

Bestämning av mikrobiell proteinsyntes från blad eller nätmagen hos mjölkkor

SOPHIE KRIZSAN¹, SEPPO AHVENJÄRVI², SILJE NES¹, HARALD VOLDEN¹ OCH RIKKE FILSETH¹

Instituttt för Husdyr- og Akvakulturvitenskap, UMB¹, MTT, Finland²

Effektiv näringsförsörjning till en mjölkko innebär bland annat att näring tillförs för en optimal mikrobiell produktion. Mer än 60% av proteinet som passerar ut ur våmmen och som kon kan tillgodogöra sig kan vara mikrobiellt (Reynal et al., 2003). Mikrobiellt protein har en smältbarhet på cirka 80% i tunntarmen och en relativt konstant aminosyrasammansättning. Bristande precision i bestämning av ingestaflöde, uppdelning av proteinfraktioner (mikrobiellt, endogent eller icke nedbrutet foderprotein) och grad av operativt ingrepp på försöksdjur har varit de mest diskuterade faktorer vid val av metod som ägnar sig bäst för att bestämma mikrobiell proteinproduktion.

Under provtagning från bladmagen är ingesta benäget att separera i olika faser och de erhållna proportionerna av var fas i provet är inte representativt mht ingesta som passerar ut ur våmmen. Metoden förutsätter att sammansättningen av var fas överensstämmer med sammansättningen av faserna i sann ingesta, men stora avvik mellan fasernas proportioner kan inverka på precisionen i bestämningen av markörkoncentrationerna. Detta kan leda till fel i det beräknade flödet och mer för vissa näringsämnen än andra eftersom fas de huvudsakligen associerar med. Det har också observerats reduktioner i foderkonsumtionen i samband med provtagning från bladmagen (Ahvenjärvi, pers. meddelande, 30 oktober 2007). Förändring både av storlek (reduktion) och funktionell specifik vikt (ökning) är avgörande för att foderpartiklar skall passera från nätmagen över i bladmagen (Dardillat & Baumont, 1992). Målsättningen med det här arbetet var att jämföra prov från bladmagen med selekterat material från nätmagen mht bestämning av den mikrobiella proteinsyntesen.

Pre-experimentell period

Uttag av prov för att bestämma gränsvärdet som nätmageproverna skulle selekteras för mht funktionell specifik vikt (FSG) och partikelstorlek genomfördes under 2 av de sista dagarna av tillvänjningstiden i försökets första period. Det togs ut 700 ml från bladmagen och 500 ml från nätmagen med 6 timmars intervall under 4 skilda provtagningstillfällen under ett dygn. Ingesta från alla kor slogs samman till ett prov för var tidspunkt och förvarades i 39°C. Samlingsproven delades upp enligt: 3500 och 2500 ml för omedelbar analys av FSG och resterande 700 och 500 ml förvarades i kylskåp för senare analys av

partikeldistribution för prover från blad resp. nätmagen. Ingestaprovet som användes till bestämning av FSG silades genom 200 µm nylonfilter. Den funktionella specifika vikten bestämdes med pyknometermetoden (Blake & Hartge, 1986), men istället för en pyknometer användes en 250 ml mätcylinder. En serie med saltlösningar mätades med CO₂ (vid 20°C): 1,0053, 1,0268, 1,0559, 1,0857, 1,1162, 1,1478, 1,1640, 1,1804 och 1,1972 g/ml. Vikten av partikelmaterialiet och volymen saltlösning som gick åt för att uppnå en förutbestämd volym registrerades. Genomsnittlig FSG i blad och nätmageprov var 1,07 g/ml. Partikeldistribution bestämdes genom våtsiktning på Retsch AS200 Control ”g” (Retsch GmbH, Haan, Germany) med 5 säll: 50, 100, 250, 500, 1000 och 2500 µm. Två prover på 1400 och 1000 ml från blad resp. nätmagen siktades. Genomsnittlig andel (% TS) på varje säll var: 0,8 och 2,0 (50 µm), 40,7 och 30,6 (100 µm), 16,6 och 12,2 (250 µm), 10,4 och 7,3 (500 µm), 3,7 och 3,3 (1000 µm), och 27,8 och 44,5 (2500 µm) för blad resp. nätmageprover. Baserat på dessa resultat blev det bestämt att selektera partiklar från nätmagen bara mht partikelstorlek och mindre än 1 mm.

Material och metoder

Försöket blev genomfört med 6 mjölkkor av rasen NRF i tidig laktation, en förstakalvare och resten äldre kor, med genomsnittlig vikt 594 (SD 62) kg, antal dagar efter kalvning 41 (SD 20) och mjölkavkastning 34 kg (SD 5) vid försökets start. En av korna ersattes med ett reservdjur i tredje perioden pga sjukdom. Det blev utfodrat med 5 eller 9 kg av en kraftfoderblandning i kombination med 3 olika ensilage. Den kemiska sammansättningen av kraftfodret beräknat från sammansättningen av ingredienser var: NDF 0, stärkelse 689, råprotein 171 och aska 68 g/kg TS. Ensilagen skördades som rundbalar från en vall bestående av huvudsakligen timotej och ängssvingel den 15.05 (Kvalitet 1), 11.06 (Kvalitet 3) och 06.08 i 2007 (Kvalitet 2) och blev tillsatt cirka 4,5 l/ton av Gras AAT N Lacto. Innehållet av NDF i grönmassaprov för kvalitet 1, 2 och 3 var: 453, 578 resp. 647 g/kg TS. I övrigt skilde sig ensilage 1 från 2 och 3 vad gäller råproteininnehållet (193, 124 och 121 g/kg TS för kvalitet 1, 2 resp. 3), och ensilage 3 från 1 och 2 mht TS-halt (354, 380 och 265 g/kg för kvalitet 1, 2 resp. 3). Ensilagen och kraftfodret analyseras för närvarande för olika kemiska parametrar. Ensilaget utfodrades som 95% av ad lib i mätperioden, beräknat från de första 13 dagarna i varje period. Korna blev utfodrade med kraftfoder och ensilage samtidigt 7 ggr/dygn från 06:00 och jämnt fördelat fram till kl 00:00 varje dag. Försöket utfördes som en ofullständig latinsk kvadrat med 4 perioder om 24 dagar, där de sista 11 dagarna i varje period var mätperiod. Designen på försöket var sådan att tilldelning av hög giva av kraftfoder alltid föregick låg giva innanför ko sett över alla perioder.

Kontinuerlig infusion av 10+atom% anrikad ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ startade dag 11 i varje period av försöket. Innan infusionen av ^{15}N startade togs ett prov av våminnehåll från varje ko under alla perioder för korrektion av den naturliga förekomsten av ^{15}N . Provtagningen från förmagarna föregick under 3 dygn där ingesta togs ut vid 4 skilda tillfällen med 6 timmars intervall varje dygn från blad resp. nätmagen. För det andra resp. tredje dygnet flyttades tillfällena för provtagning fram 2 timmar i förhållande till föregående dygn. Infusionen av markörer avslutades efter sista uttag av prov från nätmagen. Prover från nätmagen silades genom ett såll med 1mm maskstorlek. Vätske och partikelassocierade bakterier (LAB och PAB) separerades från blad och nätmageprov genom differentiell centrifugering. Prover av våminnehåll, LAB och PAB analyserades för icke ammoniak N (NAN) och ^{15}N atom% excess. Isotopintensiteten mättes i en isotopkvot masspektrometer (Delta Plus XP, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) med insläpp av gasen via en elementar analysator (ESC 4010, Costech Analytical Technologies Inc., Valencia, CA, USA) i direkt anslutning till masspektrometern. Data analyserades med Proc Mixed i SAS (Ver. 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) modellen inkluderade fixa effekter av period, provtagningsplats, kraftfodernivå och ensilage, inkl. samspel mellan kraftfodernivå och ensilage. Ko innanför provtagningsplats ingick i modellen som slumpmässig effekt. Eftereffekter av kraftfodernivå och ensilage undersöktes som huvudeffekter men var inte signifikanta ($P>0,05$) och togs därför ut från modellen.

Resultat

Provtagningsplats var inte signifikant ($P>0,05$) för ^{15}N atom% excess, NAN eller $^{15}\text{N:N}$ förhållandet i varken LAB eller PAB. Endast en tendens till signifikant skillnad ($P=0,08$) kunde observeras för koncentrationen av NAN i LAB (Tabell 1). Effekt av kraftfodernivå, ensilage och samspelet mellan ensilage och kraftfodernivå var signifikant ($P\leq 0,02$) för ^{15}N atom% excess i både LAB och PAB (Tabell 1). Detta innebar ingen skillnad ($P=0,13$) eller enbart en tendens till skillnad ($P=0,06$) mellan låg eller hög tilldelning av kraftfoder innanför ensilagekvalitet 1 i LAB respektive PAB. Vidare var skillnaden i ^{15}N atom% excess i LAB och PAB signifikant ($P\leq 0,03$) för kor fodrade med hög jämfört med låg giva kraftfoder innanför både ensilagekvalitet 2 och 3. Skillnaden i ^{15}N atom% excess mellan kraftfodernivåer var 0,01 enheter större för kor fodrade med ensilage 2 jämfört med 3 i både LAB och PAB. Kor fodrade med ensilagekvalitet 1 hade 0,85 och 0,95% mer NAN i LAB, samt 0,71 och 0,79 % mer NAN i PAB ($P\leq 0,01$) jämfört med kor fodrade ensilagekvalitet 2 respektive 3. De signifikanta effekterna av kraftfodernivå och ensilagekvalitet i ^{15}N atom% excess och NAN i LAB och PAB återspeglades i $^{15}\text{N:N}$ förhållandet i både LAB och PAB, samt att samspelet var signifikant ($P=0,02$) för förhållandet i PAB (Tabell 1).

Tabell 1. Effekt av provtagningsplats, kraftfodernivå och ensilagekvalitet på ^{15}N atom% excess, icke ammoniak N och $^{15}\text{N}:\text{N}$ förhållandet i vätske och partikelassocierade bakterier från prover separerade från bladmagen eller selekterat material från nätmagen

Respon ²	Ensilage Kraftfoder	Kvalitet 1		Kvalitet 2		Kvalitet 3		$P > F^1$			
		5	9	5	9	5	9	P	K	E	K×E
LAB ^{15}N , APE		0,043	0,048	0,064	0,082	0,057	0,065	0,70	<0,01	<0,01	0,02
PAB ^{15}N , APE		0,040	0,046	0,060	0,078	0,056	0,064	0,82	<0,01	<0,01	0,01
NAN i LAB, % i TS		8,52	8,30	7,67	7,45	7,57	7,35	0,08	0,19	<0,01	1,00
NAN i PAB, % i TS		7,50	7,30	6,82	6,56	6,53	6,70	0,17	0,60	<0,01	0,54
$^{15}\text{N}:\text{N}$ i LAB $\times 10^{-3}$		0,513	0,570	0,852	1,08	0,773	0,877	0,47	0,01	<0,01	0,12
$^{15}\text{N}:\text{N}$ i PAB $\times 10^{-3}$		0,524	0,634	0,883	1,21	0,881	0,957	0,49	<0,01	<0,01	0,02

¹Sannolikheten av signifikant effekt av provtagningsplats (P), kraftfodernivå (K), ensilage (E) och samspelet mellan kraftfodernivå och ensilage (K×E).

²LAB=vätskeassocierade bakterier, PAB=partikelassocierade bakterier, APE=atom% excess och NAN=icke ammoniak N.

Konklusion

Inga skillnader mellan provtagningsplats i ^{15}N atom% excess och NAN indikerar en möjlighet för att bestämma mikrobiell proteinproduktion också från selekterat material från nätmagen. Rekonstruerat ingestaflojde bör betraktas innan det dras definitiva slutsatser mht effekt av provtagningsplats och diet. Skillnaderna mellan dieter i $^{15}\text{N}:\text{N}$ förhållandet borde reflektera skillnader av anrikning i mikrobiell biomassa, vilken minskar med ökad NH_3 koncentration i våmvätskan.

Tack till

G. Broderick på US DFRC i Madison för ^{15}N analyser och Den Norske Komité av EAAP som tilldelat mig årets stipend för att genomföra analyserna.

Referenser

Blake, G. R., and K. H. Hartge. 1986. Particle density. Pages 378–379 in *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods. 2nd Ed.* (A. Klute, ed.). American Society of Agronomy, Inc. and Soil Sci. Society of America, Inc., Madison, WI.

Dardillat, C. and R. Baumont. 1992. Physical characteristics of reticular content in the bovine and consequences on reticular outflow. *Reprod. Nutr. Dev.* 32:21-36.

Reynal, S. M., G. A. Broderick, S. Ahvenjärvi, and P. Huhtanen. 2003. Effect of feeding protein supplements of differing degradability on omasal flow of microbial and undegraded protein. *J. Dairy Sci.* 86:1292–1305.