba lagringsstabilitet via temperaturmätning i kontrollerad miljö. För beskrivning av använda analysmetoder, se Müller (2009a), där försöket är redovisat i sin helhet.

År 2

Ett balförsök kopplat till ett utfodringsförsök utfördes år 2. En gräsdominerad vall med inslag av rödklöver användes för produktion av hösilage i balar, och en förstaskörd togs vid tre olika skördetidpunkter under 2009: 8 juni, 2 juli och 5 augusti. Inför varje skörd togs prognosprover på grönmassan för uppskattning av energiinnehåll. Prognosproverna visade ett energivärde på ca 11, 9 och 7 MJ per kg ts för respektive skörd. Även dessa prognosanalyser gjordes med NIR-teknik och bör därför ses som ungefärliga. Slåttern genomfördes med strängläggning av grönmassan i breda strängar. Grönmassan vändes därefter en till två gånger innan strängläggning och pressning. I samband med slåtter och pressning provtogs grönmassan i fält för analys av kemisk och mikrobiologisk sammansättning. Därefter pressades konventionella rundbalar som plastades in med 10 lager vit sträckfilm med 50 % överlappning och 70 % försträckning. Balarna förflyttades sedan (efter vägning och mätning) från produktionsplatsen (Kungsängens forskningscentrum) till Jällaskolan, Uppsala, där utfodringsförsöket utfördes. Tolv av Jällaskolans hästar delades in i tre grupper om fyra hästar per grupp. Varje grupp utfodrades sedan med juni-, juli- och augustihösilaget i ett change-overförsök om tre perioder, så att alla hästar hade utfodrades med samtliga tre vallfoder vid försökets slut. Varje period omfattade tre veckor, varav de första två veckorna var adaptationsperiod och den sista veckan var mätperiod. Försöket fick etiskt godkännande från Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (C 241/9) innan det påbörjades. Munhåleinspektion (och vid behov tandkorrigering) samt avmaskning utfördes ca 3 veckor innan försöket startade. I anslutning till försöksstarten undersöktes hästarna kliniskt, och därefter uppskattades hull och vikt enligt Staun (1966) en

gång per vecka under hela försöket, för att fodergivan skulle kunna justeras efter upp- eller nedgång i hull och uppskattad vikt hos hästarna.

Balarna täthetsmättes och hösilaget provtogs för analys av mikrobiologisk och kemisk sammansättning innan öppning. En beskrivning av samtliga använda analysmetoder återges i Müller (2009a). I öppnade balar mättes temperaturen dagligen (mått på aerob förskämning). En utökning av de mikrobiella analyserna gjordes också, då förekommande mögelsvampar i både grönmassa och hösilage isolerades och renodlades samt DNA-sekvenserades för bestämning av släkte/art. Dessutom isolerades mögelsvampDNA direkt från foderprovet utan föregående uppodling (Stewart & Via, 1993) för vidare analys via 454-sekvensering (O'Brien *et al.*, 2005). DNA-sekvensering och 454-sekvensering är i skrivande stund pågående, dels pga av att prover från andra projekt har inväntats (vilket ger en betydligt lägre analyskostnad så att fler prov kan analyseras), dels pga pågående utveckling med primers för 454-sekvensering. Primerkombinationerna ITS1F och ITS4 eller ITS9 har hittills gett fyra klonbibliotek som ligger till grund för den förestående 454-sekvenseringen av samtliga foderprover från försöket år 2. Den primerkombination som inväntats ger mycket större tillförlitlighet jämfört med de primers som tidigare använts i denna typ av analyser. Eftersom denna typ av prover inte analyserats med denna metodik tidigare krävs en del utvecklingsarbete innan säkra resultat kan återges. Preliminära resultat påvisar dock att det förekommer DNA från svampar i foderproven som inte har kunnat påvisas vid mikrobiologisk odling av samma prov, och detta är överensstämmande med tidigare studier (Skouboe *et al.*, 1996). I kommande vetenskaplig publikation kommer resultatet från den mikrobiologiska odlingen med tillhörande sekvensering av alla kolonier att jämföras med resultat från 454-sekvenseringen av svampDNA som isolerats direkt från foderprovet utan föregående odling. TRFLP-analys (som angavs i ansökan) valdes bort som metod efter samråd med Professor Dan Funck Jensen, Inst. för Skoglig Mykologi och Patologi. SLU, Uppsala, då denna metod i nuläget betraktas som något förlegad i jämförelse med t ex 454-sekvensering (som är en variant av pyrosekvensering). På detta analysområde har metodutvecklingen gått mycket fort de senaste åren och vi har valt att inte använda en metod som riskerar att vara inaktuell inom kort.

Hästarnas träck provtogs dagligen under mätveckan. Träck-pH mättes direkt på pressvätska med en portabel pH-meter, medan analys av flyktiga fettsyror (VFA inkluderande ättiksyra, propionsyra, *i*- och *n*- smörsyra, *i*- och *n*-valeriansyra), mjölksyra, partikelstorlek och saltsyraolöslig aska (AIA, markör för smältbarhet) gjordes på träckprov som frystes direkt efter provtagning. Mjölksyra och VFA analyserades med HPLC-metodik, och partikelstorlek (redovisas ej i denna rapport av utrymmesskäl) enligt beskrivning av Müller (2009b). Mängden saltsyraolöslig aska i foder och träck bestämdes och vallfodrens smältbarhet uppskattades enligt Bergero *et al.* (2009). Smältbarhetsmätningen var ej med i ansökan men kunde inkluderas utan merkostnad då en agronomstudent involverades i projektet.

Hästarnas ätbeteende registrerades dagligen via direkt observation under mätveckan i samband med eftermiddagsutfodring. Ättid (min/kg ts), tugghastighet (antal tuggningar/min) och sväljhastighet (antal sväljningar/min) observerades, medan antalet tuggningar/sväljning och antalet tuggningar och sväljningar per kg ts beräknades.

Statistisk bearbetning

Samtliga resultat har bearbetats statistiskt med hjälp av variansanalys i SAS 9.1 för Windows. Data från år 1 och år 2 har analyserats var för sig. Skillnader i mikrobiologisk och biokemisk sammansättning i grönmassa och hösilage mellan skördetidpunkterna, samt skillnader i hösilagets aeroba lagringsstabilitet mellan skördetidpunkterna analyserades med SAS General Linear Models Procedure. Skillnader i hästarnas ätbeteende och digestion mellan

skördetidpunkterna analyserades med SAS Mixed Models Procedure med hänsyn tagen till att upprepade mätningar gjorts på hästarna. Korrelationer och korrelationskoefficienter beräknades med SAS Correlation Procedure.

Resultat

År 1

Grönmassans mikrobiologiska sammansättning förändrades med tilltagande skördetidpunkt, då antalet jäst, mögel och enterobakterier var lägst i maj och ökade med tilltagande botaniskt utvecklingsstadium, medan antalet mjölksyrabakterier och antalet mögelarter var högre endast i augusti (tabell 1). Senare skördetidpunkt resulterade också i högre antal jästsvampar och mjölksyrabakterier i det färdiga hösilaget, medan antalet enterobakterier minskade (tabell 2). Båda valltyperna uppvisade liknande mönster för både grönmassa och hösilage (tabell 2). Grönmassans kemiska sammansättning och hösilagens näringsinnehåll analyserades men redovisas ej i denna rapport av utrymmesskäl, utan kan återfinnas i Müller (2009a). Hösilagens biokemiska sammansättning redovisas i tabell 3. Skillnader mellan skördetidpunkterna återfanns för samtliga variabler även om de var små, med undantag för etanolhalten som var betydligt lägre i augustihösilaget. Den aeroba lagringsstabiliteten (antal dagar innan temperaturmaximum) var längre för augustihösilage (189 h) än för maj- (152 h) och juni- (131 h) hösilage (P=0.005).

Tabell 1. Mikrobiologisk sammansättning i grönmassa år 1, log CFU/g grönmassa om inte annat anges

Behandling	Jäst	Mögel	Klostridie-sporer	Entero-bakterier	Mjölksyra-bakterier	Antal mögelarter
<i>Skördetidpunkt</i>						
Maj	1.41 ^A	1.56 ^A	1.4 [§]	3.39 ^A	1.62 ^A	1.2 ^A
Juni	2.65 ^B	2.50 ^B	1.4 [§]	4.23 ^B	1.81 ^A	2.3 ^A
Augusti	3.69 ^C	3.71 ^C	1.4 [§]	5.83 ^C	3.51 ^B	3.7 ^B
<i>Valltyp</i>						
Extensiv vall	2.65	2.78	1.4 [§]	4.22	2.43	2.7
Intensiv vall	2.51	2.40	1.4 [§]	4.75	2.20	2.1
<i>Interaktioner</i>						
Extensiv vall maj	1.41 ^a	1.54	1.46	3.33	1.75	1.3 ^{a,c}
Extensiv vall juni	2.91 ^c	2.83	1.4 [§]	4.00	1.84	1.8 ^{a,c}
Extensiv vall augusti	3.63 ^b	3.96	1.4 [§]	5.32	3.70	4.8 ^b
Intensiv vall maj	1.40 ^a	1.58	1.4 [§]	3.45	1.50	1.0 ^c
Intensiv vall juni	2.39 ^d	2.16	1.4 [§]	4.47	1.77	2.7 ^a
Intensiv vall augusti	3.74 ^b	3.47	1.50	6.33	3.33	2.5 ^{a,c}
<i>Signifikansnivåer</i>						
P skördetidpunkt	<0.0001	<0.0001	0.27	<0.0001	<0.0001	0.0007
P valltyp	0.16	0.02	0.82	0.04	0.25	0.20
P interaktion	0.03	0.14	0.16	0.37	0.81	0.03
skördetidpunkt x valltyp						

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn för interaktionen skördetidpunkt x valltyp anger skillnad vid det angivna P-värdet.

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma kolumn för skördetidpunkt anger skillnad vid det angivna P-värdet.

[§] Halva lägsta detektionsgränsen.

Tabell 2. Mikrobiologisk sammansättning i hösilage år 1, log CFU/g om inte annat anges

Behandling	Jäst	Mögel	Klostridie-sporer	Entero-bakterier	Mjölksyra-bakterier	Antal mögelarter
<i>Skördetidpunkt</i>						
Maj	3.46 ^A	1.37	1.60	1.74 ^A	4.33 ^A	0.1
Juni	4.38 ^B	<1.2 [§]	<1.40 [§]	<1.40 ^{B, §}	4.78 ^A	-
Augusti	5.23 ^C	1.53	1.63	<1.40 ^{B, §}	6.63 ^B	0.1
<i>Valltyp</i>						
Extensiv vall	4.30	1.31	1.54	1.52	4.59	0.1
Intensiv vall	4.41	1.42	1.55	1.51	5.91	0.1
<i>Interaktioner</i>						
Extensiv vall maj	3.17 ^a	1.54	1.58	1.76	3.39	0.2
Extensiv vall juni	3.86 ^{a,c,e}	<1.20 [§]	<1.4 [§]	<1.4 [§]	4.26	-
Extensiv vall augusti	5.87 ^b	<1.20 [§]	1.62	<1.4 [§]	6.11	-
Intensiv vall maj	3.76 ^{a,e}	<1.20 [§]	1.62	1.73	5.27	-
Intensiv vall juni	4.90 ^{b,c,d}	<1.20 [§]	<1.4 [§]	<1.4 [§]	5.31	-
Intensiv vall augusti	4.59 ^{d,e}	1.85	1.63	<1.4 [§]	7.15	0.2
<i>Signifikansnivåer</i>						
P skördetidpunkt	0.0003	0.56	0.23	<0.0001	<0.0001	0.61
P valltyp	0.71	0.67	0.89	0.87	<0.0001	1.00
P interaktion	0.01	0.26	0.98	0.97	0.36	0.24
skördetidpunkt x valltyp						

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn för interaktionen skördetidpunkt x valltyp anger skillnad vid det angivna P-värdet.

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma kolumn för skördetidpunkt anger skillnad vid det angivna P-värdet.

[§] Halva lägsta detektionsgränsen.

Tabell 3. Kemisk sammansättning (g/kg ts om inte annat anges) i hösilage år 1

Behandling	Torrsubstans g/kg	pH	Mjölksyra	Ättiksyra	2,3-butandiol	Etanol	AmmoniakN g/kg total N
<i>Skördetidpunkt</i>							
Maj	445 ^A	5.64 ^A	0.6 ^A	1.1 ^A	0.3 ^A	20.3 ^A	0.17 ^A
Juni	512 ^B	5.36 ^B	9.8 ^B	1.7 ^B	1.5 ^B	24.5 ^A	0.49 ^B
Augusti	545 ^C	5.31 ^C	6.2 ^C	2.1 ^B	1.7 ^B	7.7 ^B	0.47 ^B
<i>Valltyp</i>							
Extensiv vall	516	5.39	4.7	1.2	1.1	19.9	0.31
Intensiv vall	485	5.49	6.3	2.0	1.2	15.1	0.44
<i>Interaktioner</i>							
Extensiv vall maj	444 ^a	5.55 ^a	0.6 ^a	1.0 ^a	0.3 ^a	24.4	0.15 ^a
Extensiv vall juni	513 ^b	5.03 ^c	12.2 ^c	1.8 ^{b,d}	2.6 ^b	26.2	0.52 ^c
Extensiv vall augusti	592 ^c	5.59 ^{a,b}	1.4 ^a	0.9 ^{a,d}	0.5 ^a	9.2	0.27 ^b
Intensiv vall maj	446 ^a	5.73 ^b	0.5 ^a	1.2 ^{a,d}	0.3 ^a	16.3	0.19 ^{a,b}
Intensiv vall juni	510 ^b	5.69 ^{a,b}	7.5 ^b	1.7 ^{b,d}	0.3 ^a	22.7	0.46 ^c
Intensiv vall augusti	498 ^b	5.03 ^c	11.0 ^{b,c}	3.3 ^c	2.9 ^b	6.3	0.67 ^d
<i>Signifikansnivåer</i>							
P skördetidpunkt	<0.0001	0.0001	<0.0001	0.001	0.0007	<0.0001	<0.0001
P valltyp	0.002	0.05	0.19	0.0004	0.87	0.01	0.0004
P interaktion	0.0002	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.37	<0.0001
skördetidpunkt x valltyp							

^{a,b,c,d} Olika bokstäver inom samma kolumn för interaktionen skördetidpunkt x valltyp anger skillnad vid det angivna P-värdet.

^{A,B,C} Olika bokstäver inom samma kolumn för skördetidpunkt anger skillnad vid det angivna P-värdet.

År 2

Grönmassans mikrobiologiska sammansättning år 2 redovisas i tabell 4. Antalet jästsvampar, mjölktsyrebakterier och enterobakterier i grönmassan ökade med tilltagande utvecklingsstadium (tabell 4). I hösilaget resulterade en senare skördetidpunkt också i högre antal jäst, mögel, mjölktsyrebakterier, enterobakterier och antal mögelarter (tabell 5).

Grönmassans kemiska sammansättning år 2 redovisas ej här av utrymmesskäl, men kommer att redovisas i vetenskaplig artikel (under bearbetning). Hösilagets kemiska sammansättning och näringsinnehåll redovisas i tabell 6. Andelen rödklöver i vallen ökade med tilltagande botaniskt utvecklingsstadium, vilket bl a förklarar den upprätthållna råproteinhalten i augustihösilaget (tabell 6). Skördetidpunkten påverkade flertalet fermentationsvariabler, men de skillnader som fanns var små (tabell 6).

Tabell 4. Mikrobiologisk sammansättning i grönmassa år 2, log CFU/g om inte annat anges

Variabel	Junihösilage	Julihösilage	Augustihösilage	SE	P
Jäst	1.65 ^a	6.45 ^b	7.42 ^c	0.143	<0.0001
Mögel	1.89 ^a	2.49 ^b	2.11 ^{a,b}	0.146	0.02
Klostridiesporer	1.48	1.43	1.61	0.106	0.43
Mjölktsyrebakterier	1.38 ^a	2.03 ^b	2.59 ^c	0.175	<0.0001
Enterobakterier	3.50 ^a	5.21 ^b	6.64 ^c	0.205	<0.0001
Antal mögelarter	2	2	3	0.5	0.14

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

Tabell 5. Mikrobiell sammansättning i hösilage år 2, log CFU/g om inte annat anges

Variabel	Junihösilage	Julihösilage	Augustihösilage	SE	P
Jäst	4.96 ^a	6.34 ^b	6.53 ^b	0.221	<0.0001
Mögel	1.26 ^a	1.66 ^{a,b}	2.04 ^b	0.170	0.01
Klostridiesporer	1.64	1.74	1.72	0.128	0.85
Mjölktsyrebakterier	4.53 ^a	5.69 ^b	6.52 ^c	0.235	<0.0001
Enterobakterier	1.48 ^a	1.74 ^a	4.30 ^b	0.318	<0.0001
Antal mögelarter	<1 ^a	1 ^a	2 ^b	0.3	0.002

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

Tabell 6. Kemisk sammansättning i hösilage år 2, g/kg ts om inte annat anges

Variabel	Junihösilage	Julihösilage	Augustihösilage	SE	P
Torrsubstans, g/kg	549	573	583	10.8	0.09
Aska	75	71	70	1.5	0.08
Råprotein	130 ^a	93 ^b	80 ^c	3.6	<0.0001
Beräknat smältbart råprotein	91 ^a	56 ^b	44 ^c	3.4	<0.0001
Neutral detergent fiber	522 ^a	610 ^b	637 ^c	9.0	<0.0001
Sur detergent fiber	300 ^a	385 ^b	422 ^c	4.0	<0.0001
Lignin	56 ^a	85 ^b	100 ^c	2.4	<0.0001
Fri glukos	41 ^a	37 ^a	19 ^b	1.4	<0.0001
Fri fruktos	55 ^a	32 ^b	19 ^c	1.9	<0.0001
Sukros	1 ^a	1 ^a	4 ^b	0.7	0.0025
Fruktaner	5 ^a	3 ^b	7 ^c	0.6	<0.0001
Totala lättlösliga kolhydrater (beräknade)	101 ^a	73 ^b	49 ^c	3.2	<0.0001
<i>In vitro</i> smältbar organisk substans, %	87 ^a	69 ^b	61 ^c	0.53	<0.0001
Beräknad omsättbar energi för hästar, MJ/kg ts	12.4 ^a	9.1 ^b	7.7 ^c	0.10	<0.0001
Kalcium	7.1 ^a	7.3 ^a	8.7 ^b	0.41	0.0165
Fosfor	1.7 ^a	1.3 ^b	1.0 ^c	0.05	<0.0001
Magnesium	1.5	1.5	1.7	0.11	0.37
Andel rödklöver	0.003 ^a	0.036 ^a	0.262 ^b	0.0385	0.0001
<i>Fermentationsvariabler</i>					
Mjölksyra	5.2	4.6	7.6	0.88	0.053
Ättiksyra	0.1 ^a	0.9 ^b	2.5 ^c	0.25	<0.0001
AmmoniakN, g/kg totalN	0.013 ^a	0.016 ^a	0.026 ^b	0.0022	0.0009
Etanol	11.0 ^a	6.1 ^b	3.5 ^b	1.15	0.0004
pH	5.79 ^a	5.73 ^a	6.10 ^b	0.033	<0.0001

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

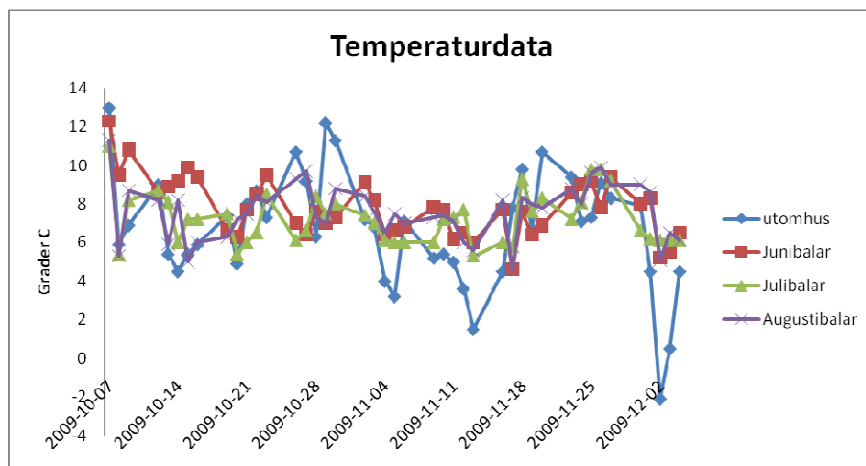
Skördetidpunkten inverkade också på balvariabler (tabell 7). Baldensiteten (kg ts/m³) var lika för juni- och augustibalar medan julibalar hade lägst baldensitet. Viktsförlusterna under lagring var dock lägst för julibalarna. Den aeroba lagringsstabiliteten hos öppnade balar redovisas i figur 1. Temperaturen i balarna från de olika skördetidpunkterna var lika under hela försöksperioden.

Hösilagets skördetidpunkt påverkade hästarnas ätbeteende och ättid (tabell 8). Vid utfodring med junihösilaget uppvisade hästarna kortast ättid och högst antal tuggningar och sväljningar per minut, medan antalet tuggningar per kg ts och antal tuggningar per sväljning var lägst. Detta innebär sammantaget att junihösilaget konsumerades fortare än juli- och augustihösilaget. Korrelationer mellan ätbeteendevariabler och fiberinnehåll (NDF, ADF, lignin) i hösilaget fanns men hade endast medelstarka korrelationskoefficienter (0.43-0.66). Dessa korrelationer detaljredovisas ej här av utrymmesskäl, men kommer att finnas med i kommande vetenskaplig artikel (se Publikationer). Ätbeteendevariablerna var också olika starkt korrelerade sinsemellan, och den högsta korrelationskoefficienten, som var 0.94 (P<0.0001), återfanns mellan ättid (min/kg ts) och antalet tuggningar/kg ts.

Tabell 7. Balvariabler för hösilage skördat i juni, juli och augusti

Variabel	Junihösilage	Julihösilage	Augustihösilage	SE	P
Balvikt, kg	456 ^a	388 ^b	375 ^b	6.7	<0.0001
Balvolym, m ³	1.79 ^a	1.75 ^a	1.63 ^b	0.028	0.0002
Baldensitet, kg ts/m ³	145 ^a	126 ^b	144 ^a	4.9	0.01
Täthet, s	175	316	243	61.6	0.25
Viktsförlust under lagring, kg	4.8 ^a	1.5 ^b	6.2 ^c	0.45	<0.0001
Mängd kasserat foder, kg	0.03	0.40	0.75	0.441	0.46

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.



Figur 1. Omgivande temperatur och baltemperatur under aerob lagring efter balöppning. Det fanns inga skillnader i baltemperatur mellan skördetidpunkter (P>0.31) eller dagar efter öppning (P> 0.65), och inte heller några interaktioner mellan skördetidpunkt och dag efter öppning (P>0.67).

Tabell 8. Ättid och ätbeteende hos hästar som utfodrats med hösilage skördat i juni, juli och augusti

Variabel	Junihösilage		Julihösilage		Augustihösilage		P
	Medel	stdavv	Medel	stdavv	Medel	stdavv	
Ättid, min/kg ts	29 ^a	4.4	37 ^b	7.4	36 ^b	9.8	<0.0001
Tuggningar/min	84 ^a	5.9	78 ^b	6.3	77 ^b	7.4	<0.0001
Sväljningar/min	1.9 ^a	0.46	1.3 ^b	0.48	1.2 ^b	0.43	<0.0001
Tuggningar/sväljning	51 ^a	11.7	65 ^b	22.7	81 ^c	34.4	<0.0001
Tuggningar/kg ts	2472 ^a	388.0	2947 ^b	546.5	2969 ^b	660.1	<0.0001
Sväljningar/kg ts	50	12.1	50	13.6	45	15.9	0.18

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

Hösilagens skördetidpunkt påverkade också hästarnas digestion (tabell 9). Halten ättiksyra, propionsyra, smörsyra och total VFA var högst och pH lägst i faeces då junihösilaget utfodrades. Proportionerna acetat:propionat:butyrat:valerat i faeces var 68:16:14:1 när junihösilaget utfodrades, 70:14:15:2 när julihösilaget utfodrades och 72:11:15:2 när augustihösilaget utfodrades. Ingen mjölksyra kunde detekteras i några faecesprover. Hösilagens smältbarhet (uppskattade med AIA) var alla olika och var högst för junihösilaget och lägst för augustihösilaget (tabell 9). Träckens torrsustanshalt påverkades ej av vilket hösilage hästen utfodrades med (tabell 9).

Tabell 9. Träckkaraktistika hos hästar som utfodrats med hösilage skördat i juni, juli och augusti, samt koncentration av saltsyraolöslig aska (AIA) i foder och träck för uppskattning av fodrets smältbarhet

Variabel	Junihösilage		Julihösilage		Augustihösilage		P
	Medel	stdavv	Medel	stdavv	Medel	stdavv	
Torrsubstans, g/kg	203	25.2	195	20.6	210	10.7	0.055
Aska, g/kg ts	117 ^a	14.7	90 ^b	13.0	80 ^c	13.2	<0.0001
pH	6.27 ^a	0.227	6.65 ^b	0.303	6.83 ^c	0.147	<0.0001
Ättiksyra, mM	37.8 ^a	6.29	29.4 ^b	6.78	27.6 ^b	3.90	<0.0001
Propionsyra, mM	8.8 ^a	3.20	5.7 ^b	3.32	4.4 ^c	1.81	<0.0001
<i>i</i> -Smörsyra, mM	2.3	1.09	2.1	1.06	1.8	1.20	0.48
<i>n</i> -Smörsyra, mM	5.6 ^a	1.03	4.3 ^b	0.92	4.0 ^b	0.35	<0.0001
<i>i</i> -Valeriansyra, mM	0.2	0.34	0.2	0.37	0.1	0.01	0.24
<i>n</i> -Valeriansyra, mM	0.4	0.37	0.5	0.33	0.5	0.37	0.59
Total VFA, mM (beräknad)	55.2 ^a	10.61	42.1 ^b	11.48	38.4 ^b	5.85	<0.0001
Koncentration AIA, g/kg ts i totalfoderstaten	14 ^a	0.6	20 ^b	5.4	23 ^c	7.0	<0.0001
Koncentration AIA, g/kg ts i faeces	58 ^a	11.6	50 ^b	10.5	42 ^c	15.1	0.0007
AIA smältbarhet	0.75 ^a	0.055	0.59 ^b	0.103	0.44 ^c	0.080	<0.0001

^{a,b,c} Olika bokstäver inom samma rad anger skillnad vid det angivna P-värdet.

Diskussion och slutsatser

Den epifytiska floran på gräs förändrades med tilltagande botaniskt utvecklingsstadium vid skörd både år 1 och år 2 i enlighet med vad tidigare studier påvisat (Pahlow, 1991; Behrendt *et al.*, 1997), bortsett från antalet klostridiesporer som inte verkade påverkas alls av skördetidpunkten. Förändringen i grönmassans mikrobiologiska sammansättning verkade dock påverka det färdiga hösilagets mikrobiologi i begränsad omfattning, möjligen med undantag av enterobakterier och mögel. Behrendt *et al.* (1997) rapporterade att enterobakterier återfanns speciellt på förvuxet gräs, vilket också stöds av denna studie eftersom antalet enterobakterier var högst i grönmassan i augusti både år 1 och år 2. Det är dock fortfarande oklart om detta resulterar i högre halt enterobakterier i det färdiga fodret, eftersom de båda åren gav olika resultat i detta avseende. Det är också oklart vilken betydelse dessa enterobakterier har ur foderhygienisk synpunkt, då det är ett stort släkte med både patogena och icke-patogena arter (McDonald *et al.*, 1991). Enskilda arter går inte att urskilja med den analysmetod som används rutinmässigt i dagsläget. Antalet mögelarter i grönmassan ökade med tilltagande skördetidpunkt år 1 men inte år 2. Eftersom fortsatt analysarbete pågår med identifiering av mögelarter kan detta resultat bli annorlunda när de molekylärbiologiska analyserna är helt klara, särskilt som de preliminära resultaten påvisade DNA från mögelsvampar som inte kunde påvisas vid odling.

Antalet jästsvampar i både grönmassa och hösilage var högst vid de senaste skördetidpunkterna både år 1 och år 2. Detta verkade dock inte påverka hösilagets aeroba lagringsstabilitet i någon större utsträckning, då temperaturutvecklingen var densamma i hösilage från de olika skördetidpunkterna år 2. År 1 hade augustihösilaget dessutom längst aerob lagringsstabilitet trots att jästantalet också var högst. Jäst anses normalt sett vara

ansvariga för temperaturstegring och inledande förskämning i ensilage (Lindgren *et al.*, 1985). Det krävs alltså vidare studier av mikrobiologi och biokemi under aerob lagring av hösilage för att utröna vad som orsakar och sätter igång förskämningssprocessen.

Hösilagets fermentation påverkades i liten utsträckning av skördetidpunkten både år 1 och år 2, men etanolhalten var lägre i de hösilage som skördats i senast botaniskt utvecklingsstadium. Mängden mjölksyra verkade inte systematiskt påverkas av skördetidpunkten, men var generellt låg pga den restriktiva fermentationen i hösilaget (Jackson & Forbes, 1970; Müller, 2005). Enbart en sen skördetidpunkt verkar alltså inte vara orsaken till förhållandevis höga etanolhalter, och fortsatta studier är nödvändiga för att förstå varför etanol och inte mjölksyra ibland bildas som huvudsaklig fermentationsprodukt i inplastat vallfoder. Etanolbildning är inte önskvärt då det inte bidrar till konserveringen av fodret utan ger ts-förluster i form av CO₂ (McDonald *et al.*, 1991).

Hösilagets skördetidpunkt påverkade hästarnas digestion av fodret, då halten acetat, propionat, butyrat och totala mängden VFA i träcken var högst och pH lägst då hästarna utfodrades med junihösilage. Detta reflekterar att junihösilaget innehöll mer lättsmälta växtdelar jämfört med juli- och augustihösilage. Som parallell kan nämnas att propionathalten i hästens tarm påvisats öka och pH-värdet minska vid utfodring med ökande mängd kraftfoder (som är mer lättsmält) i foderstaten (*e.g.* de Fombelle *et al.*, 2003). Junihösilaget hade också högst och augustihösilaget lägst smältbarhet enligt den uppskattning som gjordes med AIA-metodik även om utfodringsnivån kan ha påverkat detta resultat (*e.g.* Ragnarsson & Lindberg, 2009), eftersom hästarna utfodrades isoenergetiskt och därmed med mer augusti- och julihösilage än junihösilage per dygn. En ökad utfodringsnivå av vallfoder kan påverka smältbarheten negativt hos häst (Ragnarsson & Lindberg, 2009), så trots att det är rimligt att anta att smältbarheten för hösilagen avtog med ökande botaniskt utvecklingsstadium vid skörd, är det möjligt att det uppskattade värdet på smältbarheten också påverkats av den relativt höga utfodringsnivån för framför allt augustihösilaget.

Hästarnas ättid och ätbeteende påverkades också av hösilagets skördetidpunkt, då ättiden var kortast för junihösilaget medan juli- och augustihösilaget åts upp lika fort. Även hästarnas ätbeteende (antalet tuggningar och sväljningar per minut, antalet tuggningar/sväljning etc) visade att junihösilaget konsumerades fortare än juli- och augustihösilaget. Korrelationsanalyser mellan ätbeteende/ättid och komponenter i foder som kan tänkas påverka ättid och ätbeteende (t ex fiberinnehåll) påvisade måttliga samband (korrelationskoefficienter på 0.43-0.66), i likhet med resultat från *e.g.* Lawrence *et al.* (2001) som fann ett r²-värde på 0.50 för sambandet mellan NDF-halt i vallfoder och konsumerad mängd vallfoder hos hästar. Vilka foderrelaterade faktorer/komponenter som styr konsumtion och intag av vallfoder hos hästar är alltså fortfarande inte kända, men från denna studie kan slutsatsen dras att vallväxternas botaniska utvecklingsstadium spelar roll. Mer kunskap behövs om dessa faktorer och deras samspel med olika kategorier av hästar, då ättiden är viktig för alla hästars välbefinnande oavsett om utgångspunkten är en lätt- eller svårködd häst.

Publikationer

En vetenskaplig artikel (Müller, 2009a) har publicerats från den första delen av studien (år 1). Eftersom alla analyser från år 2 blev klara först i april 2010 har ytterligare publikationer ännu inte hunnit bearbetas tillräckligt mycket för att kunna skickas till tidskrifter, men minst tre artiklar till planeras och är under bearbetning. Preliminära titlar för dessa är; "Equine ingestion and digestion of haylage harvested at different plant maturities", "Effect of primary growth plant maturity at harvest on conservation of haylage" och "Analysis of moulds in grass and haylage using microbial cultivation and DNA-based molecular techniques". Eventuellt kan ytterligare en artikel (gällande konservering och förluster) sammanställas. Preliminära resultat kommer också att presenteras på följande konferenser under 2010:

European Workshop of Equine Nutrition, Cirencester, UK; European Grassland Federation, Kiel, Tyskland; 1st Nordic Feed Science Conference, Uppsala. Dessutom har en agronomstudent involverats i projektet och denne skriver för närvarande sitt examensarbete (Masteruppsats) om smältbarhet mätt med AIA-metodik på häst.

Övrig resultatförmedling till näringen

En populärvetenskaplig artikel är under bearbetning till Foderbladet häst, och flera planeras till Foderbladet Häst, Hästmagazinet, EquiLibris, Hästfocus m fl. I samband med publicering av slutrapport kommer även en sammanfattning att publiceras på institutionens hemsida www.huv.slu.se och information om projektet och resultaten kommer fortlöpande att inkluderas i information och undervisning från institutionen.

Referenser

- Behrendt, U., Müller, T., Seyfarth, W.** 1997. The influence of extensification in grassland management on the populations of microorganisms in the phyllosphere of grasses. *Microbiological Research* 152, 75-85.
- Bergero, D., Préfontaine, C., Miraglia, N., Peiretti, P.G.** 2009. A comparison between the 2N and 4N HCl acid insoluble ash methods for digestibility trials in horses. *Animal* 3, 1728-1732.
- Cuddeford, D.** 2005. *Voluntary food intake by equids*. In: Proceedings Equine Nutrition Conference, Hannover 1-2 October 2005, Germany. *Pferdeheilkunde* 21, 7-8.
- Field, M., Wilman, D.** 1996. pH in relation to dry matter content in clamped and baled grass silages harvested in England and Wales. In: *Proceedings of the XIth International Silage Conference, Aberystwyth, Wales, UK*. pp. 126-127.
- de Fombelle, A., Varloud, M., Goachet, A-G., Jacotot, E., Philippeau, C., Drogoul, C., Julliand, V.,** 2003. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Animal Science* 77, 293-304.
- Hopkins, A.** (ed). 2000. *Grass – it's production and utilization*. 3rd ed. British Grassland Society, Blackwell Science, UK. pp. 140-143.
- Jackson, N., Forbes, T.J.** 1970. The voluntary intake by cattle of four silages differing in dry matter content. *Animal Production* 12, 591-599.
- Lawrence, A.C. St., Lawrence, L.M., Coleman, R.J.** 2001. Using an empirical equation to predict voluntary intake of grass hays by mature equids. *Proc. 17th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, Kentucky, USA, pp. 99-100.
- Lindgren, S., Pettersson, K., Kaspersson, A., Jonsson, A., Lingvall, P.** 1985. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 765-774.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E.** 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publications, UK.
- Müller, C. E.** 2005. Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as a feed for horses. *Grass and Forage Science*, 60, 109-118.
- Müller, C.E.** 2009a. Influence of harvest date of primary growth on microbial flora of grass herbage and haylage, and on fermentation and aerobic stability of haylage conserved in laboratory silos. *Grass and Forage Science* 64, 328-338.
- Müller, C.E.** 2009b. Long-stemmed vs. cut haylage in bales - Effects on fermentation, aerobic storage stability, equine eating behaviour and characteristics of equine faeces. *Animal Feed Science and Technology* 152, 307-321.
- NRC,** 2007. Nutrient requirements of horses. 6th revised edition. Animal Nutrition Series, National Research Council of the National Academies. The National Academies Press, Washington, D.C., USA.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M. and Vilgalys, R.** 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71,5540-5550.
- Pahlow, G.** 1991. Role of microflora in forage conservation. In: *Forage Conservation towards 2000. Landbauforschung Völkenrode, Braunschweig –Völkenrode (FAL)*. (Eds. Pahlow, G. & Honig, H). Sonderheft 123. pp. 26-36.
- Persson, P.** 2005. Kartläggning och analys av hästverksamheten i Sverige (In Swedish). Rapport, samordningsenheten. Jordbruksverket, Jönköping. ISSN 1102-3007.
- Ragnarsson, S., Lindberg, J.E.** 2009. Impact of feeding level on digestibility of a haylage-only diet in Icelandic horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, DOI: 10.1111/j.1439-0396.2009.00947.x
- Skouboe, P., Frisvad, J.C., Taylor, J.W., Lauritsen, D., Boysen, M. and Rossen, L.** 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycology Research* 103: 873-881.
- Slottner, D., Bertilsson, J.** 2006. Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 127, 101-111.
- Staub, H.** 1966. Forsøg med heste. Bilag. Forsøgsstab. Efterårsm. 1966, 102-107.
- Stewart C.N. Jr., Via, L.E.** 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD finger-printing and other PCR applications. *BioTechniques* 14, 748-758.
- Williams, A.G.** 1994. The permeability and porosity of grass silage as affected by dry matter. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 59, 133-140.