

SLF-projekt H0530273: Hantering för förbättrat utnyttjande av foderprover och andra prover från nötkreaturs- och foderkonserveringsförsök

Detta är en förkortad slutrapport för genomförda projektdelar enligt överenskommelse 081013

Bakgrund

Höga kostnader och minskade resurser att genomföra dyrbara djur- och foderkonserveringsförsök har gjort det allt angelägnare att bättre utnyttja informationen från de försök som genomförs. När tex. ett djurförsök är färdigt har i regel ett stort antal prover från fodermedel, digesta, träck, urin etc. analyserats. Denna basinformation representerar betydande kostnader. Det kan exempelvis gälla uppgifter om smältbarheten in vivo, som bestämts genom totaluppsamling och analys av träck från ett antal djur eller foder där nedbrytningshastighet i våmmen beräknats efter upprepade tömningar och vägningar av hela våminnehållet från våmfistulerade kor. Från försök med konservering av vallfoder finns ofta basdata rörande sammansättning av grönmassan och dess förändring under lagringen samt information om mikroflora, syretillförsel, lagringsstabilitet, mm. Basinformationen kan, om den kompletteras med analys av någon ytterligare parameter, användas för framtida ändamål till en bråkdel av den kostnad som nya försök skulle innebära. Likaså kan nya analysmetoder för befintliga parametrar utvärderas på liknande sätt. Ett annat användningsområde för väldokumenterade prover är kompletterande analys för att utvärdera försöksbehandlingarnas effekt på områden som inte studerats i de ursprungliga försöken. Det kan till exempel gälla analys av biologiska markörer i urin eller av metaboliter i våmvätska.

Lagring av prover för framtida utnyttjande har hittills fallit utanför försöksplaner och finansiering. När prover sparas sker det ofta inte systematiskt och välplanerat, i stället sparas vanligen det provmaterial som funnits som säkerhetsmarginal för de planerade analyserna. Det finns inga genomarbetade riktlinjer för hur olika prover skall sparas, vad gäller lämplig preparering, förpackning och lagringsförhållanden. För att kunna avgöra vilken typ av lagring som behövs är det också nödvändigt att ta hänsyn till de förändringar, som kan tänkas ske vid olika lagringsformer. Därefter kan kostnader för lagring ställas mot det värde olika slags prov representerar.

Även för det provmaterial, som är direkt avsett för analys i det försök där det samlats in, krävs mer standardiserade hanteringsrutiner. Provhanteringen kan påverka analysresultatet och med ökad standardisering kan variation mellan laboratorier minskas. Dessutom skulle väl beskrivna rutiner för provmängder och provhantering underlätta både planering och genomförande av nya försök.

För att rationellt kunna utnyttja alla tillgängliga analysresultat och även för att administrera provlager är bra databaslösningar nödvändiga. Det nordiska forskningsamarbete som har fått allt större betydelse genom Karoline-projektet och genomförandet av gemensam fodervärdering inom NorFor ökar behovet av att göra analysresultat så åtkomliga som möjligt.

Syfte

- Att inventera och säkra befintliga prov av högt värde från försök vid SLU, Kungsängen
- Att undersöka vilka möjligheter som finns att lagra olika provkategorier under olika förhållanden
- Att ta fram rutiner för provtagning, provbehandling och lagring i framtida försök

- Att ta fram specifikationer för ett databssystem för administration av analysresultat och provlager

Genomförande

Prov från avslutade djur- och foderkonserveringsförsök som redan finns vid Kungsängens forskningscentrum inventeras så att de värdefullaste proven kortsiktigt kan säkras. Det långsiktiga arbetet inleds med en förstudie som innefattar litteraturstudie och insamlande av erfarenheter från andra laboratorier. En enkät sänds ut till internationella forskningslaboratorier.

Frågor som bör besvaras i denna förstudie omfattar bland annat:

- Hur skall provens värde rangordnas med hänsyn till framtida användbarhet?
- Vilka mängder behövs för olika analyspaket som kan bli aktuella?
- Hur bör proven prepareras?
- I vilken form bör proven sparas?
- Hur är hållbarheten för olika provtyper och för deras fraktioner vid olika lagringsförhållanden?
- Vilka möjligheter finns i form av förvaringssystem, maskinell förpackning med t ex vakuum eller skyddande atmosfär?
- Hur bör databaser för analysdata utformas för enklaste utnyttjande av hela datamaterialet?

Litteraturstudie

Representativa prov och homogenitet

Det prov som slutligen analyseras, ofta i storleksordningen 1 gram, representerar ibland foderpartier på 10-tals ton. För att resultatet skall vara användbart måste ett prov som motsvarar sammansättningen i partiet tas ut. När provet under prepareringen reducerats i mängd från några kg till kanske 100 gram skall sammansättningen fortfarande vara representativ för hela partiet och det preparerade provet skall vara homogent. Preparering och lagring skall inte heller ha orsakat några förändringar.

Många provtyper erbjuder stora homogenitetsproblem. Undantag är flytande prover som kan blandas om väl före provtagning och torra, finfördelade prover. I andra provslag kan det krävas många delprov för att representera hela partiet. Haslemore och Holland (1981) beräknade antalet delprov till mellan 4 (pH-bestämning) och 61 (vattenlösliga kolhydrater) för att inom ett 95% konfidensintervall bestämma kemisk sammansättning i snittytan på en plansilo med förtorkat vallensilage. I den fortsatta provberedningen måste det ursprungliga provet reduceras ner till hanterbara mängder som fortfarande är representativa för hela partiet. Lancaster et al. (1976) jämförde ett antal tekniker för grönmassa och ensilage. I metoderna ingick malning på köttkvarn, sågning av remsor från fryst prov, skivning med skärmaskin, hackning med pappersgiljotin och provtagning med hålpipa. Malning på köttkvarn bedömdes då vara den metod som var lämpligast att använda i praktisk laborativ verksamhet, eftersom variationen mellan utförare var låg. En svaghet hos metoden var att vätska lätt skildes av vid malningen (Lancaster et al., 1976). En alternativ metod för att reducera ett ensilage- eller grönmassa prov med bibehållen homogenitet är torkning av en stor provmängd innan malning. Ingen av metoderna är dock användbar för studier av partikelstorleken, utan de förutsätter ett intakt prov.

En annan provkategori med homogenitetsproblem är våminnehåll som delvis separerar i vätska och fast material. Metoder för att minska problemet är provtagning från ett delprov eller uppdelning av hela provet i vätska och fast material följt av proportionellt återskapande (Tothi m fl, 2003).

Preparering

Värmetorkning stoppar enzymaktivitet i växtmaterial betydligt effektivare än frystorkning (Nelson och Smith, 1972). Det förutsätter dock en relativt hög temperatur. Nielsen mfl. (2007) fann att 45% av glukosmängden i majsensilage försvann under torkning vid 60° C som en trolig följd av pågående enzymaktivitet. Högre temperatur ger å andra sidan stora förluster av flyktiga ämnen i framförallt ensilage, där alkoholer och ammoniak förloras fullständigt, VFA till stor del och mjölksyra till en mindre del (Porter & Murray, 2001). Nielsen m fl (2007) noterade att halterna av ättiksyra jämnades ut fullständigt mellan ensilageprover under torkning vid 60° C. Utgångsvärden av 3-22 g ättiksyra/kg ts ledde till en nivå omkring 3 g/kg ts i alla prover vilket tyder på en fullständig flyktighet vid halter överstigande den mängd som binds i salter.

Förändringar under lagring

I färskt växtmaterial fortsätter respirationen med omsättning av organiskt material till koldioxid och vatten så länge vattenaktivitet och syretillgång tillåter. O'Neill och Allen (1993) visade en stor omsättning i grönmassa av majs, med åtföljande koncentrationsökning av fiber och aska vid ett dygns lagring före preparering. Luserngrönmassa påverkades mindre och ensilage av både majs och lusern i stort sett inte alls. Torkning stoppar respirationen, men annan enzymatisk aktivitet kan fortgå, framförallt i frystorkade prover där inte enzymerna inhiberats av någon upphettning (Nelson och Smith, 1972). De här enzymatiska förändringarna innebär ofta nedbrytning av polymerer till mindre beståndsdelar; stärkelse och protein minskar medan fri glukos och fria aminosyror ökar (Nelson och Smith, 1972). Enzymaktiviteten i frystorkade prover gör att de ställer större krav på lagringsförhållandena.

Även fryslagring av otorkade prover i väntan på preparering påverkar resultatet. Hos ensilage- och grönmasseprover av foderlösa och lusern påverkades proteinfraktionerna genom utfällning av lösligt protein (Macrae et al., 1974; Kohn och Allen, 1992). Fettfraktionen kan förändras redan av något dygns fryslagring (Lourenco & Fievez, 2004).

Enkät till laboratorier

En enkät om provhantering till 17 laboratorier i Europa, USA och Canada resulterade i svar från 7 laboratorier. I Tabell 1-3 redovisas under vilka förhållanden laboratorierna lagrade olika provtyper. Det vanligaste sättet att spara prov på var i ugnstorkad och mald form i plastburk eller -påse som förvarades i rumstemperatur eller i ett något svalare utrymme. Fyra av laboratorierna sparade opreparerade ensilageprov, något som innebar större provmängder. Lagringstiderna varierade från 1 månad upp till 10 år. Samtliga laboratorier ansåg att en lång rad analyser fortfarande var tillförlitliga för prov som lagrats över 1 år (Tabell 4). Det var beträffande flyktiga ämnen och fett som något eller flera laboratorier var negativa.

För provtagning av helt våminnehåll från våmtömningar tog laboratorierna antingen ut en delmängd för provtagning eller blandade hela innehållet (får, begränsad mängd) vid provtagning (Tabell 5). Samtliga tre laboratorier som arbetade med helt våminnehåll sparade frysta prov. Våmvätskeprov togs antingen med aspirationstub eller med rör som fördes in genom fistelöppningen (Tabell 6). Två laboratorier använde inget konserveringsmedel för våmvätskeproven. För urinprover varierade användningen av konserveringsmedel på samma sätt (Tabell 7). Träckprover hanterades både frysta, frystorkade och ugnstorkade.

Analysresultaten sparades antingen i separata Excelfiler eller i en gemensam laboratedatabas (Tabell 8). Tre av laboratorierna uppgav att de hade en gemensam löpnummerserie för att kunna spåra prov. Ett laboratorium sparade tillsammans med analysresultatet uppgifter om provursprung, preparering, analysmetod och även återstående provmängd och var provet fanns lagrat (Tabell 9). Övriga laboratorier hade mer ofullständiga uppgifter sparade tillsammans med analysresultatet.

Diskussion

Flera av laboratorierna uppgav att de sparade torkade prover 5-10 år under varierande lagringsförhållanden. Det bör alltså finnas ett stort förråd av mer eller mindre väldokumenterade prover från försök som skulle kunna utnyttjas vidare. Detta under förutsättning att proven inte förändrats under lagringen. Sannolikt har dock proven förändrats i större eller mindre utsträckning beroende på provsammansättning, preparering, lagringsförhållanden och känsligheten hos den analyserade fraktionen. För att kunna utnyttja befintliga analysresultat i nya bearbetningar är det fördelaktigt om så mycket data som möjligt finns tillgängliga om provursprung, preparering och använda analysmetoder. Det gäller naturligtvis i lika hög grad om nya analyser görs på lagrade prover. Av de tillfrågade laboratorierna var det bara ett som lagrade alla uppgifter tillsammans med analysresultaten. Samma laboratorium var det enda som uppgav att de hade en gemensam databas för alla prov, något som är nödvändigt för att effektivt kunna söka bland alla resultat. Om laboratorierna både sparade utförliga uppgifter om proven och använde samma system för informationshantering skulle det innebära starkt ökade möjligheter till större provutnyttjande. Från det molekylärbiologiska området finns exempel på webbaserade lösningar för hantering av analysresultat och provinformation, inklusive uppgifter om lagerplats, mängd, förpackning, lagringsförhållanden och bevakning av när lagringstiden överskrids så att prov måste flyttas till lågtemperaturlager (Henry et al., 2008).

Laboratorierna hade delvis olika bedömningar av hur gamla prover som kunde användas för olika analyser. Det kanske till någon del kan förklaras av olika lagringsförhållanden, men sannolikt skiljer acceptansen mellan laboratorier.

På samma sätt som med foderprover hade laboratorierna olika rutiner för konservering och lagring av våm-, träck- och urinprover, något som förmodligen påverkar resultaten. Ringtester mellan olika laboratorier har ibland visat på mycket stora variationer, även för rutinanalyser som råprotein (Madsen & Hvelplund, 1994) och NDF (Lund m fl., 2004). För att försöksresultat skall vara jämförbara måste laboratorierna kontrolleras genom återkommande ringtester av prover som går genom hela prepareringsprocessen. Vid statistisk bearbetning av resultat från ett antal försök (metaanalys) är det i någon mån möjligt att kompensera för skillnader i analysresultat mellan forskningslaboratorier och även för effekten av ett enskilt försök (St-Pierre, 2001). Direkta jämförelser försvåras däremot om olika laboratorier får olika resultat.

Tabell 1. Antal laboratorier som använder olika lagringsformer och behållartyper för foderprover (av totalt 7 laboratorier) samt provstorlek för olika kategorier

	Grönmassa	Hö	Ensilage	Pressaft	Spannmål och trindsäd	Protein-foder	Fettrika foder
<i>Lagringsform</i>							
Djupfrost							
opreparerat	3	1	4	4	1	1	3
Frystorkat malt	3		3				
Ugnstorkat malt	5	6	6		5	5	3
<i>Behållartyp</i>							
Plastpåse	2	1	2		1	1	
Plastbehållare	4	4	4	4	4	3	4
Förseglad gasfylld beh.	1	1	1		1	1	1
Glasbehållare		1	1		1	1	
<i>Provstorlek, g (pressaft ml)</i>							
Frysta prover	500 – 2000	150	500 – 2000	20 -100	100	100	50
Torkade prover	20-500	20-500	20-500		20-1000	20-1000	25-500

Tabell 2. Lagringstider som laboratorierna tillämpar för foderprover

Provkategori	Frysta prover	Torkade prover
Grönmassa, ensilage, hö	6 mån; 1 år; 5 år*	6 mån; 2 år; 5 år; 5år; 8 år; 10 år; 10 år
Pressaft	6 mån; 1 år; 5 år	1 mån; 2 år; 5 år
Kraftfoder	6 mån	1 år; 5 år; 5år; 8 år; 10 år; 10 år
Fettrika foder	6 mån; 3 år	1 år; 5 år; 5år; 10 år

* Frysta prover sorteras ofta ut före 5 år av utrymmesskäl

Tabell 3. Lagringsförhållanden och -temperaturer på laboratorierna

Frysta prover (alla lab)	-18 till -20 °C
Torkade prover (enskilda lab)	Källare 18-25 °C; källare 10-15 °C; varierande luftfuktighet 18-20 °C; 5-15 °C; 20-25 °C; 20-25 °C

Tabell 4. Analyser som de tillfrågade laboratorierna ansåg kunde göras på prover lagrade > 1 år. "Jmf" = "enbart lämpligt för jämförelse inom försök". Flera svar innebär att olika laboratorier haft olika bedömningar, ett svar att alla gjort samma bedömning

	Generellt för prov	Frost grön-massa, ensilage	Torkad grön-massa, ensilage	Pressaft	Fett-rika foder	Våminnehåll, träck, urin
Ts	Ja					
Aska	Ja					
Fiber	Ja					
In vitro smb	Ja					
Råprotein	Ja					
Socket/WSC	Ja					
Stärkelse	Ja					
Råfett	Ja				Jmf	
Fettsyror	Ja			Nej	Jmf	Nej
NH3	Nej/Ja	Jmf/Ja	Nej	Nej/Jmf/Ja		Nej/Jmf
VFA	Nej/Ja	Jmf/Ja	Nej	Nej/Jmf/Ja		Jmf
Alkoholer	Nej/Ja	Jmf/Ja	Nej	Jmf/Ja		Jmf
In situ fiber*	Ja					Jmf
In situ protein*	Ja					
Aminosyror	Ja					
Mineraler	Ja					

*Torkade prov förvaras i hermetiskt slutna behållare på laboratoriet

Tabell 5. Provtagnings teknik och lagring hos de tre laboratorier som arbetade med helt våminnehåll

Provtuttagning

Lab 1. Var 10:e handfull i särskilt provtagningskärl. 10 % av totalt våminnehåll

Lab 2. Var 10:e handfull i särskilt provtagningskärl. 10 % av totalt våminnehåll

Lab 3. Tömning och omblandning av hela innehållet i låda (får). 3 st prov för ts

Metodik för homogena prov

Lab 1. Fyra replikat om 150 g till frystorkning efter blandning i provtagningskärlet

Lab 2. Noggrann omblandning, snabb provtagning, duplikat

Lab 3. Kontinuerlig omblandning vid provuttag

Lagringsform prov

Lab 1. Både fryst (2000 g) och torkat (25 g)

Lab 2. Både fryst (300 g) och torkat (25 g)

Lab 3. Både fryst (250 g) och torkat (100 g)

Tabell 6. Provtagningsteknik, konservering och lagring hos de fem laboratorier som arbetade med våmvätska

Lab 1. 100 ml med aspirationstub genom fistelöppning. Silas och 10 ml delprov tas ut. Delproven fryses efter tillsats av 1mL 25% H₂SO₄ samt HgCl₂ för senare VFA-analys. Ammoniak analyseras direkt i centrifugerad våmvätska.

Lab 2. 250 ml prov med vakuumsug. 50 ml fryses in i plastbehållare utan konserveringsmedel.

Lab 3. 100 ml. Därifrån tas tre 20 ml delprov tas ut. Konserveras med koncentrerad H₂SO₄ och fryses (-18 °C).

Lab 4. 100 ml. Delas upp på delprov med konserveringsmedel beroende på analys. Fryses vid -20 °C eller -80 °C.

Lab 5. 50 ml direkt i provrör som förs in genom fistelöppning. Silas och delprov om 1 eller 10 ml tas ut. Fryses snabbt (< 15 min) vid -18 °C. Inget konserveringsmedel

Tabell 7. Konservering och lagring av urin- och träckprover hos laboratorerna

Urinprover	Träckprover
<i>Lab 1.</i> Syratillsats (ospecificerad) och frysning	Fryst; Frystorkat
<i>Lab 2.</i> Fryses i plastbehållare vid -18 °C. Ingen syratillsats	Ugnstorkat
<i>Lab 3.</i> Tillsats av koncentrerad svavelsyra och frysning vid -18 °C.	Fryst; Ugnstorkat
<i>Lab 4.</i> Syras med 30% (v/v) H ₂ SO ₄ i uppsamlingskärl	Ugnstorkat
<i>Lab 5.</i> Syras med 10% (v/v) H ₂ SO ₄ till pH<4	Fryst; Frystorkat; Ugnstorkat
<i>Lab 6.</i> -	Fryst
<i>Lab 7.</i> -	Fryst

Tabell 8. Finns gemensam lätt sökbar databas för alla analysresultat?

Lab1	Resultaten i separata Excelfiler tillgängliga för de enskilda forskarna. Gemensam löpnummerserie för alla prov
Lab2	Gårdsprover sparas i DB2 databas, övriga resultat i olika Excelfiler
Lab3	Gemensam löpnummerserie för alla prov
Lab4	Gemensam laboratoriedatabas, enskilda forskare har bara tillgång till sina resultat
Lab5	En separat Excelfil för varje forskare
Lab6	-
Lab7	Separata Excelfiler på laboratoriet, resultaten sammanställs och sänds till forskaren. Gemensam löpnummerserie för alla prov

Tabell 9. Vilken övrig information sparas tillsammans med analysresultaten?

	Provursprung	Preparering (torkning, malning etc.)	Detaljer om analysmetod	Tillgänglig provmängd och placering
Lab1	Ja	Nej	Nej	Nej
Lab2	Ja	Nej	Nej	Nej
Lab3	Ja	Nej, standardmetoder	Nej, standardmetoder	Nej
Lab4	Ja	Ja	Ja	Nej
Lab5	Ja	Ja	Ja	Ja
Lab6	-	-	-	-
Lab7	(Nej) Enbart forskarens uppgifter	(Ja) Oftast tillgängligt	(Ja) Oftast tillgängligt	Nej

Kommentarer från laboratorerna*Provlagring*

- ☒ Vi planerar en jämförelse med nya kemiska analyser av prover lagrade > 5 år
- ☒ Vi har analyserat om prov för in vitro smältbarhet efter 10 år med samma resultat som ursprungsvärdet
- ☒ Vi använder ibland torkade prover äldre än 10 år för klassisk analys (råanalys?)
- ☒ 1 års lagringstid inget problem, ingen erfarenhet av äldre prov
- ☒ Halter av socker (WSC) och råfett verkar sjunka i torkade prov under lagring. VFA-halter i fryslagrade prov (-20°C) verkar också sjunka
- ☒ Torkade och malda prov måste förvaras svalt och mörkt och skyddas från skadedjur
- ☒ Viktigt med larm på frysar

Ger nya analysmetoder nya krav på provlagring?

- ☒ Frystorkning och ugnstorkning behöver jämföras mer
- ☒ Analys av partikelstorlek-struktur kräver att intakta prover finns lagrade.
- ☒ För att garantera homogenitet krävs stora prov av vissa kategorier, t ex helt våminnehåll eller ensilage för strukturstudier

Övrigt

- ☒ Dokumentation av försöksfoder med digitalkamera bra hjälpmedel för att vid behov senare kunna göra en grov bedömning av strukturen

Referenser

Haslemore, R M. Holland, R. 1981. Sampling and chemical-composition of silage from a farm stack -variation in moisture-content and in degree of fermentation. *N Z J Exp Agric* 9:85-89

Henry, L., Ramm, K., Zhu QianHao & Upadhyaya, N. M. 2008. RGMIMS: a web-based Laboratory Information Management System for plant functional genomics research. *Molecular Breeding* 22:151-157

Kohn, R A. Allen, M S. 1992. Storage of fresh and ensiled forages by freezing affects fibre and crude protein fractions. *J. Sci. Food Agric.* 58:215-220.

- Lancaster, R J. Wilson, R K. Jury, K E. Newth, R P. 1977. Comparison of methods of preparing grass and silage samples for laboratory analysis. *N Z J Agric Res* 20:157-161
- Lourenco, M. & Fievez, V. 2004. Extraction solvents and sample storage conditions affect content, pattern and esterification of fatty acids in fresh grass. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 69:175-178.
- Lund, P., Weisbjerg, M. R., Ahvenjarvi, S., Huhtanen, P., Uden, P., Olafsson, B., Volden, H. 2004. Nordic ringtest on INDF content and NDF degradation characteristics in three feeds. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13 Suppl.1: 139-142
- MacRae, J. C., Campbell, D. R., Eadie, J. 1975. Changes in the biochemical composition of herbage upon freezing and thawing. *J. Agric. Sci., UK* 84:125-131
- Madsen, J. Hvelplund, T. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. *Livest. Prod. Sci.* 39:201-212
- Nelson, C J. Smith, D. 1972. Changes in Carbohydrate and Nitrogen Concentrations During Storage of Heat- and Freeze-Dried Alfalfa Root Tissue. *J AGR FOOD CHEM* 20:125-128
- Nielsen, T S. Kristensen, N B. Weisbjerg, M R. 2007. Effect of harvest time on fermentation profiles of maize ensiled in laboratory silos and determination of drying losses at 60°C *Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science.* 57:30-37
- O'Neil, K A. Allen, M S. 1993. Effects of Temperature and Duration of Sample Storage Before Oven-Drying on Forage Fiber Analyses. *J. Dairy Sci.* 76:535-543
- Porter, M. G., Murray, R. S. 2001. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry matter content estimated by different analytical methods. *Grass and Forage Science* 56:405-411
- St, Pierre, NR. 2001. Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *J Dairy Sci* 84:741-755
- Tothi, R. Lund, P. Weisbjerg, M R. Hvelplund, T. 2003. Effect of expander processing on fractional rate of maize and barley starch degradation in the rumen of dairy cows estimated using rumen evacuation and in situ techniques. *Anim Feed Sci Technol* 104:71-94