

SLF-projekt V1130056: FTIR-metodik för gårdsanalys av ammoniak i flytgödsel från mjölkkor och för att följa kväveomsättning i simulerad stallmiljö

Slutrapport 2013-12-16

Sökande: Torsten Eriksson

FTIR-metodik för gårdsanalys av ammoniak i flytgödsel från mjölkkor och för att följa kväveomsättning i simulerad stallmiljö

Bakgrund

I en pilotstudie (SLF H0941228) inom det tvärvetenskapliga samarbetsprojektet Fodrets Kretslopp (<http://www.slu.se/fodretskretslopp>) identifierades ammoniakförlusterna i stallmiljön samt utnyttjandet av stallgödselns kväve i praktisk växtodling som viktiga områden för åtgärder i syfte att nå ett bättre totalt kväveutnyttjande. Förluster i stallmiljö och i samband med gödselhantering beror på att kväveföreningar, framförallt urea i urinen, hydrolyseras till ammoniak. Den stora utmaningen är att ändå hålla kvar kvävet i systemet så att det i så stor utsträckning som möjligt kan recirkuleras genom växtodlingen.

En viktig del för att nå bästa utnyttjande av stallgödselkväve är att så riktigt som möjligt bedöma effekten vid spridning. I växtodlingssammanhang är det stallgödselns innehåll av ammoniumkväve som har den största betydelsen, eftersom det i huvudsak blir tillgängligt den växtsäsong gödseln sprids. Analyser från ett 100-tal gårdar i Kalmar län visade på en variation mellan 1-4 kg $\text{NH}_4\text{-N}$ /ton nöflytgödsel, alltså en tillförsel som varierar mellan 20-80 kg $\text{NH}_4\text{-N}$ /ha vid en så måttlig giva som 20 ton flytgödsel/ha (Greppa näringen, 2011). Det finns alltså stora möjligheter att förbättra utnyttjandet av stallgödsel och sänka miljöbelastningen med god kunskap om stallgödselns aktuella sammansättning. Tillförlitliga, enkla och billiga analysmetoder som kan användas i gårdsmiljö för att analysera gödsel skulle kunna hjälpa till att förbättra både miljöeffektivitet och ekonomi på djurgården. Sedan ett antal år finns Agros Nova Mk3 (Agros, Lidköping), som skattar ammoniakhalten från gastrycket när gödselprovet görs alkaliskt. Försök med Nära Infraröd (NIR)-teknik och mätning vid spridningen (Agroväst) pågår också.

Sedan 2004 pågår vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård utveckling av analysmetodik för vätskeprover baserat på FTIR (Udén, 2009), samma teknik som används för analys av mjölkprover. FTIR-tekniken medger snabba analyser när kalibreringar väl har etablerats och i princip samtliga komponenter som finns i tillräcklig koncentration (ca 0.1 g/l) kan vid gynnsamma förhållanden analyseras samtidigt. Till skillnad från (NIR) bygger FTIR på samband mellan funktionella grupper och absorptions i specifika delar av det centrala

våglängdsområdet. FTIR-tekniken är därför mycket mindre beroende av uppdaterade kalibreringar. Sedan några år finns också små, bärbara instrument i storlek som en bärbar dator för analys av mjölkprover direkt på gården till ett relativt lågt inköpspris (ca 80 000 kr).

Syftet med projektet var att utveckla tillförlitliga kalibreringar så att FTIR-tekniken kan användas för samtidig analys av olika komponenter i vätskeprover, antingen på laboratorium med många prover per timme eller direkt på gården av rådgivare med bärbara instrument. Dessutom är avsikten att tillämpa metodiken för forskningsändamål. I forskning studeras ofta ammoniakemission från stallmiljö och gödsellager genom att mäta koncentrationen i luft (Frank & Swensson, 2002). Med FTIR-teknik finns möjlighet att till en låg kostnad samtidigt mäta både försvinnande av urea och bildande av ammoniak i vätskefasen.

Material och metoder

Provmaterial

För kalibreringsarbetet användes gårdsprover med flytgödsel insamlade från mellansvenska gårdar i SLF-projekt H0870039, nyinsamlade prover från uppländska gårdar och prover från det nedan beskrivna inkubationsexperimentet. För att utöka materialet lagrades opreparerade duplikat av de nyinsamlade gårdsproven ytterligare en månad i kyl efter första analys och tillsattes extra urea innan förnyad preparering och analys.

Inkubationsexperiment

Som en del i projektet gjordes ett inkubationsexperiment med färsk flytgödsel. Träck från tre olika stallavdelningar med producerande kor vid SLU:s Lövstaaanläggning samlades upp kvällen innan experimentet och kylförvarades över natt som tre separata partier. Träcken fångades antingen upp ”i fallet” bakom kon eller togs från färskas urinfria mockor på båspall och skrapgångar. På morgonen för experimentet samlades urin direkt från urinerande kor i en av stallavdelningarna till ett gemensamt prov. I uppsamlingen användes hinkar och dunkar som sköljts med svag saltsyralösning för att hindra hydrolys av urea innan experimentstart. Vid experimentets start blandades träck, urin och vatten samman i viktsproportionerna 50:36:14 och portionerades ut med 5 kg vardera i totalt 12 plasthinkar som täcktes med löst liggande lock. Till hälften av hinkarna hade vattnet förstärkts med urea (12,36 g urea-N/l). Eftersom urinen innehöll 5,08 g urea-N/l innebar det att koncentrationen av urea-N i flytgödselblandningen fördubblades med den extra ureatillsatsen. Av de 12 hinkarna med flytgödselblandning placerades 6 hinkar i en lokal med temperatur 9°C och 6 hinkar i en lokal med temperatur 20°C. Det gav en försöksdesign med 2 temperaturer × 2 urea-N-nivåer × 3 upprepningar (de tre stallavdelningar som träcken hämtats från). Direkt vid starten och vid tidpunkterna 1, 3, 5, 8 och 24 timmar samt 14 dygn mättes pH och två 40 ml centrifugrör med prov togs från inkubationshinkarna och preparerades för analys enligt nedan.

Provpreparering, skanning och referensanalys

Tabell 2 visar den prepareringsprocedur som slutligen tillämpades. Provprepareringen måste dels ge ett tillräckligt rent vätskeprov för att provet skall kunna passera analysinstrumentets spaltöppning (40 μm), dels reglera pH till önskat intervall. Kalibreringar för IR-spektra av samma ämne kan ofta göras vid flera vitt skilda pH-områden. Viktiga faktorer är tillräckligt avstånd från pKa för de ämnen som skall analyseras och att dessa ämnen har hög löslighet i det valda pH-området. I det här fallet var $\text{pH} < 2$ lämpligt. Triklorättiksyra (TCA) är en relativt stark syra (pKa 0,9) som ofta används i analysarbete för att fälla ut t.ex. föroreningar eller proteiner från lösningar. Inledningsvis testades olika koncentrationer av TCA kombinerat med filtrering och centrifugering. Det visade sig att en koncentration av 70 g TCA/l i det färdiga provet var tillräckligt för att ge ett $\text{pH} < 2$ och ett tillräckligt rent prov i kombination med kylcentrifugering. Däremot lyckades inte försöken att åstadkomma ett rent prov utan centrifugering.

Tabell 1. Dataset för kalibrering

Dataset	A	B	A+ B
Ursprung	Gårdsprover	Inkubationsexperiment	
Antal observationer $\text{NH}_3\text{-N}$	43	78	121
Medelvärde, g $\text{NH}_3\text{-N/l}$	1,64	1,45	1,52
Maxvärde, g $\text{NH}_3\text{-N/l}$	3,87	4,40	4,40
Minimivärde, g $\text{NH}_3\text{-N/l}$	0,58	0,22	0,22
Standardavvikelse, g $\text{NH}_3\text{-N/l}$	0,78	1,15	1,03
Antal observationer urea-N	28	78	106
Medelvärde, g urea-N/l	1,06	1,39	1,30
Maxvärde, g urea-N/l	4,23	3,47	4,23
Minimivärde, g urea-N/l	0,00	-0,13	-0,13
Standardavvikelse, g urea-N/l	1,47	1,20	1,28

Tabell 2. Prepareringsmetod för flytgödselprov till skanning på FTIR-instrument

Grovsilning genom durkslag och överföring till 40 mL centrifugrör

Centrifugering 30 min vid 4000 G och 6°C

Överföring av 30 ml supernatant till nytt centrifugrör

Tillsats av 2,26 ml TCA-lösning 1000 g/l (motsvarar 70 g/l i det färdiga provet)

Kylförvaring över natt för att ge utfällning

Centrifugering 30 min vid 4000 G och 6°C

Skanning av provet på FTIR-instrument

De preparerade proven skannades på det ordinarie mjölkanalysinstrumentet vid Kungsängens forskningscentrum, ett FOSS FTIR 120 för transmittans i 1055 våglängdsband i området 2,00 – 10,80 μm . I anslutning till skanningarna gjordes referensanalyser på en AutoAnalyzer III (SEAL Analytical GmbH, Norderstedt, Tyskland) med standardmetoder som är väl etablerade på vårt laboratorium. För $\text{NH}_3\text{-N}$ användes en Berthelotreaktion (fenol-hypoklorit) uppsatt enligt Broderick & Kang (1980) och för urea-N en diacetyl-monoximetod (Technicon, 1974).

Kalibrering

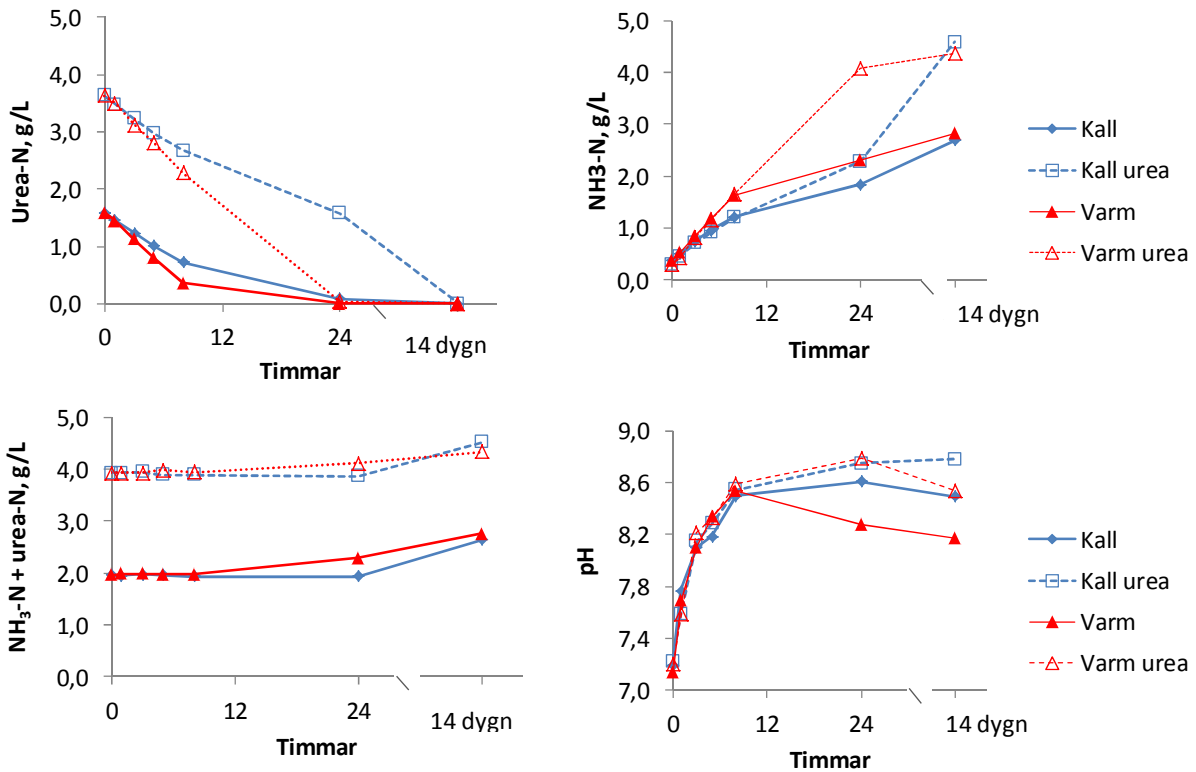
Tranmittansdata från FTIR-instrumentet exporterades till Excel och konverterades till absorbansvärden innan kalibrering. Med MiniTab, version 16, gjordes multipelregressioner med absorbansvärden för de olika våglängdsområdena som x-variabler och referensanalyser för $\text{NH}_3\text{-N}$ respektive urea-N som y-variabler. Stegvis regression med så kallad framlängesselektion användes. Det innebär att nya förklarande variabler (våglängder) tas med i modellen tills inga nya variabler längre uppfyller valda signifikanskrav, i det här fallet $p < 0,05$ för att tas med och även för att få vara kvar i modellen om nya variabler ändrar signifikansförhållandena. Hela datasetet användes i detta första steg. Med koefficienterna för de signifikanta variablerna (våglängderna) gjordes sedan skattningar av $\text{NH}_3\text{-N}$ och urea-N för hela datasetet. Dessutom gjordes korsvisa skattningar där hela datasetet delades upp i två delar, med gårdsprover som en del (A) och prover från inkubationsexperimentet som en annan del (B). Alla våglängder som visat sig signifikanta användes för att göra en kalibrering med det ena datasetet, varefter de tillämpades för att skatta $\text{NH}_3\text{-N}$ och urea-N för det andra datasetet.

Med tanke på möjligheterna att använda små bärbara analysinstrument med ett litet antal fasta filter gjordes också liknande korsvisa kalibreringar med färre våglängdsområden. Den minsta våglängdskombination som gett ett $R^2 > 0,98$ i den inledande stegvisa regressionen användes.

Resultat och diskussion

Inkubationsexperiment

Figur 1 visar utvecklingen över tid för $\text{NH}_3\text{-N}$, urea-N, ($\text{NH}_3\text{-N} + \text{urea-N}$) samt pH i inkubationskärlen. Det var signifikanta effekter ($p < 0,05$) av ureatillsats och tid för halterna av $\text{NH}_3\text{-N}$ och urea-N samt för summan ($\text{NH}_3\text{-N} + \text{urea-N}$). För $\text{NH}_3\text{-N}$ och urea-N var även temperatureffekten signifikant, medan endast tidseffekten var signifikant för pH. Samspelet temperatur \times ureatillsats \times tid var starkt signifikant ($p < 0,001$) för alla fyra responsvariablerna i Figur 1. Allt urea-N hade hydrolyserats till $\text{NH}_3\text{-N}$ efter 24 timmar, med undantag för proven med extra ureatillsats i kall miljö. Halten av $\text{NH}_3\text{-N}$ ökade i takt med försvinnandet av urea-N, så att summan var konstant de första 8 timmarna. Efter 24 timmar fanns en svag ökning av summan i den varma miljön och efter 14 dygn hade summan ökat också i den kalla miljön. Sannolikt har en viss hydrolys till ammoniak av andra kväveföreningar än urea skett (Bussink & Oenema, 1998).



Figur 1. Försvinnande av urea-N, bildning av NH₃-N och pH-förändring vid inkubation av flytgödsel efter blandning av träck, urin och vatten vid tiden 0. Inkubation i kall (9°C) eller varm (20°C) omgivning. ”Urea” innebär att extra urea tillsats med samma mängd som tillförts med urinen. Varje punkt är ett medelvärde från 3 observationer. Största standard error of difference (SED) är: 0,086 g urea-N; 0,108 g NH₃-N; 0,072 g (NH₃-N + urea-N) och 0,117 pH-enheter.

Med de reaktionskonstanter som Muck (1982) mätte upp för ureas i kogödsel borde all urea hydrolyseras på cirka 7 timmar vid 20°C och på 14 timmar vid 9°C. Muck (1982) rapporterade att 95 % av urinens urea hydrolyserades på 6 timmar vid 30°C, medan det krävdes 24 timmar vid 10°C. Kvoten urea-N:träck (våtvikt) var hos Muck (1982) i nivå med de prov i detta försök som inte tillsatts extra urea, medan proverna med tillsats hade dubbelt så hög kvot urea-N:träck. Det är alltså rimligt att anta ureasaktiviteten helt enkelt inte räckt till på grund av den höga andelen urea-N. Proverna utan ureatillsats hade kvoter motsvarande gödseln från kor i mittlaktation och foderstater med 170 g RP/kg ts, medan proverna med tillsats motsvarade gödseln från kor med 210 g RP/kg ts i foderstaten (Burgos et al., 2010).

Det är också troligt att ureahydrolysen bromsades av den pH-ökning som ammoniakbildningen förorsakade. Muck (1982) noterade avtagande ureasaktivitet utanför det optimala pH-området

6,6 -7,6. I detta försök gick det att se ett avtagande ureaförsvinnande kopplat till högt pH efter 6-8 timmar för alla försöksleden utom för de ureatillsatta proven i varm miljö.

Kalibreringar

Tabell 3 visar de våglängdsområden som användes vid kalibreringarna. Vid den stegvisa regressionen av hela datasetet var 8 våglängder signifikanta för NH₃-N och 13 våglängder var signifikanta för urea-N. Det minsta antal våglängder som krävdes för att ge R² > 0,98 var 3 för NH₃-N och 5 för urea-N. Figur 2 visar kalibreringen för NH₃-N med hela datasetet och alla signifikanta våglängder. Tabell 4 ger statistik för denna kalibrering och för de korsvisa kalibreringar där data delats upp i ett kalibreringsset och ett valideringsset (A och B som beskrivs i Tabell 1). Samtliga kalibreringar uppfyllde kravet att kvoten Standardavvikelse dataset/ Standardavvikelse regression skall överstiga 3. De kalibreringar som gjordes med dataset A (gårdsdata) blev genomgående bättre än de som gjordes med dataset B (inkubationsexperimentet). Det beror sannolikt på en större spridning i sammansättningen av gårdsprover. Även om varje prov från inkubationsexperimentet hade en unik kombination av halter av NH₃-N och urea-N så hade de ändå en ensartad bakgrund och förmodligen ganska likartade spektra i övrigt.

I Figur 3 återges kalibreringen för urea-N med hela datasetet och i Tabell 5 finns statistik för alla kalibreringar för urea-N. Även för urea-N var kalibreringar från gårdsproverna (A) bättre för att predikera värden från inkubationsexperimentet (B) än vice versa. Den mycket höga variationskoefficienten (79 %) med kalibrering från minimiantalet våglängder och set B beror på att den kalibreringen resulterade i många negativa prediktioner.

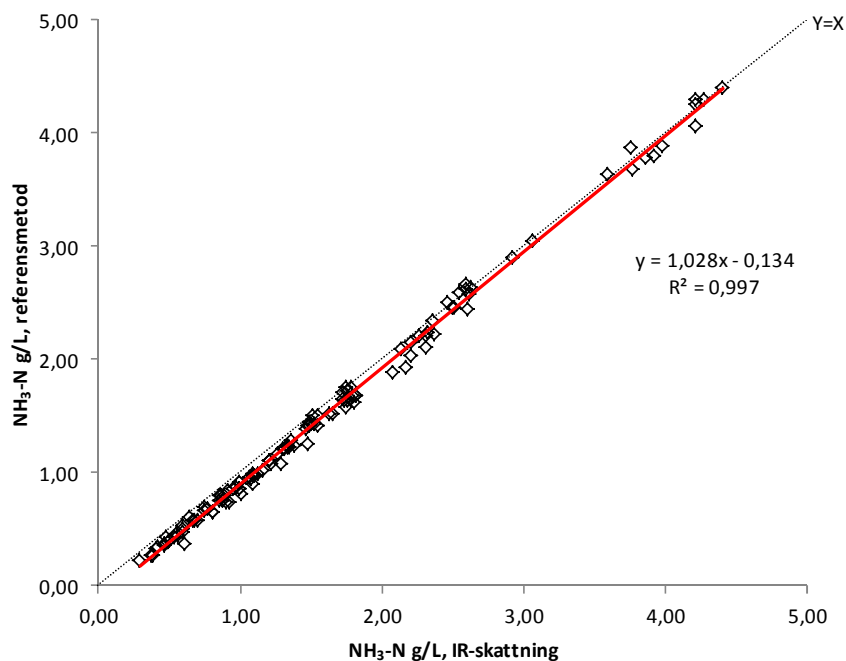
Tabell 3. Våglängder som använts för kalibreringarna

Alla signifikanta våglängder		Minimiantal våglängder	
NH ₃ -N	Urea-N	NH ₃ -N	Urea-N
9,672 μm	9,495 μm	9,565 μm	10,008 μm
9,600 μm	8,786 μm	6,968 μm	9,095 μm
9,565 μm	8,640 μm	6,680 μm	8,640 μm
7,005 μm	8,526 μm		7,200 μm
6,968 μm	7,240 μm		5,709 μm
6,680 μm	7,063 μm		
6,529 μm	6,987 μm		
5,799 μm	6,839 μm		
	6,322 μm		
	6,307 μm		
	5,851 μm		
	5,697 μm		
	4,863 μm		

Tabell 4. Kalibreringsresultat för NH₃-N

Dataset kalibrering	A+ B	A	B	A	B
Dataset predikerat	A+ B	B	A	B	A
Antal använda våglängder	8	8	8	3	3
Regression (observerade värden som y, predikerade som x)					
Intercept	-0,13	-0,11	-0,24	0,01	0,16
Lutning	1,03	1,06	1,07	1,02	0,89
R ²	0,997	0,995	0,981	0,996	0,966
Stdav ¹ regression, g NH ₃ -N/l	0,06	0,08	0,11	0,07	0,14
Stdav ¹ dataset/Stdav ¹ regression	17,5	13,7	7,2	16,3	5,4
Variationskoefficient ² regression	4%	6%	6%	5%	9%
Prediktionsfel (RMSPE) ³ , g NH ₃ -N/l	0,11	0,11	0,17	0,08	0,17
Relativt prediktionsfel (MPE) ⁴	7%	7%	10%	5%	11%
Fördelning av variansen					
Generell bias	65%	6%	50%	17%	2%
Lutningsbias	6%	35%	9%	7%	31%
Slumpmässig bias	28%	59%	41%	76%	67%

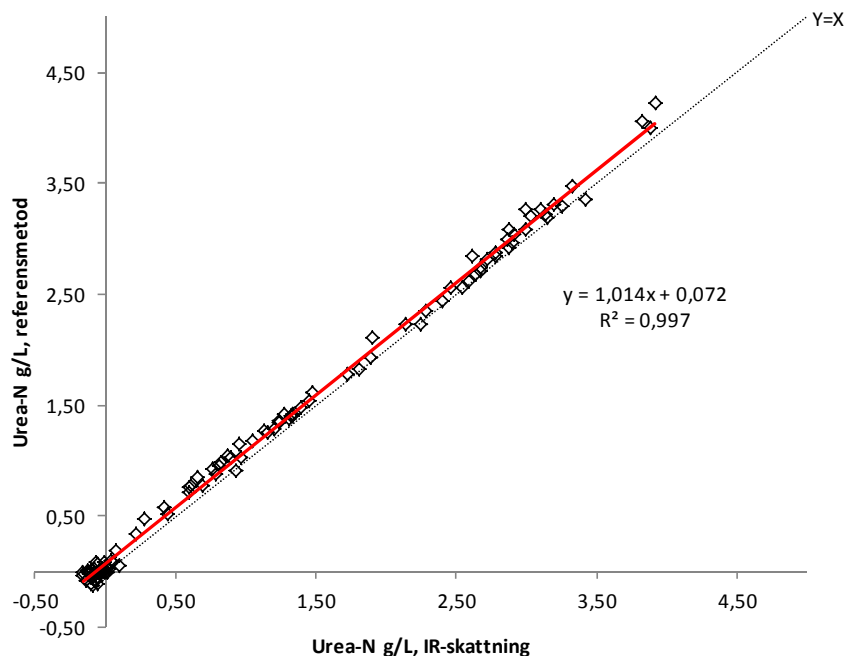
¹Standardavvikelse; ²Stdav regression/predikerat medelvärde; ³Root Mean Square Prediction Error; ⁴RMSPE/predikerat medelvärde

**Figur 2.** Kalibrering för NH₃-N med alla data (A+B) och 8 våglängder.

Tabell 5. Kalibreringsresultat för urea-N

Dataset kalibrering	A+ B	A	B	A	B
Dataset predikerat från IR	A+ B	B	A	B	A
Antal använda våglängder	13	13	13	5	5
Regression (observerade värden som y, predikerade som x)					
Intercept	0,07	0,12	-0,22	-0,15	0,37
Lutning	1,01	0,97	1,09	1,07	1,01
R ²	0,997	0,997	0,967	0,968	0,959
Stdav ¹ regression, g urea-N/l	0,07	0,07	0,27	0,22	0,30
Stdav ¹ dataset/Stdav ¹ regression	19,3	16,8	5,4	5,6	4,8
Variationskoefficient ² regression	5%	5%	34%	15%	79%
Prediktionsfel (RMSPE) ³ , g urea-N/l	0,11	0,12	0,31	0,23	0,48
Relativt prediktionsfel (MPE) ⁴	9%	8%	29%	17%	45%
Fördelning av prediktionsfelet					
Generell bias	63%	54%	36%	5%	79%
Lutningsbias	2%	9%	29%	11%	7%
Slumpmässig bias	34%	37%	35%	85%	15%

¹Standardavvikelse; ²Stdav regression/predikerat medelvärde; ³Root Mean Square Prediction Error; ⁴RMSPE/predikerat medelvärde



Figur 3. Kalibrering för urea-N med alla data (A+B) och 13 våglängder.

Publikationer

En publicering som Technical Note planeras i "Agriculture, Ecosystems & Environment" eller annan motsvarande tidskrift inom området.

Slutsatser

Ureasaktiviteten i träck från producerande kor är tillräcklig för att hydrolysera all urea från kornas urin till ammoniak och koldioxid inom 24 timmar utom vid foderstater med råproteinhalt över 170 g/kg ts och omgivningstemperatur under 20° C.

Koncentrationen av NH₃-N i flytgödsel kan skattas med ett prediktionsfel omkring 0,1 g/l från absorbansen hos tre våglängder inom MID-IR-området. Det gör det möjligt att använda instrument med fasta filter. Koncentrationen av urea-N kan också skattas med ett prediktionsfel omkring 0,1 g/l om 13 våglängder används. Med åtta våglängder fördubblas prediktionsfelet. Tekniken kan direkt användas för att samtidigt mäta NH₃-N och urea-N i olika experiment med flytgödsel och för att analysera NH₃-N i gödselbrunnar inför spridning. Den viktigaste förutsättningen för att kunna använda metoden i fält och under enklare förhållanden är att provprepareringen kan göras enklare.

För kalibrering bör prover med så olika bakgrund som möjligt, till exempel prover från olika gårdar, användas.

Resultatförmedling till näringen

Resultaten kommer att förmedlas till Greppa Näringens rådgivare.

Referenser

Broderick G.A. & Kang J.H. (1980) Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy. Sci.* 63:64–75.

Burgos, S. A., Embertson, N. M., Zhao, Y., Mitloehner, F. M., DePeters, E. J. & Fadel, J. G. 2010. Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to ammonia emissions. *J. Dairy. Sci.* 93: 2377-2386

Bussink, D.W., Oenema, O., 1998. Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review. *Nutrient Cycling In Agroecosystems* 51, 19-33.

Frank, B., Swensson, C., 2002. Relationship Between Content of Crude Protein in Rations for Dairy Cows and Milk Yield, Concentration of Urea in Milk and Ammonia Emissions. *J Dairy Sci* 85, 1829-1838.

Muck, R. E. 1982. Urease Activity in Bovine Feces. *J. Dairy. Sci.* 65:2157-2163

Technicon. 1974. Technicon method No. SE40001FD4. Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, NY.

Udén, P. 2009. Estimating residual starch from *in vitro* fermentations by Fourier transform mid-IR transmission spectroscopy. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 152 (1/2): 133-140