

Slutrapport för projekt V1030052

Utveckling av metoder för att minska metanförlusterna i vallfoderbaserade foderstater till högvastande mjölkkor

J. Bertilsson¹, R. Danielsson¹, P. Huhtanen² & M. Ramin²

¹Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV), SLU, Uppsala

²Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap (NJV), SLU, Umeå

Bakgrund

Det faktum att kornas omsättning av foder leder till produktion av metan har varit en mycket omdiskuterad fråga under de senaste åren. Kunskapen om detta är gammal, men att metan dessutom är en av de kraftfullaste växthusgaserna har blivit allt mer klarlagt under senare tid. Det beräknas att metan från idisslarnas foderomsättning står för ca en tredjedel av jordbrukets bidrag till växthusgasutsläppen i Sverige. Det är därför viktigt att frågan tas på allvar och att kunskap tas fram för att belysa frågan i ett vidare perspektiv och att eventuella åtgärder bygger på ett så bra underlag som möjligt.

Det finns en variation i kornas metanavgång som beror på utfodringen, såväl fodermängd som foderkvalitet. I äldre undersökningar har betonats att ökad andel grovfoder ökar metanavgången. Samtidigt är ju ett av de starkaste argumenten som talar för idisslare deras förmåga att omvandla produkter som inte människan kan utnyttja, t. ex. gräs till högvärdig föda. För att kunna basera åtgärder som är positiva i sammanhanget på en vetenskaplig grund, behövs det utvecklas metoder som kan värdera olika foder och foderstater även vad gäller efter hur mycket metan som bildas. Det finns redan metoder att mäta metanproduktionen på individnivå, t.ex. respirationskammare, men dessa är arbetskrävande och därmed dyra. Det finns ett behov av att utveckla enkla och snabba laboriemetoder som kan användas för att jämföra och rangera olika fodermedel och foderstater snabbt och billigt.

Material och metoder

I projektet har vi utvecklat och utvärderat en laboriemetod med hög kapacitet för att mäta metanproduktionen från foder och fodertillsatser som utfodras till mjölkkor. Arbetet har haft tre delar, nämligen

1. Att utveckla och validera en gas-in vitro-metod för metanmätningar
2. Test av foder, foderingsredienser och fodertillsatser som kan tänkas ha förmåga att reducera metanförlusterna i våmmen
3. Användning av modern mikrobiologisk teknik för att validera resultat och att öka kunskapen om mikrobiell bakgrund till metanbildning i våmmen.

Utgångspunkten för utvecklingen av laboriemetoden var en befintlig utrustning vid institutionen för norrländsk fodervetenskap, SLU, Umeå. I denna metod blandas små fodermängder med våmvätska och buffert i en glasflaska. Det ursprungliga ändamålet för metoden var att beräkna fodrets smältbarhet och därmed även dess energiinnehåll. I den nu utvecklade metoden vägdes foder in i små mängder (300-1200 mg) och blandades med övriga ingredienser i glasflaskor. Förutom totala mängden fettsyror (VFA) och smältbarhet kunde mängden metan beräknas genom att gas togs ut med en gastät injektionsspruta vid 6 olika tidpunkter fördelade över 48 timmar efter att inkubationen igångsatts. Eftersom det totala utflödet av gas inte kan uppsamlas i systemet, så beräknades metanmängden vid varje tidpunkt enligt en speciell formel som tar hänsyn till gasvolymen i provflaskan, metankoncentrationen och total gasproduktion fram till tidpunkten då provet tas. Gasproduktionen under hela försöksperioden beräknades genom att sätta in dessa beräknade värden i en matematisk modell med kurvanpassning. Metoden beskrivs i detalj i referenserna 1 och 5 nedan. Metoden har sedan använts i flertalet av undersökningarna i projektet och i de artiklar som finns med i publikationslistan

Metanmätningarna har kompletterats med undersökningar av mikrofloran i våmmen med moderna DNA-baserade tekniker (T-RFLP, 16S rRNA genbibliotek, qRT-PCR). I artikel 2 har våmvätska från ett tidigare försök där metan mätts hos levande djur med en ledkroppsteknik (SF₆-metoden) analyserats medan i artikel 3 så är det våmvätska från laborieförsöken som analyserats. I artikel 3 har mikrober från de ovan nämnda gas- *in vitro*-försöken analyserats och jämförts för att få en uppfattning om de processer som sker på laboriet är jämförbara med de som sker i våmmen hos kon.

Resultat

Utveckling av en *in vitro*-metod för mätning av metan (Referens 1 och 5)

Tillsammans med mätningarna gjordes också stökiometriska beräkningar (stökiometri = läran om de mängdförhållanden i vilka kemiska ämnen reagerar med varandra) där produktionen av VFA (flyktiga fettsyror) vid 24 och 48 timmar användes som indata. Korrelationen var hög mellan metanproduktion uppmätta *in vitro*-systemet och beräknade stökiometriskt. Som man kan se i figur 5 så korsade regressionslinjen nära nollpunkten och lutningen låg nära 1.0, vilket båda visar att det var ett bra samband och att det var slumpen som stod för variationen. I figurerna 2 och 3 visas principerna för systemets funktion och några viktiga resultat.

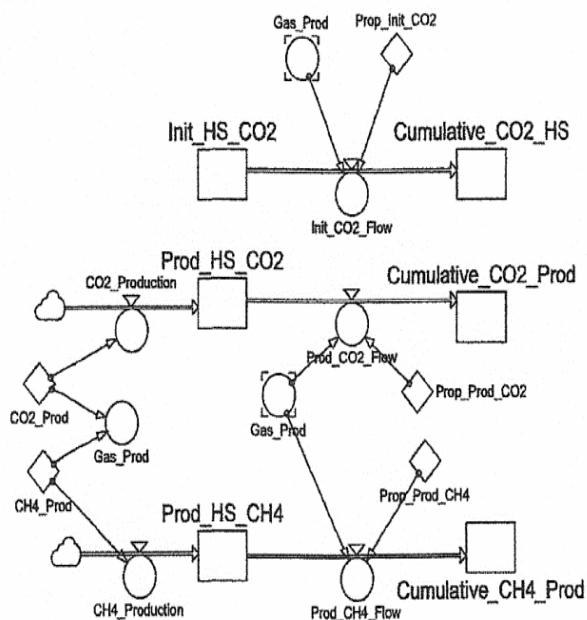


Fig. 2. A simplified model describing the prediction of methane concentration in gas outflow from the *in vitro* gas system. Init.HS.CO₂ = initial headspace CO₂ pool [1], Prod.HS.CO₂ = produced headspace CO₂ pool [2], Prod.HS.CH₄ = produced headspace CH₄ pool [3], Cumulative.CO₂.HS = cumulative outflow pool of initial headspace CO₂ [4], Cumulative.CO₂.Prod = cumulative outflow pool of produced CO₂ [5], Cumulative.CH₄.Prod = cumulative outflow pool of produced CH₄ [6], CO₂.Prod and CH₄.Prod = production of CO₂ and CH₄ from substrate fermentation according to stoichiometric principles, Gas.Prod = total gas production (CO₂.Prod + CH₄.Prod), Prop.Init.CO₂ = proportion of initial CO₂ in headspace, Prop.Prod.CO₂ = proportion of produced CO₂ in headspace, Prop.Prod.CH₄ = proportion of produced CH₄ in headspace, Init.CO₂.Flow = flow of initial headspace CO₂ from headspace, Prod.CO₂.Flow = flow of produced CO₂ from headspace, Prod.CH₄.Flow = flow of produced CH₄ from headspace. At the beginning of fermentation the fractional CO₂ concentration in pool [1] is 1.00, whereas in the other pools fractional gas concentrations are 0.00. The volume of headspace ([1] + [2] + [3]) = 265 ml during the whole incubation. Relative CH₄ concentration (outflow/head space) is calculated as $[6 / (4 + 5 + 6)] / [3 / (1 + 2 + 3)]$.

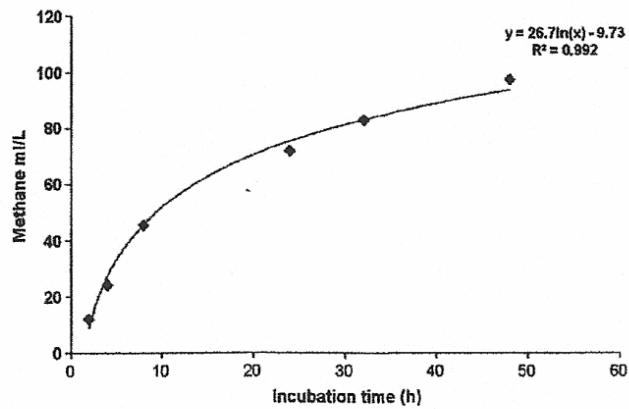


Fig. 3. Logarithmic model fitted to observed methane concentration data to obtain values at time intervals of 0.2 h.

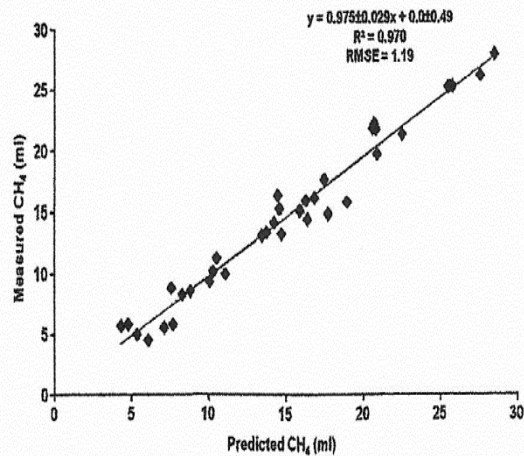


Fig. 5. Relationship between methane production predicted from volatile fatty acid stoichiometry and measured *in vitro* gas system at 24 and 48 h; $y = 0.975(\pm 0.029)x + 0.0(\pm 0.49)$ ($n = 36$, $R^2 = 0.970$ and root mean square error = 1.19).

Metoden gav realistiska mätvärden i jämförelse med vad som kunde beräknas och det visar att systemet är ett lovande verktyg för värdera fodermedel och fodertillsatser vad gäller deras inverkan på metanproduktionen i våmmen.

Utvärdering av en alternativ laboratoriemetod för bestämning av metan (Referens 4)

På senare tid har in vitro-metoder börjat användas för att utvärdera effekterna av olika foderstater och tillsatsmedel på bildningen av metan. Foderproverna kan vara inneslutna i fiberpåsar eller direkt upplösta i *in vitro*-mediet. Användning av filterpåsar gör analys av smältbarhet enklare eftersom det blir lättare att föra över foderresterna efter inkubationen. Emellertid kan påsar begränsa den mikrobiella nedbrytningen och partiklar kan förloras från påsarna under inkubationen. Slutligen kan påsen utgöra ett fysiskt hinder för bortförande av slutprodukter från nedbrytningen. Hypotesen var att den beräknade metanavgången skulle bli lägre när foderproverna inneslöts i påsar. Målsättningen med försöket var att jämföra metanavgången från olika fyra olika kraftfoder och fyra olika grovfoder. Data från försöket erhöles vid tidpunkterna 24 och 48 timmar analyserades statistiskt. Metanavgången skiljde signifikant mellan metoderna både vid 24 och 48 timmar. Foder direkt upplöst i mediet gav högre metanavgång vid båda tidpunkterna. Samspelet mellan foder och metod på gas avgång var signifikant. Detta innebär att beroende på vilken metod som används rangerar sig fodermedlen olika vad gäller metanavgång. Andelen metan av total gasavgång var högre när fodret var inneslutet i en påse. Slutsatsen av försöket var att metoden med filterpåsar inte kan rekommenderas för metanmätningar.

Jämförelse mellan alternativa medium för in vitro-analys (Referens 6)

I denna undersökning jämfördes metanbildning in vitro såväl som andra fermentationsparametrar när olika substrat inokulerades antingen med inokulum från våm eller från träck. Resultaten visade att total gasproduktion, metanproduktion och förhållandet metan /total gasproduktion var högre för substrat inokulerat med våm- än för träckinokulum. Skillnaden mellan observerade och stökiometriskt beräknad metanproduktion tyder på en syrabildning efter våmmen.

Metanbildande mikroorganismer och metanproduktion hos svenska kor som utfodrats med olika andel vallfoder (Referens 2)

Metan bildas i våmmen av metanbilare (arkeér) huvudsakligen genom reduktion av koldioxid med väte som frigörs av protozoer, svampar och bakterier vid nedbrytningen av foder. Trots att metanbildning i våmmen har studerats intensivt, så finns det inget slutgiltigt svar för hur metannivåerna regleras eller hur man kan minska deras metanproduktion. Faktorer som anses påverka är foderstaten och mikrobsammansättningen i våmvätskan. Teoretiskt ger kraftfoderrika foderstater ett lägre förhållande acetat/propionat och minskad väteproduktion som i slutändan ger

mindre bildning av metan. Mikrobiologiska analyser av våmmen har avslöjat att det finns såväl individvariation som påverkan av geografiska och klimatmässiga förhållanden. Mjölkcor som hålls under nordiska förhållanden, där det är vanligt med stor andel grovfoder, har visats ha relativt låg andel propionat i våmmen. Vid ekologisk produktion ska grovfoderandelen vara minst 60%. Detta skulle kunna leda till högre metanbildning. Avsikten med detta försök var att undersöka sambandet mellan metanbildande mikroorganismer, foder, flyktiga fettsyror, pH och metanbildning. Sammanfattningsvis kan sägas att inverkan av foderstat på sammansättningen av metanproducerande mikrober var olika för olika kor. Resultaten bekräftade att genom att dela upp släktet det metanbildande släktet *Methanobrevibacter* i två skilda undergrupper går det bättre att förklara den observerade variationen i metanproduktion från de enskilda korna. Det är naturligtvis av intresse att det finns en variation i metanproduktion mellan kor och att man kan förstå vad denna beror på om man vill selektera för kor som har lägre metanproduktion. Höga mängder grovfoder i sig, speciellt inte om det har hög smältbarhet, behöver inte ge mera metan. Det behövs emellertid mera undersökningar där man kombinerar mätningar av metan hos kon, mikrofloras sammansättning i våmmen samt foderutnyttjande och mjökproduktion för att öka kunskapen om detta. Sådana undersökningar pågår på många håll, såväl internationellt som i Sverige.

Effekter på metanproduktion och bakterie- och arkéer i våmmen vid tillsats av cashewnöts-extrakt och glycerol in vitro (Referens 3)

Syftet med denna studie var att utvärdera effekten av att tillsätta extrakt av cashewnötter (CNSE) och glycerol på metanproduktion och våmmikrober i det tidigare beskrivna automatiserade *in vitro*-systemet. Mikrosammansättning jämfördes mellan *in vitro*-systemet och våmvätska som togs direkt från levande kor. Till *in vitro*-systemet tillsattes foder i proportionen 60/40 (grovfoder/kraftfoder) samt en av 5 olika behandlingar: 5 mg CNSE, 10 mg CNSE, 15 mmol glycerol/l, 30mmol glycerol/l samt en kontroll utan tillsats. Gasprov togs ut vid tidpunkterna 2, 4, 8, 24, 32 and 48 timmar efter att processen startats och metankoncentrationen mättes. Prover på våmvätska från kor togs två timmar efter morgonutfodringen under tre på varandra följande dagar med syfte att jämföra *in vitro*-systemet med den levande kon.

För att slutsatser om vad som händer i våmmen ska kunna dras från laborieförsök, så är det väsentligt att mikroberna i laboratoriesystemet reagerar på liknande sätt som i våmmen. I denna studie så var mikrosammansättningen vid jämförelse mellan *in vitro* efter 8 timmar mycket lika *in vivo* (hos kon). Detta visade att överföringen från kon till laboratoriesystemet inte hade några större effekter. Efter 8 timmar så ändrade sig mikrosammansättningen i *in vitro*-systemet. Störst var förändringen för släktet *Methanobrevibacter*. Även med beaktande av dessa skillnader så är effekten av CNSE påtaglig.

Gasdata och data från de mikrobiologiska analyserna (454 sekvensering) analyserades statistiskt. Analyserna visade att metanproduktionen minskade med 8 respektive 18 % för de olika nivåerna av tillsats av extrakt från skal av cashew-nötter. Glycerol däremot ökade metanproduktionen med

8 resp 12 % för respektive koncentration. Minskningen med tillsats av CNSE skulle kunna bero på en observerad förändring i bakteriepopulationen som kan ha inneburit lägre produktion av väte eller myrsyra som är substanser som ökar metanproduktionen. Alternativt skulle effekten bero på ett skifte i sammansättningen av metanbildande mikroorganismer. Tillsatsen av glycerol gav inga större förändringar av bakterier och arkéer i våmvätskan i jämförelse med kontrollen. Det är därför troligt att det var ökningen av substrat i in vitro-systemet som gav den högre metanproduktionen när glycerol tillsattes. Resultaten visar att extrakt av cashewnötskal kan vara en fodertillsats som kan sänka metanproduktionen från mjölkkor.

Jämförelse mellan metanproduktion uppmätt in vitro och från mätningar hos djur (ännu ej utvärderat försök)

I en studie jämfördes metanproduktion uppmätt i försök med mjölkkor där mätningar gjorts med ”säkra” metoder, företrädesvis respirationskammare och metanproduktion i *in vitro*-systemet där samma fodermedel och i samma proportioner vägts in till systemet. I studien har vi försökt få med olika faktorer som har betydelse för metanproduktionen: proportioner kraftfoder/, smältbarhet för grovfoder, olika grovfodertyper, fetttillskott, proteintillskott, utfodringsnivå. Den praktiska delen av studien är utförd. Efter doktoranden Rebecca Danielssons återkomst från barnledigheten (hösten 2015) kommer utvärdering av studien att ske och den kommer att ingå i hennes avhandling som planeras till våren 2016. Huvudsyftet med detta delprojekt var att undersöka om laboratoriesystemet rangerar foder och foderstater på samma sätt som resultaten från djurförsöken samt om nivåerna på mätningarna i laboratoriet ligger rimligt lika som vad som uppmätts hos kor.

Diskussion

Delstudierna som ingår i projektet visar att *gas in vitro*-systemet som utvecklats har potential att vara ett bra verktyg för att värdera olika fodermedel och fodertillsatser vad gäller deras inverkan på metanbildning i våmmen hos mjölkkor. Mikrobiologiska studier på våmvätska från kor och från laboratoriesystemet visar att de fungera rimligt lika och att laboratoriemetoden bygger på samma biologiska processer som hos det levande djuret. De mikrobiologiska analyserna på våmvätskan visar att det finns en stor individskillnad i metanbildning. Ökad kunskap om bakgrunden till denna variation innebär att det finns möjligheter att påverka djurens metanproduktion och kanske också så småningom välja ut kor som både mjölkar bra och ger låg metanproduktion.

Totalt har projektet hittills gett upphov till en doktorsavhandling och 5 artiklar publicerade i välrenommerade internationella tidskrifter med referee-system. Inom de närmaste åren förväntas ytterligare en doktorsavhandling med huvuddelen av underlaget från detta projekt samt dessutom 2-3 ytterligare artiklar. Information från projektet kommer att spridas via de deltagande

forskarnas medverkan i undervisning på olika nivåer och medverkan i kurser och andra aktiviteter anordnade av näringen.

Publikationer

Doktorsavhandling

1. Ramin, M. 2013. Predicting methane production in dairy cows. Doctoral thesis. Acta Universitatis agriculturae Sueciae. 84 sid.
http://pub.epsilon.slu.se/10910/1/ramin_m_131122.pdf

Referee-granskade vetenskapliga artiklar

- 2 R. Danielsson, A. Schnürer, V. Arthurson & J. Bertilsson. Methanogenic population and CH₄ production in Swedish dairy cows fed different levels of forage. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(17): 6172-6179. DOI: 10.1128/AEM.00675-12.
- 3 R. Danielsson, A. W. Omazic, M. Ramin, A. Schnürer, M. Griinari, J. Dicksved and Bertilsson, J. 2014. Effects on methane production and Bacterial and Archeal Communities by the Addition of Cashew Nut Shell Extract or Glycerol – an in vitro evaluation. *Journal of Dairy Science.* 97: 5729-5741.
- 4 M. Ramin, S. J. Krizsan, F. Jančík and P. Huhtanen. 2013. Measurements of methane emissions from feed samples in filter bags or dispersed in the medium in an in vitro gas production system. *Journal of Dairy Science.* 96: 4643-4646.
- 5 M. Ramin and P. Huhtanen. 2012. Development of an in vitro method for determination of methane production kinetics using a fully automated in vitro gas system – A modelling approach. *Animal Feed Science and Technology.* 174 (3-4): 190-200.
- 6 M. Ramin, D. Lerosé, F. Tagliapietra and P. Huhtanen. 2014. Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated in vitro gas production system (**under review**).

Konferenser

- 7 M. Ramin, M. Vaga, E. H. Cabezas-Garcia and E. Detmann. Comparison between individual feeds and total diets on predicted methane production from *in vitro* simulations. Proceedings of the 5th Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 10-11 June 2014.

- 8 M. Ramin, D. Lerosé and P. Huhtanen. Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on methane production *in vitro*. Proceedings of the 4th Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 12-13 June 2013.
- 9 S. J. Krizsan, A. Felton, M. Ramin, A. Anttila, M. Vaga, H. Gidlund, P. Huhtanen. A comparison of herbivore digestion efficiency *in vitro* using moose spring and summer foods. Proceedings of the 4th Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 12-13 June 2013.
- 10 M. Ramin, M. Hetta and P. Huhtanen. Effect of dwarf birch leaflets (*Betula nana*) on *in vitro* methane production using a gas production technique. Proceedings of the 3rd Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 28-29 June 2012.
- 11 R. Danielsson, A. Omazic, M. Ramin, M. Griinari, A. Schnürer, J. Bertilsson, K. Holtenius and P. Huhtanen. Comparing microbial communities to evaluate methane production in a gas *in vitro* system vs. *in vivo*. Proceedings of the 3rd Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 28-29 June 2012.
- 12 R. Danielsson, J. Bertilsson, M. Griinari, A. Schnürer. Methanogen population in Swedish cows fed different levels of high quality forage. P. 554. Proceedings of the 8th international symposium of herbivores (ISNH8). Advances in biosciences, September 2011, Volume 2 part 2.
- 13 M. Ramin, S. Krizsan, L. Nyholm and P. Huhtanen. *In vitro* measurement of methane production from Finnish farm silage samples. XVI international silage conference, 2-4 July 2012, Hämeenlinna, Finland.
- 14 S. Krizsan, F. Jančík, M. Ramin and P. Huhtanen. Evaluation of some aspects of *in situ* and *in vitro* techniques in ruminant feed evaluation. XVI international silage conference, 2-4 July 2012, Hämeenlinna, Finland.
- 15 M. Ramin and P. Huhtanen. Development of *in vitro* method for determination of methane production kinetics. Proceedings of the 2nd Nordic Feed Science Conference, Uppsala, Sweden, 15-16 June 2011.
- 16 M. Ramin, M. Griinari, M. P. Huhtanen. Determination of ruminal methane production using a fully automated *in vitro* gas system - a modelling approach. Proceedings of the 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Aberystwyth, UK, 6-9 September 2011.

Slutsatser

Kornas produktion av metan beror på många faktorer som har med fodret och utfodringen att göra. Vi har visat att det finns fodertillskott som kan drastiskt sänka metanproduktionen. Det finns också en stor variation mellan individer i sammansättning av mikrober i våmmen. Det

betyder att alla kor inte reagerar lika vid samma utfodring. Mera grovfoder behöver inte betyda högre metanproduktion generellt. Sammantaget innebär detta att det finns goda möjligheter att påverka den belastning på miljön som metan från idisslarnas foderomsättning kan utgöra.

Resultatförmedling till näringen

Resultaten från undersökningarna har kontinuerligt redovisats via institutionernas hemsidor, t.ex.

<http://www.slu.se/sv/institutioner/husdjurens-utfodring-var/forskning/pagaende-projekt/minskad-metanproduktion-fran-mjolkkor-ar-det-mojligt/>

<http://www.slu.se/sv/institutioner/norrlandsk-jordbruksvetenskap/forskning/pagaende-projekt/>

men även via media, exempelvis:

<http://sverigesradio.se/sida/artikel.aspx?programid=406&artikel=3163382>

Finansiering av projektets doktorander har också medfört att huvudsökande kunnat hålla sig uppdaterad och medverka på olika sätt med att sprida information om problemställningarna i olika sammanställning. Så har t.ex. Jan Bertilsson årligen under perioden 2010 -- 2014 medverkat i Jordbruksverkets/Greppa näringens kurs för rådgivare som vill bli godkända klimatrådgivare: "Jordbruket och klimatet" . Han bidrog också med underlag till Norfors beräkningsmodell för metan från mjölkcor, samt i den vetenskapliga publiceringen av underlaget för detta. Doktoranderna har bidragit till med flera den årliga nordiska konferensen "Nordic Feed Science Conference"