

Är ensilage vägen till minskad förekomst av *Campylobacter* hos ekologisk slaktkyckling?

Projektansvarig: Helena Wall¹

Projektgrupp: Eliška Valecková¹, Emma Ivarsson¹, Kamyar Mogodiniyai Kasmaei¹, Patrik Ellström² och Helen Wang²

¹ Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet

² Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala Universitet

Kontakt: Helena.Wall@slu.se, 018-671670

Sammanfattning

Campylobacter är en bakterie som orsakar tarminfektioner med kraftig diarré hos människor. Det är vår vanligaste zoonos och kyckling är den främsta smittkällan. Ekologiska kycklingars utevistelse medför att de i högre utsträckning är bärare av *Campylobacter* än konventionella kycklingar. Ensilerat grovfoder innehåller höga halter av mjölksyrabakterier som i andra studier visat förmåga att inhibera *Campylobacter* bakteriens tillväxt via produktion av organiska syror, t.ex. mjölksyra som sänker pH i tarmen, eller via produktion av bakteriociner (peptider med antimikrobiell effekt). *Lactobacillus spp.* förändrar även tarmfloras sammansättning, vilket kan vara avgörande för möjligheten för *Campylobacter* att kolonisera tarmen. I en förstudie utvärderades flera olika stammar av laktobaciller. Utifrån bakteriernas förmåga att växa i gräs/klöverensilage och inhibera *Campylobacter jejuni* fastslogs att *L.plantarum* LP256 var den bäst lämpade laktobacillen att utvärdera vidare.

Ett 63 dagar långt försök med långsamväxande kycklingar av hybriden Rowan Ranger genomfördes vid SLU. Kycklingarna tilldelades från dag 1 en av följande foderblandningar: **Kontroll** – enbart ekologiskt pelleterat foder; **Ensilage** – det pelleterade fodret med en inblandning av 15 % ensilage inokulerat med *L.plantarum* LP256; **Hösilage** – det pelleterade fodret med en inblandning av 15 % hösilage eller **LP256** – *L. plantarum* LP256 tillsatt i vattnet. Ensilaget och hösilaget hackades till en längd på ca 0,5 – 1 cm innan de blandades med det pelleterade fodret. Vid 28 dagars ålder infekterades alla kycklingar via dricksvattnet med *C.jejuni*.

Kycklingarna växte normalt och det var inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna avseende tillväxt, foderintag eller dödlighet. Det genomsnittliga dagliga intaget per kyckling av ensilage motsvarade 10 % av totala foderintaget. För grupperna som gavs hösilage blandat med sitt foder motsvarade intaget 8 % av det dagliga foderintaget. Grovfodren stimulerade kycklingarnas muskelmagar och därmed ökade vikten på muskelmagen i förhållande till kroppsvikten. Tyvärr sågs ingen effekt av utfodring med ensilage eller tillsats av *L. plantarum* LP256 i dricksvattnet på utsöndringen av *C.jejuni* i kycklingarnas träck eller på koncentrationen av *C.jejuni* i blindtarmarna. Sannolikt var intaget av ensilage för lågt för att laktobacillerna skulle ge en märkbar påverkan på *C.jejuni*.

En alternativ möjlighet att tillföra laktobaciller till kycklingen på naturlig väg kan vara via ensilerad spannmål. Då vete utgör merparten av svenska kycklingars foderstat är förutsättningarna för ett högre dagligt intag av laktobaciller sannolikt bättre om de tillförs via vete jämfört med gräsensilage. Projektet avslutades med en utvärdering på laboratorium av tänkbara kandidater av laktobaciller vid ensilering av spannmål. Preliminära resultat tyder på att en utvärdering av effekten av utfodring med ensilerad vete till kycklingar koloniserade med *C. jejuni* skulle vara intressant att genomföra.

Summary

Campylobacteriosis is the most commonly reported zoonosis in the EU and large parts of the world, and poultry is the major source of human infection. The prevalence of *Campylobacter* is higher in organic flocks than in conventional since organic chickens are partly reared outdoors. Previous studies have shown that intake of fermented feeds with high numbers of lactic acid producing bacteria (LAB) may reduce the survival of *Campylobacter* in the chick by different mechanisms. These mechanisms are: lowered pH in the gut due to production of organic acids; production of antimicrobial peptides (bacteriocines) by some LABs, and a general shift in the gut microbiota leading to a competitive exclusion of *Campylobacter*.

This project started with a laboratory study in which several different strains of LAB were evaluated regarding their ability to grow in grass/clover silage and whole crop maize silage, and to inhibit *Campylobacter jejuni*. Based on the outcome, *L. plantarum* LP256 was the most promising LAB to further evaluate in a trial with chicks.

A 63 days long trial with slow growing Rowan Ranger chicks was conducted at SLU. The chicks were as day old distributed on four treatments: **Control** – an organic pelleted feed; **Silage** – the pelleted feed mixed with 15% grass silage inoculated with *L. plantarum* LP256; **Haylage** – the pelleted feed mixed with 15% haylage; or **LP256** – *L. plantarum* LP256 added to the drinking water. Silage and haylage were chopped to a length of 0.5 to 1 cm before mixed with the pelleted feed. At 28 days of age all chicks were inoculated with *C. jejuni* distributed in their drinking water.

Chicks in all treatments had a normal growth, feed intake and mortality and there were no differences between the dietary treatments. The average daily intake of silage per chick and day corresponded to 10% of the total daily feed intake. Chicks provided with haylage had an average intake corresponding to 8% of their daily feed intake. Roughage stimulated the development of the gizzard, resulting in heavier relative gizzard weights. Unfortunately, neither intake of LAB via silage nor through water, were found to be effective interventions against *C. jejuni* colonization.

In Sweden, wheat is the major feed component for growing chicks. Wheat fermented with LAB could therefore be a way to achieve a high intake of LAB in a natural way. In the last part of this project, ten selected LAB strains were included in a lab study with fermented wheat, and evaluated based on their survival and possibility to inhibit *Campylobacter*. Preliminary results indicate that it would be of interest to evaluate fermented wheat as intervention against colonization with *Campylobacter*, in future projects.

Bakgrund

Campylobacter är en bakterie som orsakar tarminfektioner med kraftig diarré hos människor. Det är vår vanligaste zoonos och kyckling är den främsta smittkällan. Ekologiska kycklingar är i stor utsträckning bärare av *Campylobacter* eftersom utevistelsen innebär kontakt med smittkällor. Ensilerat grovfoder innehåller höga halter av mjölksyrabakterier vilka tidigare visats hämma *Campylobacter* på olika sätt. Den hämmande effekten kan bl.a. bero på att vissa typer av *Lactobacillus spp.* producerar ämnen som direkt inhiberar *Campylobacter* bakteriens tillväxt såsom organiska syror, t.ex. mjölksyra som sänker pH i tarmen, eller bakteriociner (peptider med antimikrobiell effekt). *Lactobacillus spp.* förändrar även tarmfloras sammansättning, vilket kan vara avgörande för förmågan hos *Campylobacter* att kolonisera tarmen. Alla ekologiska kycklingar ska ha daglig tillgång till grovfoder och ensilage används redan i viss utsträckning till ekologiska kycklingar i Sverige. I det här projektet undersökte vi om utfodring med ensilage är en framkomlig väg att reducera förekomsten av *Campylobacter* hos ekologiska kycklingar.

Material och metoder

Förstudie på laboratorium – val av ensilage och laktobacill

Under 2017 genomfördes en ensileringsstudie där gräsklövergrönmassa respektive helsädesmajs ensilerades på laboratorium vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV), SLU, se bild 1. De tre olika stammar av laktobaciller som valdes ut att ingå i studien var *L.plantarum* LP256, *L.plantarum* E-78076, samt *L.reuteri*. Av laktobacillerna som utvärderades var det endast *L.reuteri* som har förmåga att producera reuterin, vilket är en peptid med antibakteriell effekt (kallas även för bakteriocin). Bakterierna tillsattes i koncentrationen 10^5 CFU per gram färskt grovfoder. Efter 45 dagar avslutades ensileringen och vätskefasen (pressaften) från de olika ensilagen testades avseende förmågan att inhibera *Campylobacter jejuni* med så kallat MIC test. MIC står för minimal inhibitory concentration och är en metod i vilken den lägsta koncentrationen som krävs för att inhibera en bakterie fastställs. Utifrån resultaten i ensileringsstudien fastslogs att *L.plantarum* LP256 var den bäst lämpade laktobacillen att utvärdera vidare och att ensilage av gräsklöver var att föredra framför helsädesmajs.



Bild 1. I förstudien ensilerades helsädesmajs och gräs/klövervall på laboratorium vid HUV, SLU. Foto: Kamyar Mogodiniyai Kasmaei

Uvärdering av ensilage och hösilage i försök med kycklingar

Under hösten 2017 producerades ett gräsensilage inokulerat med 10^8 CFU *L. plantarum* LP256 per gram. Från samma vall och vid samma tidpunkt som ensilaget producerades, tillverkades ett hösilage, det vill säga ett plastat grovfoder med högre torrsubstans (TS) än ensilaget. Hösilaget fick i försöket motsvara ett "normalt" grovfoder. Efter en ensileringsperiod på 11 veckor öppnades de plastade balarna. Ensilaget och hösilaget hackades till en längd på ca 0,5 - 1 cm. Detta gjordes dels för att underlätta för kycklingarna att äta stråna och dels för att undvika förstoppning i kycklingarnas kräva. Direkt efter hackningen vaccumförpackades ensilaget och hösilaget i mindre portionspåsar. Hanteringen av ensilaget och hösilaget visas i bild 2.

Under perioden januari till mars 2018 genomfördes ett 63 dagar långt försök med långsamväxande slaktkycklingar av hybriden Rowan Ranger vid SLUs försöksanläggning utanför Uppsala. Studien var godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr 5.8.18-16271/2017). När kycklingarna anlände till försöksstationen som daggamla placerades de ut i 20 grupper med 8 kycklingar i varje grupp, se bild 3. Totalt ingick 160 kycklingar i studien. Ett ekologiskt pelleterat foder köptes in från ett foderföretag. De första tre veckorna tilldelades ett startfoder och därefter ett tillväxtfoder, enligt foderföretagets rekommendation. Kycklingarna i varje grupp tilldelades från dag 1 en av följande foderblandningar: **Kontroll** – enbart det ekologiska pelleterade fodret; **Ensilage** – det pelleterade fodret med en inblandning av 15 % ensilage på TS-basis; **Hösilage** – det pelleterade fodret med en inblandning av 15 % hösilage på TS basis eller **LP256** – *L. plantarum* LP256 tillsatt i dricksvattnet (10^7 CFU/ml). Detta innebar att fem kycklinggrupper tilldelades samma foderbehandling. Varje dag under försöket togs foderrester från föregående dag bort innan nytt foder tilldelades. Foderförbrukning och dödlighet registrerades dagligen och kycklingarna vägdes varje vecka.



Bild 2. Ensilage- respektive hösilagebalar öppnades och innehållet hackades i en kvarn för att därefter vaccumpaketeras i mindre förpackningar. Foto: Eliška Valecková

För att utvärdera om grovfodren eller tillsatsen av laktobaciller i dricksvattnet försvårade för *C. jejuni* att etablera sig och överleva i kycklingens tarmar koloniserades (infekterades) alla kycklingar via dricksvattnet med *C. jejuni* (10^6 CFU/ml vatten) under dag 28. Därefter samlades träckprover kontinuerligt från två utvalda kycklingar per grupp (fokaldjur) för att följa utsöndringen av *C. jejuni* hos kycklingarna i de olika foderbehandlingarna.

Utsöndringens av *C. jejuni* i träcken bestämdes via odling på platta. Vid tre tillfällen (dag 28, 43 och 63) avlivades en kyckling per grupp. De avlivade kycklingarna vägdes och olika organ dissekerades fram och vägdes. Prov från blindtarmsinnehåll samlades och analyserades för koncentration av *C. jejuni* med så kallad qPCR-analys. Vid försökets avslutning vid 63 dagars ålder avlivades fokaldjuren. Från fokaldjuren togs prover från innehållet i blindtarmarna för senare analys av den mikrobiella sammansättningen med så kallad Next generation sequencing technique (NGS). NGS är en kartläggning av vilka och hur många bakterier som finns i ett prov baserat på bakteriernas arvs massa (DNA).



Bild 3. Kycklingarna i försöket inhystes i upphöjda moduler. Golvytan var ströad med kutterspån och kycklingarna hade fri tillgång till foder och vatten. Vid försökets start utgjordes varje grupp av åtta kycklingar. Foto: Eliška Valecková

Resultat och Diskussion

Kycklingarna hade en normal tillväxt och det var inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna avseende tillväxt, foderintag eller dödlighet. Totalt dog fem kycklingar under försöket och ytterligare tre avlivades vid 14 dagars ålder på grund av låg vikt. Kycklingarnas viktutveckling illustreras i bild 4. Det genomsnittliga dagliga intaget per kyckling av hösilage var på TS-basis 50 g hösilage, vilket motsvarade 8 % av totala foderintaget. Grupperna som gavs ensilage åt i genomsnitt 67 g ensilage per dag vilket motsvarade 10 % av totala foderintaget. Intaget av hösilage och ensilage över tiden visas i bild 5. Kycklingarna som utfodrades med grovfoder fick tyngre muskelmagar jämfört med kycklingarna i kontroll och LP256 grupperna, som ju inte fick grovfoder. Det beror sannolikt på att den ökade mängden fibrer som följde med intaget av grovfoder gav muskelmagen ökad stimulans, vilket är positivt för muskelmagens funktion. Relativa vikten av körtelmage, tarm, hjärta och lever påverkades inte av om kycklingarna gavs grovfoder. Tyvärr sågs ingen effekt av behandlingarna på utsöndringen av *C. jejuni* i kycklingarnas träck eller på koncentrationen av *C. jejuni* i blindtarmsinnehållet. Det berodde sannolikt på att intaget av laktobaciller var för lågt för åstadkomma en tillräckligt stor pH-sänkning i mag-tarmkanalen eller förändra

tarmmikrobiotans sammansättning i tillräcklig omfattning. Den stam av laktobacill som ingick i försöket, *L. plantarum* LP256, bildar tyvärr inte bacteriociner. I skrivande stund är resultaten från analysen av tarmmikrobiotans sammansättning under bearbetning.

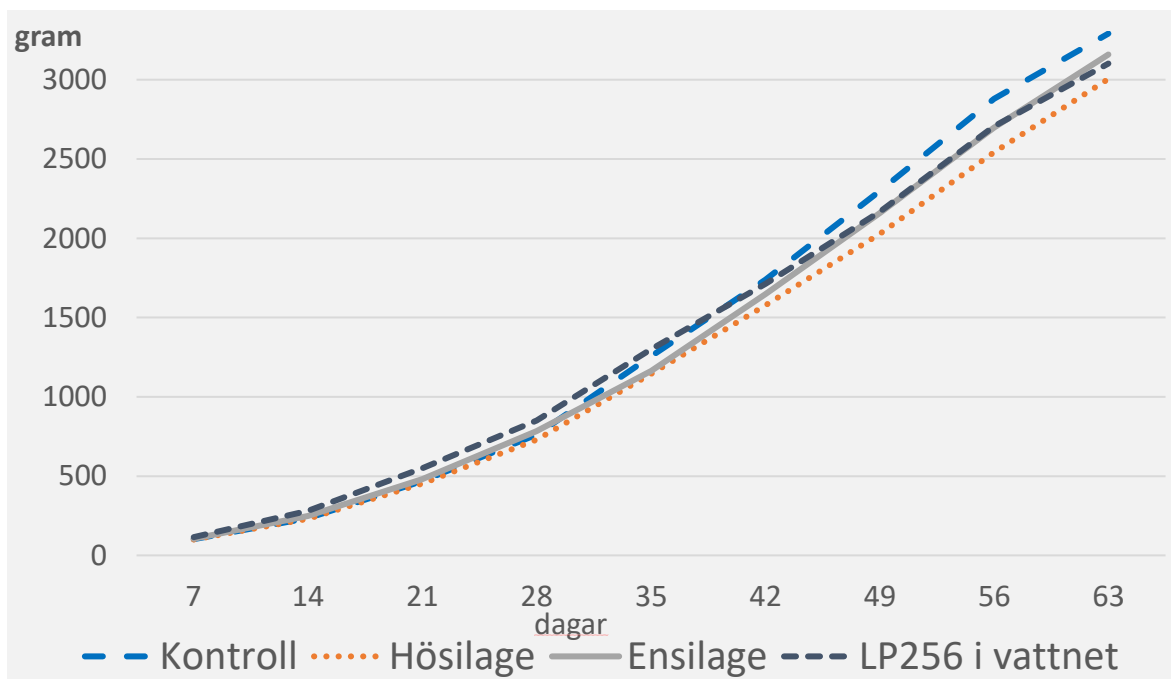


Bild 4. Kycklingarnas genomsnittliga viktutveckling fram till dag 63 då studien avslutades.

De olika behandlingarna påverkade inte kycklingarnas viktutveckling.

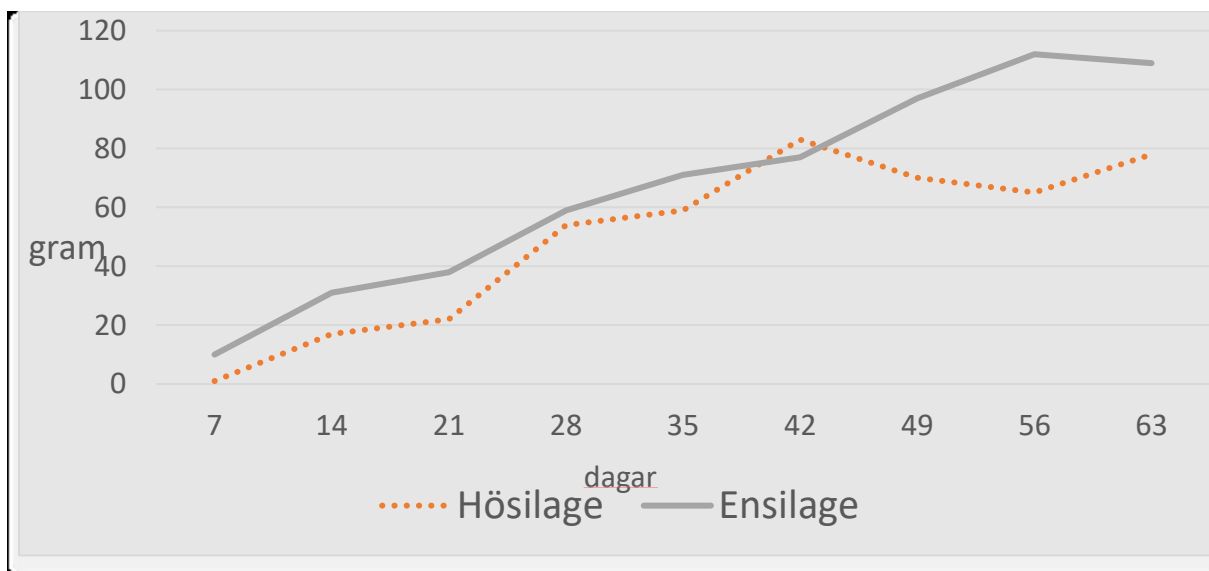


Bild 5. Genomsnittligt dagligt intag av grovfoder i form av ensilage eller hösilage per kyckling och dag.

Ny studie

Eftersom ekologiska kycklingar ska ha tillgång till grovfoder var det naturligt att i första hand utvärdera möjligheten att tillföra laktobaciller via ensilage, som en åtgärd mot *C. jejuni*. En annan tänkbar möjlighet är att istället ensilera spannmål och tillföra kycklingen laktobaciller via det dagliga intaget av vete. Då vete kan utgöra merparten av kycklingars foderstat så är det möjligt att laktobaciller tillförda via vete kan vara ett bättre sätt att försvåra för *Campylobacter* att kolonisera kycklingens tarm. En pilotstudie har genomförts med ensilering av vete med tillsats av olika laktobaciller. Baserat på information från andra studier valdes 10 olika stammar av laktobaciller ut för utvärdering på HUVs laboratorium. Vetekärnorna krossades och fuktades med vatten för att reducera TS till 70 %, och inokulerades därefter med olika stammar av laktobaciller. Efter ensilering i 21 dagar utvärderades pressaft från den ensilerade spannmålen avseende förmågan att inhibera *C. jejuni*. Preliminära resultat tyder på att en studie med ensilerad vete till ekologiska kycklingar som en möjlig åtgärd mot *Campylobacter* vore intressant att genomföra i framtida projekt.

Presentationer

Projektet har presenterats vid följande tillfällen:

Plats och datum	Sammanhang	Titel på föredrag	Föredragshållare
Uppsala 6 februari 2019	FOU-dagar – Forskning stärker rådgivningen	Är ensilage vägen till minskad förekomst av <i>Campylobacter</i> i ekologisk kyckling?	Helena Wall
Stockholm 28 september 2019	Veterinärkongressen 2019	Minska förekomsten av <i>Campylobacter</i> hos ekokyckling	Helena Wall
Uppsala 26 oktober 2021	Fjäderfäseminarium för Svensk Fågels medlemmar (digitalt), i vilket pågående doktorandprojekt vid SLU presenterades	Kan naturliga fodertillsatser minska förekomsten av <i>Campylobacter</i> hos kyckling?	Helena Wall (eftersom doktoranden var föräldraledig)

Publikationer

Valečková, E., Ivarsson, E., Ellström, P., Wang, H., Mogodiniyai Kasmaei, K. & Wall, H. 2020. *Silage and haylage as forage in slow and fast-growing broilers – effects on performance in Campylobacter jejuni infected birds*. British Poultry Science 61(4): 433-441. doi.org/10.1080/00071668.2020.1736515

Ioakim, Temwanoku, 2018. *Effects of silage and haylage on feed intake, growth and health in two meat type chicken genotypes*. Avancerad nivå, A2E. Uppsala: SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

[Forskningsnytt Produktionsdjur September 2020. Kan grovfoder påverka kycklingars hälsa?](#)

Då projektet ingår i Eliška Valeckovás doktorandprojekt kommer ytterligare två publikationer baserade på projektet att publiceras vetenskapligt.

Vi vill tacka SLU Ekoforsk för ekonomiskt stöd till studien samt Jesper Ordell på företaget VETFODER för hjälp med tillverkningen av ensilage och hösilage.