

MALKEKOENS BIOLOGISKE POTENTIALE FOR REDUCERET UDSKILLELSE AF FOSFOR, KVÆLSTOF OG METAN

INTERN RAPPORT · HUSDYRBRUG NR. 22 · MAJ 2010
NIELS BASTIAN KRISTENSEN (RED.)



DET JORDBRUGSVIDENSKABELIGE FAKULTET
AARHUS UNIVERSITET



MALKEKOENS BIOLOGISKE POTENTIALER FOR REDUCERET UDSKILLELSE AF FOSFOR, KVÆLSTOF OG METAN

VI. TEMAMØDE OM MALKEKØERNES ERNÆRING

Niels Bastian Kristensen (Red.)

Aarhus Universitet
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet
Institut for Husdyrbiologi og Sundhed
Blichers Allé 20
Postboks 50

Interne rapporter indeholder hovedsagelig forskningsresultater og forsøgsopgørelser som primært henvender sig til DJF medarbejdere og samarbejdspartnere. Rapporterne kan ligeledes fungere som bilag til temamøder. Rapporterne kan også beskrive interne forhold og retningslinier for DJF.

Rapporterne kan downloades på www.agrsci.au.dk

Tryk: www.digisource.dk

Forord

I 1995 skete der en væsentlig omstrukturering af det daværende Statens Husdyrbrugsforsøg, som bl.a. medførte, at en kreds af forskere indenfor kvægernæring med Torben Hvelplund i spidsen dannede Forskergruppen for Drøvtyggerernæring under Afdeling for Husdyrernæring (senere afdeling for Husdyrernæring og Fysiologi). Forskergruppen for Drøvtyggerernæring havde et stærkt praksisophæng og arbejdede med både basal og anvendelsesorienteret ernæringsforskning. Forskningen blev fulgt op af en strategi omkring regelmæssig afholdelse af temamøder med fokus på praksisrelevant formidling til alle med interesse i kvægerhvervet. Første (I.) temamøde om malkekøernes ernæring med udgangspunkt i arbejdet udført af Torben Hvelplund's forskergruppe blev afholdt 8. april 1997 (Intern Rapport nr. 88, 1997, Statens Husdyrbrugsforsøg).

Nærværende rapport indeholder indlæg givet ved det VI. temamøde i serien af møder om malkekøernes ernæring. Emnet for mødet er malkekoens biologiske potentiale for reduceret udskillelse af fosfor, kvælstof og metan. Målet med mødet er i tråd med tidligere møder at præsentere ernæringsrelateret kvægforskning for alle forskningsbrugere. Torben Hvelplund er også denne gang blandt bidragsyderne til de faglige indlæg, og Torben slutter dagen af med afskedsforelæsning i anledning af at han går på pension.

Indlæggene rapporterer fra igangværende forskning udført under bl.a. VMP III forskningsprogrammet "Husdyrhold, naboerne og miljøet 2006-2010". Forskningsprojekterne har bidraget til en bedre forståelse af produktionsudviklingen og de fysiologiske processer i malkekoen som er afgørende for at vi fremover i højere grad kan tage hensyn til produktionseffektiviteten, og ikke blot produktionsomfanget, når vi ernærer malkekøer.

Mødet berører ligeledes fremtidige strategier til at kompensere for en mindre usikkerhedsmargin i de foderrationer, der sammensættes til malkekøer gennem inddragelse af nye biologiske test og managementrutiner til overvågning af malkekoens ernæringsmæssige balance. Hidtil har en vis overfodring med en række næringsstoffer været anvendt til at kompensere for en usikkerhed omkring bl.a. indhold og tilgængelighed, men en stor del af det realiserbare potentiale for reduktion af malkekvægets udskillelse af kvælstof og fosfor ligger i at fjerne denne overforsyning.

Mødets hovedkonklusion er, at det er muligt fortsat at reducere tildelingen af kvælstof og fosfor, og at den primære omkostning ikke behøver at være en væsentlig reduktion af produktionsomfanget for den enkelte ko eller besætning. Omkostningerne ved at gennemføre yderligere reduktioner af kvælstof og fosfor tildelingen vil være relateret til stigende behov for:

- monitoring af koens fysiologiske respons
- hyppigere og mere detaljeret bestemmelse af fodersammensætningen
- management-ressourcer til hurtig intervention

VI. DJF Temamøde om Malkekøernes Ernæring
**Malkekoens biologiske potentiale for reduceret udskillelse af
Fosfor, Kvælstof og Metan**
Tirsdag den 4. maj 2010 kl. 08.45-13.45
&
Afskedsforelæsning og reception for Professor Torben Hvelplund
Tirsdag den 4. maj 2010 kl. 13.45 -

Auditoriet, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet (DJF), Aarhus Universitet,
Forskningscenter Foulum

- 08.45 - 09.20 **Ankomst, registrering og kaffe/te og rundstykker**
- 09.20 - 09.30 Velkomst og introduktion til dagen
*v/Niels Bastian Kristensen, Institut for Husdyrbiologi og Sundhed, DJF og
mødeleder Christian Friis Børsting, Kvægbrugets Forsøgscenter*
- 09.30 - 10.00 Malkekoens produktion og sundhed ved reduceret fosfortildeling
v/Jakob Sehested, DJF
- 10.00 - 10.20 Recirkulering af fosfor hos malkekøer
v/Liselotte Puggard, DJF
- 10.20 - 10.50 Malkekoens produktion ved reduceret kvælstoftildeling
v/Martin Riis Weisbjerg, DJF
- 10.50 - 11.10 Effekt af urea infusion på udskillelse og recirkulering af kvælstof hos
malkekøer
v/Betina Amdisen Røjen, DJF
- 11.10 - 11.40 Malkekoens potentiale for recirkulering af kvælstof
v/Niels Bastian Kristensen, DJF
- 11.40 - 12.15 **Sandwich, vand og kaffe**
- 12.15 - 12.35 Potentiale for reduktion af malkekøers metanudskillelse
v/Anne Louise Frydendahl Hellwing, DJF
- 12.35 - 13.05 Managing rations on the limit – monitoring dairy cows fed rations
optimized to minimize emissions of phosphorus, nitrogen, and methane
v/Jon Moorby, Aberystwyth University, UK
- 13.05 - 13.35 Krav til kvægbrugets miljøbelastning med fosfor, kvælstof og metan i det
nye årti
v/Steen Gade, Folketingsmedlem
- 13.35 - 13.45 Afslutning på temadagen
Afskedsforelæsning og reception
- 13.45 - 13.55 Velkomst
v/Instituteder Klaus Lønne Ingvartsen, DJF
- 13.55 - 14.30 Afskedsforelæsning ved Torben Hvelplund
v/Torben Hvelplund, DJF
- 14.45 - Reception for Torben Hvelplund i gæstekantinen, Forskningscenter Foulum

Indholdsfortegnelse

Malkekoens produktion og sundhed ved reduceret fosfortildeling.....	4
<i>Jakob Sehested, Peter Lund & Liselotte Puggaard</i>	
Recirkulering af fosfor hos malkekøer.....	10
<i>Liselotte Puggaard, Niels Bastian Kristensen & Jakob Sehested</i>	
Malkekoens produktion ved reduceret kvælstoftildeling.....	17
<i>Martin Riis Weisbjerg, Niels Bastian Kristensen, Torben Hvelplund Peter Lund & Peter Løvendahl</i>	
Effekt af urea infusion på udskillelsen og recirkulering af kvælstof hos malkekøer.....	30
<i>Betina Amdisen Røjen & Niels Bastian Kristensen</i>	
Malkekoens potentiale for recirkulering af kvælstof.....	39
<i>Niels Bastian Kristensen, Peter K. Theil & Robert Fenton</i>	
Potential for reduction of methane emissions from dairy cows.....	46
<i>Maike Johannes, Anne Louise Frydendahl Hellwing, Peter Lund, Martin Riis Weisbjerg & Torben Hvelplund</i>	
Managing rations on the limit - monitoring dairy cows fed rations optimized to minimize..... emissions of phosphorus, nitrogen, and methane	57
<i>Jon Moorby</i>	
Plads til noter.....	77

Malkekoens produktion og sundhed ved reduceret fosfortildeling

*Jakob Sehested, Peter Lund & Liselotte Puggaard
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet*

Sammendrag

Malkekøer har behov for P til at opretholde såvel foderomsætning i formaverne som til at opretholde stort set alle basale livsfunktioner, produktion og sundhed. Der er imidlertid god dokumentation for at fosfortildelingen til malkekøer kan reduceres i forhold til den nuværende praksis på 4,43 g/FE (svarende til ca. 0,42% af fodertørstof) uden negativ effekt på mælkeproduktionen, reproduktionen eller køernes sundhed og knoglestyrke. Der er ligeledes god dokumentation for den eksisterende danske fodringsnorm for P til malkekøer på 0,35% P i fodertørstof, hvilket er på niveau med anbefalingen i fx USA. Reduktion af P-tildelingen til dette niveau vil medføre at den gennemsnitlige udskillelse af P pr årsko falder med 5,2 kg.

Køer har behov for fosfor

Fosfor (P) er et essentielt næringsstof for alle levende organismer. Som det er tilfældet med de fleste andre næringsstoffer vi tildeler koen, så tager formavernes mikroorganismer først; og den mikrobielle proteinsyntese og omsætning af foderet er afhængig af P. I koen har P en lang række funktioner, men optræder altid i form af fosfat (PO_4) uanset om det indgår i organiske molekyler eller findes på uorganisk form (fosfat-ioner og salte heraf). Fosfat indgår fx i DNA, ATP og cellemembraner, ligesom det indgår i aktiveringen af proteiner og anden form for regulering og som et centralt element i kroppens pH-regulering. Men langt den overvejende del af kroppens P-indhold findes i knoglerne, hvor forskellige calcium-fosfat forbindelser udgør den bærende struktur. Køer har således et basalt og essentielt behov for P til at opretholde såvel foderoptagelse og – omsætning i mavetarmkanalen, som til at opretholde stort set alle basale livsfunktioner. Drøvtyggere har dog en veludviklet evne til recirkulere P fra blodbanen til formaverne gennem spyttsekretionen, og formavernes mikrober er dermed sikret en basal P forsyning, som i et vist omfang kan sikre omsætningen af foderet i formaverne. Desuden kan knoglernes indhold af P i begrænset omfang fungere som en buffer eller et lager, hvorfra der kan frigives P til blodbanen i mangelsituationer og efterfølgende genoplages P når P forsyningen igen er tilstrækkelig. I forbindelse med recirkuleringen af P, fordøjelsen, og den intermediære metabolisme sker der dog dagligt et uundgåeligt tab af P fra organismen med gødning og urin, og det betyder, at dyrene skal tilføres P med foderet. Men produktionen af mælk og foster kræver også i sig selv P, idet der udskilles en betydelig mængde P i mælken og i fosteret.

På den baggrund har der i mange år været fokus på at sikre malkekøer en rigelig forsyning med P. Begrænset viden om dyrenes eksakte behov for P til optimal produktion og sundhed samt om indhold og tilgængelighed af P i fodermidlerne har ført til, at der har været betydelige sikkerhedsmarginer i fosfortildelingen. Fosfor har været et billigt mineraltilskud i foderet, og derfor har der indtil for 10-15 år siden ikke været brugt ret mange ressourcer på at afdække dyrenes eksakte behov eller at tilpasse tildelingen dertil.

Det er imidlertid sådan med fosfor, at overskud i forhold til behovet udskilles med gødning og urin sammen med den utilgængelige del af foderets P-indhold. Decideret overskud kan ikke oplagres i

organismen, der aflejres kun hvad der er behov for i krop, foster og mælk. Derfor har den rigelige P-tilførsel i foderet ført til et betydeligt P-indhold i gyllen, som igen har ført til en P-overforsyning på landbrugsjorden og deraf følgende risiko for udvaskning af P til åer, søer og kystnære områder, hvor den øgede koncentration af P skaber problemer for vandmiljøet. Derfor har der nu i en årrække været fokus på at reducere udskillelsen af P fra køerne gennem en reduceret tildeling, som er tilpasset køernes behov.

Ifølge danske normtal for gødning i henholdsvis 2000 og 2009 (Poulsen et al., 2001; Poulsen, 2009) er indholdet af P i en gennemsnitlig foderration faldet fra 4,6 g P/FE i 2000 til 4,43 g P/FE (0,42% P i tørstof) i 2009. På grund af den øgede ydelse og dermed foderoptagelse i samme periode er den totale tildeling af P pr årsko dog steget fra 27,9 kg P i 2000 til 30,2 kg P i 2009, mens udskillelsen med gødning og urin kun er steget fra 20,2 kg P i 2000 til 20,8 kg P i 2009. Dermed er malkekøernes udnyttelse af P i perioden 2000 til 2009 steget fra knap 27,6% til 31,1% af den tildelte P til aflejring i krop, mælk og foster, mens resten udskilles med gødning og urin. Men faktisk ligger de anbefalede niveauer for tildeling af P i både Danmark og sammenlignelige lande betydeligt under det niveau, som ifølge normtal for gødning tildeles danske malkekøer. Fodringsnormen i Danmark for P til malkekøer er 3,8 g P/FE svarende til 0,35% i fodertørstof (Aaes og Sehested, 2003), hvilket er på niveau med anbefalingen i fx USA (NRC, 2001).

Hvis fodringsanbefalingen på 0,35% P /FE og de registrerede niveauer for tildeling i praksis på 0,42% P står til troende, er der altså et pænt potentiale for at reducere tildelingen af P til køerne i praksis uden at det har betydning for produktion og sundhed. Men hvad ved vi egentlig om, hvad der sker med køernes produktion og sundhed, når fosfortildelingen reduceres?

Effekt af reduceret fosfortildeling på køernes produktion og sundhed

En række forsøg viser, at negativt produktionsrespons på reduceret P-tildeling hos højtydende malkekøer typisk optræder, når der er omkring 0,3% P til 0,32% P eller derunder i fodertørstof. Ved samme P-niveau er der begyndende effekter på knoglernes P-indhold, mens der ved 0,3% P ikke er dokumenteret effekter på reproduktion eller sundhed. I forhold til praksis er dette niveau dog behæftet med nogen usikkerhed. I forsøg er udgangspunktet fx ofte en ration med et meget lavt naturligt P-indhold, som suppleres med en lettilgængelig mineralsk P-kilde. I praksis vil der ved et så lavt niveau i rationen som 0,3% P typisk ikke være suppleret med mineralsk P, og tilgængeligheden af det naturlige P-indhold i rationen vil være varierende. En anden usikkerhed i praksis er foderets reelle P-indhold.

I et mindre hollandsk produktionsforsøg med 24 Holstein malkekøer over 2 laktationer (21 mdr.) blev der givet henholdsvis 100%, 80% og 67% af hollandsk norm, svarende til henholdsvis 0,34%, 0,28% og 0,24% P (tørstofbasis) først i laktationen (Valk and Sebek, 1999). De to højeste niveauer blev opnået ved at supplere rationen med en lettilgængelig P-kilde (mononatriumfosfat). Køernes ydelsespotentiale var 9000 kg mælk pr. laktation, de var i anden eller senere laktation og forsøget startede i 17. laktationsuge. I den første laktationsperiode var der ingen signifikante forskelle mellem holdene med hensyn til foderoptagelse, mælkeydelse og sammensætning eller kropsvægt. Men i løbet af goldperioden og den anden laktationsperiode var foderoptagelse, mælkeproduktion og tilvækst betydeligt reduceret ved den laveste P-tildeling, og behandlingen måtte opgives efter 12 mdr. forsøg på grund af alvorlige mangelsymptomer og generelle problemer med køerne på denne behandling. Dog var der ingen effekt af P-niveau på reproduktionsparametrene. Forsøget var for lille til at kunne

dokumentere eventuelle effekter på sundhed. Konklusionen var, at 0,3% P (tørstofbasis) er tilstrækkeligt til køer der producerer 9000 kg mælk.

I et andet mindre produktionsforsøg fra USA med 26 Holstein malkekøer i en 308-dages laktationsperiode blev der givet 0,49%, 0,40% og 0,31% P (Wu et al., 2000). De to højeste niveauer blev igen opnået ved at supplere rationen med en meget lettilgængelig P-kilde (mononatriumfosfat). Køernes ydelsespotentiale var 11.000 kg mælk pr. laktation, de var i anden eller senere laktation og indgik i forsøget ved kælvning. Køerne på det laveste niveau havde en reduceret mælkeydelse efter 25. laktationsuge, og havde generelt en lavere P-balance (aflejring i knoglerne). Køerne på 0,4% P kunne mobilisere P fra knoglerne i begyndelsen af laktationen og aflejre det senere i laktationen uden at dette påvirkede produktionen i forhold til køerne på 0,49% P. Konklusionen var, at 0,4% P er tilstrækkeligt til at opretholde mælkeproduktionen hos højtydende køer, samt at køer i tidlig laktation ikke har behov for særskilt højt P-niveau, idet de kan mobilisere P fra knoglerne og aflejre det igen senere i laktationen. Det blev endvidere konkluderet, at 0,31% P er tilstrækkeligt til at opretholde normal reproduktion. Tværtimod var der en tendens ($P=0,10$) til et øget antal insemineringer pr. drægtighed med stigende P-niveau i foderet. Forsøget var for lille til at kunne dokumentere eventuelle effekter på sundhed.

Wu og Satter (2000) gennemførte også et lidt større produktionsforsøg, hvor der indgik i alt 65 Holstein køer og 95 laktationer over en toårig periode. Tredive Holstein køer var med begge år. Forsøgsrationens høje og lave P-niveauer var 0,48% og 0,38% P i de første to tredjedele af laktationen og 0,44% og 0,31% i den sidste tredjedel af laktationen. Det høje niveau blev opnået ved at supplere med mononatriumfosfat og dicalciumfosfat. Der var ingen effekter af rationens P-niveau på produktions- eller reproduktionsparametre i dette forsøg. Men i artiklen sammenstiller Wu og Satter (2000) resultaterne fra otte publicerede forsøg med varierende P-niveau til malkekøer, i alt 785 køer indgik i de refererede forsøg. Konklusionen på litteraturstudiet var, at de lave P-niveauer (0,32%-0,40%) ikke påvirkede reproduktionsparametrene i forhold til de høje P-niveauer (0,39%-0,61%).

Wu *et al.* (2001) gennemførte forsøg med 33 Holstein køer over tre år. Køernes ydelsesniveau var omkring 12.000 kg mælk, og der blev givet mellem 0,31%, 0,39% og 0,47% P i rationen. De to høje niveauer blev opnået ved at supplere med en meget lettilgængelig P-kilde (mononatriumfosfat). Der var ingen effekt af P-niveau på mælkeproduktion eller knoglestyrke, men knoglernes indhold af P var lidt reduceret ved 0,31% P. Forsøget var for lille til at kunne dokumentere eventuelle effekter på sundhed og reproduktion.

Senere gennemførte samme gruppe (Wu et al., 2003; Wu, 2005) endnu to produktions- og balanceforsøg. Det første produktionsforsøg løb over 14 uger med 44 Holstein køer og henholdsvis 0,33% og 0,42% P i rationen. Heller ikke i dette forsøg var der effekt af P-niveau på mælkeproduktionen, der lå på gennemsnitlig 35 kg /dag. Det næste forsøg løb over 10 uger med 32 Holstein køer med et noget højere produktionsniveau (43 kg mælk/dag), og 0,32% og 0,44% P i rationen. Her var der en negativ effekt af det lave P-niveau på foderoptagelse og mælkeproduktion. På 0,32% P var foderoptagelsen signifikant reduceret (-1,5 kg tørstof/dag), ligesom mælkefedt- og laktoseindhold og -ydelse var signifikant reduceret. Ligeledes var der tendens ($P=0,10$) til negativ effekt på mælkeydelsen (-1,9 kg FCM/dag) og proteinydelsen (-167 g/dag). I dette forsøg var 0,32% P

således for lidt til at opretholde mælkeproduktionen på dette høje niveau, hvilket stemmer med at NRC til køer på dette produktionsniveau og laktationsstadiet anbefaler 0,37% P i rationen.

I forsøgene af Wu et al. (2003) og Wu (2005) indgik tillige betydningen af rationens sammensætning med hensyn til grovfoder og fiber for udskillelsen af P med gødningen. I det første forsøg indgik to niveauer af grovfoder i rationen (48% vs. 58% af tørstof), og der var en lille, men ikke signifikant, øget udskillelse af P i gødningen (+9,3 g/dag svarende til 17%) på det høje grovfoderniveau, hvor mælkeproduktionen også var lidt reduceret. I det andet forsøg blev 10% sojaskaller udbyttet med 6% lucernehø. Fiberkilden havde ikke effekt på produktionen, men køerne udskilte signifikant mere P i gødningen (+13,5 g/dag svarende til 21%) på rationen med lucernehø. Forskellen i P-udskillelse på de to grovfoderkilder er i overensstemmelse med forsøg med får, som viste at grove fiberkilder giver et højere endogent tab af P med gødningen (Suttle et al., 1991). Effekten af grove fiberkilder på udskillelsen af endogent P er i overensstemmelse med konceptet, at grove fiberkilder giver anledning til mere tygning og højere spytssekretion og dermed højere endogen udskillelse og tab af P (Scott og Buchan, 1987).

Immunfunktionen blev undersøgt hos 9 Holstein køer der blev fodret med 0,34%, 0,43% eller 0,52% P i rationen i et latin-square design. Der var ingen effekt af rationens P-indhold på hverken mælkeproduktion eller det humorale og det cellulære immunrespons (Mullarky et al., 2009).

Sammenfatning

Der er således god dokumentation for, at fosfortildelingen til malkekøer kan reduceres i forhold til den nuværende praksis på 0,42% P i fodertørstof (4,43 g/FE) uden negativ effekt på mælkeproduktionen, reproduktionen eller køernes sundhed og knoglestyrke. Dog viser forsøgene, at negativ effekt på foderoptagelse og mælkeproduktion kan forekomme hos højtydende malkekøer, når der er omkring 0,3% til 0,32% P eller derunder i fodertørstof. Ved samme P-niveau kan der være negativ effekt på knoglernes P-indhold, mens der ved 0,3% P ikke er dokumenteret effekter på reproduktion sygdomsforekomst eller immunforsvar i forhold til højere P-niveauer. Der er dog også dokumentation for, at rationens sammensætning med hensyn til grovfoder og fiberkilder og tilgængeligheden af P i rationen har betydning for tabet af P med gødningen; ligesom produktionsniveauet påvirker køernes udskillelse af P med mælken og dermed deres behov for P. Disse faktorer er medvirkende til de varierende resultater i produktionsforsøgene, og de betyder, at der i praksis skal tillægges en sikkerhedsmargin i forhold til rationens P-indhold. Der er således god dokumentation for den eksisterende danske fodringsnorm for P til malkekøer på 0,35% P i fodertørstof, hvilket er på niveau med anbefalingen i fx USA. Men hvad vil en reduceret tildeling af fosfor betyde for malkekøernes udskillelse af fosfor?

Effekt af reduceret fosfortildeling på køernes udskillelse af fosfor

Som tidligere nævnt vil et overskud af fosfor i foderet i forhold til køernes behov blive udskilt med gødning og urin sammen med den utilgængelige del af foderets P-indhold. Decideret overskud kan ikke oplagres i organismen, der aflejres kun hvad der er behov for i krop, foster og mælk. Det er vist gentagne gange, at der er en god lineær sammenhæng mellem foderets og gødningens og urinens P-indhold, i hvert tilfælde i så lang tid der er tale om overforsyning (Ekelund et al., 2003; Ekelund et al.,

2005; Knowlton og Herbein, 2002; Nennich et al., 2005; Powell et al., 2002; Wu et al., 2000; Wu, 2005).

Tabellen viser en række scenarier for konsekvenserne af P-tildelingen på køernes udskillelse af P samt for en begrænsning på udledningen af P til 30 kg P /ha. Tabellen viser dels nu-situationen ("2010 praksis P") og effekten af at reducere fosfortildelingen til den aktuelle norm ("2010 norm P"). Desuden er der opstillet scenarier for år 2020 med en øget ydelseskapalet og foderudnyttelse og med P-tildeling reduceret til den nuværende norm ("2020 med 2010 P-norm") samt med øget ydelse, men uændret fodereffektivitet og P-tildeling i forhold til den nuværende praksis ("2020 med 2010 praksis P").

	2010 Praksis P	2010 Norm P	2020 med 2010 P-norm	2020 med 2010 praksis P
Fodring og ydelse pr årsko				
P i fodertørstof	0,42%	0,35%	0,35%	0,42%
Fodereffektivitet	83%	83%	86%	83%
Ydelse	9.485 kg	9.485 kg	11.000 kg	11.000 kg
P-udskillelse				
kg P / årsko	21,5 kg	16,3 kg	16,6 kg	23,3 kg
g P / kg EKM	2,26 g	1,72 g	1,51 g	2,12 g
Begrænsning på 30 kg P / ha				
køer / 100 ha	140	184	181	129
ha / 100 køer	72	54	55	78
ha / 10 ton EKM	0,76	0,57	0,50	0,71

Tildelingen og udskillelsen af fosfor kan reduceres

Tildelingen af fosfor til malkekøer kan reduceres til den gældende fodringsnorm på 0,35% af fodertørstof uden negative effekter for produktionen eller koens sundhed. Dette niveau af P i foderet vil medføre en gennemsnitlig udskillelse af P pr. årsko på 16,3 kg, svarende til en P-udnyttelse på 35%. I forhold til 2009 normtal for gødningsudskillelse kan der således opnås en reduceret udskillelse på ca. 5 kg pr. årsko (ca. 2,5 mill. kg P i alt). En udnyttelse af foderets P på 35% er ikke høj, men det bedst opnåelige med den nuværende viden og praksis. Køer fodres ofte i store grupper, og en P-tildeling tilpasset det enkelte dyrs behov rummer et potentiale for en højere P-udnyttelse og en lavere P-udskillelse, som dog er vanskelig realiserbar. Ny viden om de faktorer der forårsager det store tab af P med gødningen rummer ligeledes et potentiale for øget P-udnyttelse og reduceret udskillelse af P. Disse faktorer er især den utilgængelige del af foderets P-indhold og det endogene tab af P med gødningen, som skabes af primært køernes recirkulering af P med spyttet og fordøjelsen. Tabellen viser, at der med en tænkt begrænsning på udledningen til 30 kg P pr. ha og uændret fodringspraksis for P bliver behov for et større areal pr. ko om 10 år, mens en ændret fodringspraksis med lavere P-tildeling kan give mulighed for en betydeligt større produktion pr. ha.

Referencer

- Aaes, O., and J. Sehested. 2003. Reduktion af de danske normer for fosfor til kvæg. KvægInfo nr. 1134, Dansk Kvæg.
- Ekelund, A., R. Spörndly, H. Valk, and M. Murphy. 2003. Influence of feeding various phosphorus sources on apparent digestibility of phosphorus in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 109(1-4):95-104.
- Ekelund, A., R. Spörndly, H. Valk, and M. Murphy. 2005. Effects of varying monosodium phosphate intake on phosphorus excretion in dairy cows. *Livestock Production Science* 96(2-3):301-306.
- Knowlton, K. F., and J. H. Herbein. 2002. Phosphorus partitioning during early lactation in dairy cows fed diets varying in phosphorus content. *Journal of Dairy Science* 85(5):1227-1236.
- Mullarky, I. K., W. A. Wark, M. Dickenson, S. Martin, C. S. Petersson-Wolfe, and K. F. Knowlton. 2009. Short communication: Analysis of immune function in lactating dairy cows fed diets varying in phosphorus content. *Journal of Dairy Science* 92(1):365-368.
- Nennich, T. D., J. H. Harrison, L. M. VanWieringen, D. Meyer, A. J. Heinrichs, W. P. Weiss, N. R. St Pierre, R. L. Kincaid, D. L. Davidson, and E. Block. 2005. Prediction of Manure and Nutrient Excretion from Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 88(10):3721-3733.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised ed. National Academy Press.
- Poulsen, H.D., 2009. Normtal for husdyrgødning 2009. <http://www.agrsci.dk/var/agrsci/storage/original/application/6ad0435ef70c7cb3b7c30f15b406c0e3>. Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet
- Poulsen, H. D., C. F. Børsting, H. B. Rom, and S. G. Sommer. 2001. Kvælstof, fosfor og kalium i husdyrgødning - normtal 2000. Danmarks JordbrugsForskning.
- Powell, J. M., D. B. Jackson-Smith, and L. D. Satter. 2002. Phosphorus feeding and manure nutrient recycling on Wisconsin dairy farms. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 62(3):277-286.
- Scott, D., and W. Buchan. 1987. The effects of feeding either hay or grass diets on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and on the partition of phosphorus excretion between urine and feces in the sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* 72(3):331-338.
- Suttle, N. F., D. G. Armstrong, D. G. Braithwaite, A. C. Field, D. Scott, J. K. Thompson, and J. A. Woolliams. 1991. AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients, Report 6. A reappraisal of the calcium and phosphorus requirements of sheep and cattle. *Nutrition Abstracts and Reviews* 61(9):573-612.
- Valk, H., and L. B. J. Sebek. 1999. Influence of long-term feeding of limited amounts of phosphorus on dry matter intake, milk production, and body weight of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:2157-2163.
- Wu, Z. 2005. Utilization of Phosphorus in Lactating Cows Fed Varying Amounts of Phosphorus and Sources of Fiber. *Journal of Dairy Science* 88(8):2850-2859.
- Wu, Z., L. D. Satter, and R. Sojo. 2000. Milk production, reproductive performance, and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus. *Journal of Dairy Science* 83:1028-1041.
- Wu, Z., S. K. Tallam, V. A. Ishler, and D. D. Archibald. 2003. Utilization of phosphorus in lactating cows fed varying amounts of phosphorus and forage. *Journal of Dairy Science* 86(10):3300-3308.

Recirkulering af fosfor hos malkekøer

*Liselotte Puggaard, Niels Bastian Kristensen & Jakob Sehested
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet*

Sammendrag

Effekten af reduceret fosfortildeling på absorption og recirkulering af fosfor blev undersøgt hos lakterende malkekøer. Forsøget blev udført som et overkrydsningsforsøg med 14 dages perioder på fem vomfistulerede og kateteriserede Dansk Holstein køer. Behandlingerne bestod af 2 niveauer af fosfor (P) i fuldfoder; Lav P (LP, 2,4 g/kg TS) eller Høj P (HP, 3,4 g/kg TS), hvor HP svarer til danske anbefalinger. De to fuldfoderrationer var baseret på de same ingredienser, og kun endelig P koncentration var forskellig. Tørstofindtag og mælkeydelse var ens, hvorimod NDF fordøjeligheden faldt ved LP. Fosforindtag og udskillelse med gødning var lavere ved LP, og den tilsyneladende fordøjelighed (foder-fæces forskel) faldt derfor også. Endelig faldt fosforbalancen til 0 på LP. Plasma- og vomkoncentrationen var lavere ved LP, men der var ingen forskel på vom pH, ammonium- eller VFA koncentration. Der var ingen behandlingseffekt på netto portåre flux af P (absorption over tarmene). Netto recirkuleringen af fosfor med spyttet, beregnet som forskellen imellem netto portåre fluxen af P og tilsyneladende fordøjeligt P, var ikke forskellig imellem de to behandlingsgrupper (Tabel 4). Køerne var således i stand til at opretholde den samme recirkulering af fosfor på trods af et lavere P indtag. Konsekvensen var dog, at P balancen faldt, og indikerer at recirkulering af P til vommen blev opretholdt på bekostning af køernes mulighed for deponering på knoglerne. Alligevel var køerne ikke i stand til at opretholde plasma- og vomkoncentration.

Introduktion

Fosfor er et essentielt næringsstof der er involveret i en lang række funktioner i organismen, og fosfor spiller en vigtig rolle for malkekoens sundhed og produktion. Forsøg har vist, at den mikrobielle fermentering samt proteinsyntesen bliver hæmmet i tilfælde af utilstrækkelig fosforforsyning til vommen. I en sådan situation er der risiko for, at fordøjeligheden af organisk stof samt foderoptagelsen falder (Kincaid and Rodehutsord, 2005; Muschen et al., 1986). Fosforniveauet i blodets plasma reguleres via absorption fra mave- tarmkanalen, endogen sekretion via spyt, mobilisering og deponering i knogler samt reabsorption i nyrerne. Fosfor i foderet samt spytsekretionen af uorganisk fosfor udgør de største kilder til fosforforsyning af vommen (Kincaid and Rodehutsord, 2005). En meget stor del af den mængde fosfor, der bliver udskilt via spyt, bliver reabsorberet i mave-tarmkanalen, hvorved et recirkuleringssystem dannes. Recirkulering af fosfor er derfor et vigtigt element for forsyning af vommens mikrober, og det antages at spytsekretionen bidrager med mere end 50 % af den samlede mængde fosfor der tilføres vommen. Ikke desto mindre er der kun få kvantitative data af spytsekretion af fosfor.

Behovet for vedligehold er et obligatorisk endogent tab (IL) af P i gødning og urin. Recirkulering af fosfor kan generere et tab via gødning som konsekvens af ukomplet reabsorption, og tab af fosfor via gødning udgør kvantitativt den største udskillelsesrute hos kvæg (Scott et al., 1985). Fosfor der recirkuleres/sekretes med spyttet udgør derfor en hovedkomponent af IL. En konsekvens heraf er, at udnyttelsen af fosfor er meget lav hos malkekøer. Således udnyttes kun 31 % af den tilførte fosfor og 20,8 kg/årsko udskilles i urin og fæces (Poulsen, 2009). I de seneste årtier er der kommet øget fokus på

miljømæssige konsekvenser af indholdet af næringsstoffer i husdyrgødningen. Herunder er der øget opmærksomhed på negative effekter af fosforoverskud på det omkringliggende vandmiljø (Hooda et al., 2000), og der er derfor basis for at optimere udnyttelsen af fosfor og herved minimere udskillelsen uden at påvirke malkekøernes sundhed og produktion. Ifølge Vandmiljøplan III er målsætningen en halvering af landbrugets fosforoverskud i forhold til 32.700 tons P i 2001/2002 inden 2015, hvilket bl.a. forventes opnået via en generel forbedring af husdyrenes fosforudnyttelse.

Tabet med gødningen stiger i takt med stigende fosfortildeling (Bravo et al., 2003), og det forventes derfor, at tabet med gødning sænkes og at fosforudnyttelsen stiger ved reduceret fosfortildeling via foderet. Endvidere er det forventet, at recirkulering af fosfor reduceres som respons på reduceret fosfortildeling på grund af en reduceret absorption og efterfølgende lavere plasma niveau af fosfor. Formålet med nærværende forsøg var at kvantificere effekten af reduceret fosfortildeling på absorption og netto recirkulering af fosfor hos lakterende malkekøer.

Materialer og Metoder

Forsøget blev gennemført med fem vomfistulerede Dansk Holstein, gennemsnitlig 145 dage fra kælvning. Forsøget blev udført som et overkrydsningsforsøg med 14 dages perioder. Køerne fik indopereret permanente katetre før og efter leveren. Behandlingerne bestod af 2 niveauer af fosfor (P) i fuldfoder; Lav P (LP, 2,4 g/kg TS) eller Høj P (HP, 3,4 g/kg TS), hvor HP svarer til danske anbefalinger (Sehested, 2004). De to fuldfoderrationer var baseret på de samme ingredienser, og kun endelig P koncentration var forskellig (Tabel 1). De forskellige P koncentrationer blev opnået ved at tilsætte 0,50 % calciumkarbonat til LP behandlingen og 0,50 % mono-calciumfosfat til HP behandlingen.

Tabel 1. Ingredienser og næringsstofsammensætning af de eksperimentelle rationer.

	Behandling ¹	
	LP	HP
Ingredienser, % af TS		
Majsensilage	50,00	50,00
Græsensilage	20,00	20,00
Melasse	10,50	10,50
Roepiller	6,39	6,39
Soyaskrå	10,00	10,00
Mineral premix ²	1,00	1,00
Urea	0,25	0,25
Fedt	1,00	1,00
Kalciumkarbonat	0,50	
Monocalciumfosfat		0,50
HMBi ³	0,26	0,26
Krom(III)oxid	0,10	0,10
Næringsstoffer		
TS, %	44,20	43,20
	(g/kg af TS)	
Organisk stof	892	899

aNDF	302	295
Råprotein	140	148
Råfedt	34,70	34,70
Fosfor	2,42	3,43

¹Eksperimentielle rationer indeholder de samme ingredienser på nær LP der indeholder 0,5 % af TS calciumkarbonat og HP indeholder 0,5 % af TS mono-calciumfosfat. Rationerne havde samme energiindhold; 0,95 SFU/kg TS og fordøjeligt energi; 13,8 MJ/kg TS (Møller et al., 2005)

²VM 1 - vitamin mix (Rød Suplex; Vitfoss, Gråsten, Denmark; per kg: 900 kIU vitamin A, 190 kIU vitamin D, 6000 mg α -tocopherol, 50 mg Se, 4000 mg Mn, 1500 mg Cu, 25 mg Co, 4500 mg Zn, 145 g Ca, 4 g P, 85 g Mg, 100 g Na og 40 g S.

³HMBi; isopropyl ester af en methionin hydroxyl analog.

Rationerne blev tildelt restriktivt (20 kg TS/d) og fordelt på 3 daglige udfodringer og kørerne blev opstaldet i bindestald. Blodflow blev målt ved kontinuerlig infusion af *p*-aminohippursyre (**pAH**; 175 mmol/L) (Kristensen et al., 2007). Blodprøver fra arterien og portåren blev taget simultant hver time i otte timer, med påbegyndelse en halv time før morgenfodring. Vomvæske fra den ventrale vomsæk samt spotprøver af urin blev ligeledes opsamlet hver time. Fæces og mælkeprøver blev taget 2 gange dagligt før og på opsamlingsdagen.

Beregninger

Den tilsyneladende fordøjelighed af P blev beregnet som forskellen mellem P indtag og P udskillelse i fæces. Balancen af fosfor blev beregnet som forskellen mellem P indtag og P udskillelse i fæces, urin og mælk og afspejler således graden af mobilisering/deponering af fosfor hos kørerne. Blodflow og netto absorption af P til portåreblodet blev beregnet i henhold til Kristensen et al. (2007). Netto absorption af P til portåreblodet er et estimat for absorption af P over hele mavetarmkanalen. Spytsekretionen af fosfor blev estimeret som netto recirkulering ved at beregne netto absorption af P til portåreblodet - den tilsyneladende fordøjede mængde P, og repræsenterer hvad der minimum bliver udskilt via spytktirlerne (og andre sekreter) og herved recirkuleret.

Resultater og Diskussion

Der var ingen behandlingseffekt på tørstofoptagelsen i de to behandlingsgrupper, hvorimod NDF fordøjeligheden var signifikant lavere i LP gruppen ($P = 0,02$). Mælke-, fedt- og proteinydelse var ikke forskellig mellem de to behandlingsgrupper (Tabel 2). Dette kunne indikere, at responset på en reduceret P tildeling ikke viser sig på tørstofoptagelse eller mælkeydelse i løbet af en 14 dages periode. Resultaterne viser således, at koen ikke tilpasser produktionen til et lavere P indtag på samme niveau, som observeret ved underforsyning med kvælstof.

Tabel 2. Tørstofindtag, NDF fordøjelighed og mælkeydelse.

Item	Behandling ¹		SEM ³	Effekt ²
	LP	HP		Foderbehandling
TS indtag, kg/d	19,8	19,6	0,37	0,67
NDF fordøjelighed	47,8	52,6	1,77	0,02
Ydelse	(kg/d)			
Mælk	30,6	30,8	2,69	0,71
EKM	29,7	29,2	1,84	0,80

Fedt	1,20	1,22	0,072	0,66
Protein	0,87	0,88	0,079	0,88

¹Eksperimentielle rationer indeholder de samme ingredienser på nær LP der indeholder 0,5 % af TS kalciumkarbonat og HP indeholder 0,5 % af TS mono-kalciumfosfat.

²P-værdi af effekt af foderbehandling.

³Standardafvigelse på gennemsnittet.

Som forventet var P indtaget (g/d) samt P udskillelsen med fæces lavere ved LP ($P < 0,02$; Tabel 3). Udskillelsen af P i mælk var ikke forskellig mellem de to behandlingsgrupper, hvorimod urinudskillelsen og mængden af tilsyneladende fordøjeligt P (foder-fæces forskellen) var lavere for LP ($P < 0,05$). Fordøjeligheden af P (ikke vist) var derimod ikke forskellig (~55 %). Fosforkoncentrationen i mælk var henholdsvis 0,81 g/kg og 0,86 g/kg for LP og HP. Som en konsekvens af et lavere P-indtag var P-balancen lavere og tæt på 0 for LP ($P = 0,02$).

Tabel 3. Fosforfordøjelighed, udskillelse og balance.

	Behandling ¹		SEM ³	Effekt ²
	LP	HP		Foderbehandling
	———— (g/d) ————			
P indtag	47,9	67,2	1,18	0,001
P i fæces	21,6	30,8	1,73	0,02
P i urin	0,22	0,26	0,015	0,05
P i mælk	25,1	25,8	2,10	0,10
Tilsyneladende fordøjeligt P ⁴	26,3	36,4	2,08	0,01
P balance ⁵	0,95	10,4	2,06	0,02

¹Eksperimentielle rationer indeholder de samme ingredienser på nær LP der indeholder 0,5 % af TS kalciumkarbonat og HP indeholder 0,5 % af TS mono-kalciumfosfat.

²P-værdi af effekt af foderbehandling.

³Standardafvigelse på gennemsnittet.

⁴Tilsyneladende absorption af P; foder-fæces forskellen.

⁵Balance; forskellen imellem P indtag via foder og P udskillelse via fæces, urin og mælk.

Fosforkoncentrationen i plasma samt vommen var signifikant lavere ved LP ($P = 0,0001$; Figur 1), hvorimod vom pH ikke var påvirket. Der var heller ikke forskel på vomkoncentrationen af ammonium eller VFA imellem de to behandlingsgrupper (Tabel 4). Der var dog effekt af opsamlingsstid for alle disse variable ($P < 0,05$), hvilket er eksemplificeret i figur 1a.

Tabel 4. Arteriel plasma P og vom-variable.

Variabel	Behandling ¹		SEM ³	Effekt ²		
	LP	HP		Foderbehandling	Tid	Behandling x Tid
	———— (mmol/l) ————					
Arterielt plasma P	1,15	1,85	0,099	0,001	0,01	0,78
Vomvæske P	3,26	5,33	0,68	0,0001	0,006	0,34
Vom pH	6,43	6,35	0,10	0,20	0,001	0,65
Ammonium	5,64	5,88	0,55	0,73	<0,0001	0,59
Total VFA	105	105	6,21	0,96	0,05	0,72
	———— (g/d) ————					

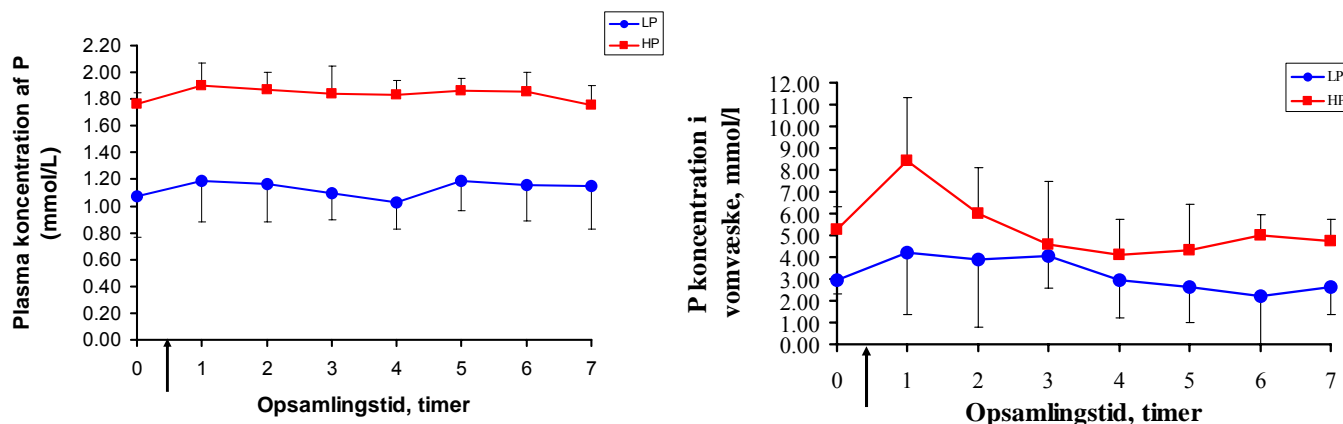
Netto portåre flux af P	57,1	65,5	4,75	0,20	0,21	0,33
Netto recirkulering af P ⁴	29,7	28,6	4,21	0,86	-	-

¹Ekperimentielle rationer indeholder de samme ingredienser på nær LP, der indeholder 0,5 % af TS kalciumkarbonat og HP indeholder 0,5 % af TS monokalسيومfosfat.

²P-værdi af effekt af Foderbehandling og opsamlingsstidspunkt (Tid) og interaktionen (Foderbehandling x Tid).

³Standardafvigelse.

⁴Netto recirkulering af P; beregnet som forskellen imellem net portal flux af P og tilsyneladende fordøjelighed af P.



Figur 1. Plasma og vomkoncentration af P hos køer fodret enten en ration med lavt indhold af P (2,42 g P/kg TS) eller med et højt indhold af P (3,43 g P/kg TS). Prøverne blev taget 0,5 time før morgenfodring (indikeret med ↑) og herefter 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 og 7,5 timer efter morgenfodring.

Der var ingen behandlingseffekt på netto portåre flux af P (absorption over tarmene). Netto recirkuleringen af P, beregnet som forskellen imellem netto portåre fluxen af P og tilsyneladende fordøjet P, var heller ikke forskellig i mellem de to behandlingsgrupper (Tabel 4), hvilket indikerer at køerne var i stand til at opretholde den samme recirkulering af fosfor på trods af et lavere P indtag. Opretholdelse af recirkuleringen havde dog den konsekvens at P balancen faldt og var tæt på 0 ved LP. Dette illustrerer, at køernes recirkulering af P til vommen blev opretholdt på bekostning af køernes mulighed for deponering. En egentlig mobilisering var ikke mulig at detektere, men ikke desto mindre indikerer resultaterne, at køerne var under pres. Alligevel kunne køerne ikke opretholde den samme vom- eller plasmakoncentration, og NDF fordøjeligheden faldt endvidere. Studier har vist at en underforsyning af P til vommen kan påvirke vomomsætningen negativt. Baseret på vomparametre såsom VFA koncentration var dette dog ikke muligt at påvise i nærværende forsøg.

Det var forventet, at fosforudskillelsen med gødning samt recirkuleringen blev reduceret, når fosfortildelingen faldt, men dette viste sig kun at gælde for fosforudskillelsen. Tabet med gødning blev derfor reduceret. Selvom vi observerede en reduktion i mængden af tilsyneladende fordøjeligt P (foderfæces forskel), var absorptionen af P over tarmene og recirkulering af P uændret. Numerisk set var absorptionen over tarmene dog lavere for LP sammenlignet med HP (57,1 vs. 65,5 g/d). Da der samtidig blev observeret en signifikant lavere netto afgivelse af P over splanikus for LP sammenlignet med HP (ikke vist), kan det diskuteres om den manglende effekt på netto portåre fluxen af P er korrekt i det nærværende forsøg.

Det var også forventet, at fosforudnyttelsen ville stige når fosfortildelingen faldt. Udnyttelsen steg ganske lidt ved LP (54,4 % vs. 53,8 %), og det kan diskuteres hvad der forhindrer køerne i at være bedre til at udnytte den tildelte fosfor lige i vores tilfælde. Skyldes det at køerne ikke aflejrer fosfor i knoglerne (den reducerede balance) eller skyldes det den uændrede recirkulering. Det er ikke klart hvad der ligger til grund for denne uændrede recirkulering, da regulering af sekretion og absorption af P ikke er fuld forstået. Absorption af fosfor foregår primært over tyndtarmen, og det formodes at absorptionen styres af en vitamin D-afhængig aktiv transportmekanisme i samme grad som hos enmavede (NRC, 2001). Et lavt plasma fosforniveau vil aktivere syntesen af aktivt vitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], hvilket vil resultere i en mere effektiv absorption (Horst, 1986). Relateres absorption (netto portåre fluxen) og recirkulering med fosforindtaget, viser det sig netop at både absorption og recirkulering er mere effektiv ved en reduceret fosfortildeling.

Vores resultater tyder på at malkekøen, i tilfælde af reduceret fosforindtag, vil prioritere fosforforsyningen til vommen, men at det som sagt vil være på bekostning af aflejring af fosfor på kropsreserverne. Idet malkekøernes P balance responderede kraftigt på den reducerede fosfortildeling i løbet af en periode på 14 dage, kan det diskuteres, hvor længe disse køer vil være i stand til at opretholde recirkuleringen uden det vil påvirke køernes produktion og sundhed.

Konklusion

Netto recirkuleringen af fosfor blev ikke påvirket af at reducere P indtaget hos lakterende malkekøer, hvilket betyder at køerne var i stand til at absorbere og recirkulere den tilgængelige fosfor mere effektivt. Opretholdelse af recirkulering var dog på bekostning af deponering af fosfor i knoglerne, hvilket er indikeret af en lavere balance af fosfor. Endvidere var køerne ikke i stand til at opretholde plasma- og vomkoncentration på trods af en uændret recirkulering.

Referencer

- Bravo, D., D. Sauvant, C. Bogaert, and F. Meschy. 2003. III. Quantitative aspects of phosphorus excretion in ruminants. *Repro. Nutr. Devel.* 43:285-300.
- Hooda, P. S., A. C. Edwards, H. A. Anderson, and A. Miller. 2000. A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Sci. Total Environm.* 250:143-167.
- Horst, R. L. 1986. Regulation of Calcium and Phosphorus Homeostasis in the Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* 69:604-616.
- Kincaid, R. L., and M. Rodehutsord. 2005. Phosphorus Metabolism in the Rumen. Pages 187-194 in *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations.* E. Pfeffer and A. N. Hristov, ed. CABI Publishing.
- Kristensen, N. B., A. Storm, B. M. L. Raun, B. A. Rojen, and D. L. Harmon. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1364-1377.
- Møller, J., R. Thøgersen, M. E. Hellehøj, M. Weisbjerg, K. Søgaard, and T. Hvelplund. 2005. Fodermiddeltabel - Sammensætning og foderværdi af fodermidler til kvæg. Pages 1-64. J. Møller, ed. Dansk Kvæg, Danmark JordbrugsForskning.

- Muschen, H., A. Petri, M. Schlieper, and E. Pfeffer. 1986. The Influence of Different P Supply on P Metabolism of Milk Goats. *J. Anim. Phys. and Animal Nutrition-Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernahrung und Futtermittelkunde* 56:158.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh Revised Edition ed. National Academy Press.
- Poulsen, H. D. 2009. Normtal for husdyrgødning - 2009, <http://www.agrsci.dk/var/agrsci/storage/original/application/6ad0435ef70c7cb3b7c30f15b406c0e3>.
- Scott, D., F. G. Whitelaw, W. Buchan, and L. A. Bruce. 1985. The Effect of Variation in Phosphorus Intake on Salivary Phosphorus Secretion, Net Intestinal Phosphorus Absorption and Fecal Endogenous Phosphorus Excretion in Sheep. *J. Agri. Sci.* 105:271-277.

Malkekoens produktion ved reduceret kvælstoftildeling

*Martin Riis Weisbjerg, Niels Bastian Kristensen, Torben Hvelplund, Peter Lund & Peter Løvendahl
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet*

Sammendrag

Husdyrproduktion kan medføre såvel fordampning af ammoniak som udvaskning af kvælstof, som kan belaste miljøet. Reduktion af kvælstofudskillelse i urin og fæces vil reducere denne belastning, og der er derfor stor fokus på mulighederne for at reducere proteinniveauet til malkekøerne.

Der er gennemført romerkvadrat-forsøg med i alt 64 køer (256 observationer) og 4 proteinniveauer, 121, 134, 150, og 167 g råprotein pr. kg rationstørstof, hvor de 3 laveste er under gældende normer.

Forsøgene viste, at reduktion af proteinniveauet i forhold til det højeste niveau reducerede foderoptagelsen og især mælkeproduktionen, og at den negative effekt øgedes jo lavere proteinniveauet blev.

Køerne responderede forskelligt på proteintildeling for EKM ydelse, således at køer med højest ydelse responderede mest. Men for foderoptagelse var der ikke forskelle i respons mellem køer på forskelligt foderoptagelses-niveau.

Proteinets betydning for malkekøer

For lidt og for meget fordærver alting

For lidt og for meget fordærver alting, siger en gammel dansk talemåde, og det gælder også når vi snakker om proteintildeling til malkekøer. Således vil overforsyning med protein betyde et energitab, og underforsyning med vomnedbrydeligt protein (PBV) vil medføre reduceret fordøjelighed i vommen, og underforsyning med absorberbare aminosyrer (AAT) vil reducere mælkeproteinproduktionen.

Proteinforsyningen til malkekøer, og især udskillelsen af kvælstof (N) i gødning og urin betragtes som væsentlige problemer mht. miljøet pga. risiko for ammoniaktab og udvaskning af N til grundvand og vådområder. Spørgsmålet er derfor, hvad er det produktionsmæssigt optimale niveau for proteintildeling til malkekøer, og hvad koster afvigelser fra dette niveau, i reduceret produktion, sundhed mm., hvis miljøhensyn skal tilgodeses gennem 'underforsyning' med protein.

Overforsyning med protein

Ved øget proteintildeling stiger udskillelsen og dermed syntesen af urea. Da denne proces er energikrævende, medfører øget ureaudskillelse et fald i udnyttelsen af den omsættelige energi. Danfær et al. (1980) beregnede således, at omsætning og udskillelse af overskudsprotein koster ca. 0,8 FE pr. kg fordøjeligt protein. Heraf kan knap halvdelen forklares som øget energiudskillelse i urinen, hvis overskuddet udskilles som urea, idet urea indeholder energi. Resten af energitabet skyldes varmetab ved syntese og udskillelse af urea.

Udover energitabet er overforsyning med protein blevet koblet med sundhedsproblemer, reproduktionsproblemer og tynd gødning. Det er dog vanskeligt at finde forsøgsmæssigt belæg for sundheds- og reproduktionsproblemerne. Ligeledes er det svært at finde belæg for at høj proteinforsyning skulle give tynd gødning, og i en nylig undersøgelse (Bligaard et al., 2010) konkluderes det, at der ikke kan findes sammenhæng mellem gødningens tørstofindhold og rationens proteinindhold.

Således er omkostningen ved overforsyning med protein, ud over en eventuel merpris for protein sammenlignet med andre næringsstoffer, en omkostning på 0,8 FE pr. kg fordøjeligt protein. Og da overforsyning yderligere kan medføre en belastning af miljøet, bør overforsyning altid undgås.

Underforsyning med vomnedbrydeligt protein (PBV)

Betydningen af forsyning med PBV har også været behandlet på temamødet i 1997 (Kristensen, 1997; Weisbjerg, 1997), hvor en betydelig del af de forsøg der blev lagt til grund for PBV normerne i AAT/PBV systemet blev gennemgået.

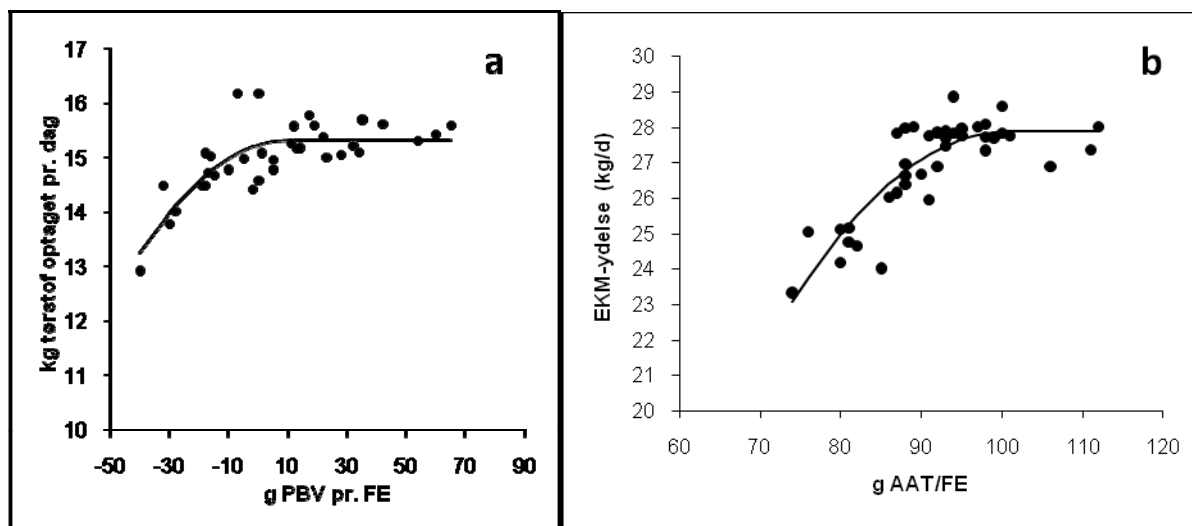
Underforsyning med vomnedbrydeligt protein har en betydelig effekt på omsætningen i vommen. Den 'rene' effekt af N ved tilskud af urea til en ration med meget lav PBV blev undersøgt i flere forsøg af Weisbjerg (1997). I Tabel 1 er vist effekten på foderoptagelse og totalfordøjeligheden. Ved øget PBV (øget tildeling af urea fra 0 til 260 g/d) ses en øgning i organisk stof fordøjelighed, der altovervejende kunne forklares ved et øgning i NDF fordøjeligheden. Øgningen i NDF fordøjelighed skyldes øget nedbrydningshastighed af NDF, hvorimod passagehastigheden af NDF var uændret (Weisbjerg et al., 1998). De 260 g urea øgede N udskillelsen med 47 til 109 g/dag, og urea andelen af urin N øgedes fra 17 til 60 %.

Tabel 1. Foderoptagelse og foder-fæces fordøjeligheden (FK) (Weisbjerg, 1997)

	PBV				SEM	P	P*
	-650	-400	-150	100			
% råprotein i ts	11,7	13,1	14,3	15,6			
Foder (kg ts/dag)	15,9	17,5	18,2	18,3			
FK organisk stof	66,5	67,8	69,6	70,8	0,8	0,03	0,001
FK NDF	48,8	51,7	54,5	57,4	2,0	0,1	0,007

* lineær effekt af PBV

Tabel 1 viser, at den reducerede fordøjelighed i vommen ved underforsyning med PBV har en betydelig effekt på foderoptagelsen. Tilsvarende effekter af underforsyning med PBV blev fundet af Kristensen (1997) i en række produktionsforsøg, som samlet er vist i Figur 1a (Madsen et al., 2003).



Figur 1. Foderoptagelsens afhængighed af rationens indhold af PBV samt mælkeydelsens afhængighed af rationens indhold af AAT, hvor effekten af enkeltforsøg er fjernet. Madsen et al. (2003) baseret på Kristensen (1997).

Tabel 1 og Figur 1a viser samstemmende en meget betydelig negativ effekt på foderoptagelsen af at reducere PBV under niveau -10, mens der ikke synes at være yderligere positiv respons ved øgning over PBV 0. Den negative effekt på foderoptagelsen under PBV 0 er kurvelineær, dvs. effekten øges jo lavere PBV niveauet bliver.

Underforsyning med absorberbare aminosyrer

Vommens forsyning med nedbrydeligt protein er væsentlig for den mikrobielle omsætning. Men proteinforsyningen til selve koen afhænger af mængden af absorberbare aminosyrer (AAT). Forsyningen med absorberbare aminosyrer er hovedsagelig via mikrobielt protein, som i de fleste tilfælde udgør mere en halvdelen af AAT forsyningen, og hvor omsætningen i vommen og forsyningen med PBV igen kommer i fokus. Den resterende del kommer fra unedbrudt men fordøjeligt foderprotein. Figur 1b viser responset i energikorrigeret mælk (EKM) ved øget AAT forsyning, og der ses en betydelig effekt op til 90-95 g AAT/FE, hvorefter der ingen yderligere positiv respons ses.

Associative effekter

Der er ofte rapporteret positiv produktionsrespons på øget tildeling af protein. Ud over reelle effekter af PBV og AAT kan det også skyldes, at øget proteintildeling oftest vil medføre en fortynding af rationens indhold af letomsættelige kulhydrater, især stivelse, således at den positive effekt af proteintildeling ikke nødvendigvis skyldes proteinet, men derimod den reduktion i evt. skadelig virkning af stivelse mm. som øget proteintildeling har bevirket. Og således kan øget proteintildeling reducere forekomsten af mælkefedtdepression ved fodring med kraftfoderrige rationer (Zimmerman et al., 1991).

Effekt af reduceret proteintildeling med nutidige foderrationer

I de ovennævnte tidligere forsøg var produktionen klart negativt påvirket af underforsyning med PBV.

Væsentlige spørgsmål i dette projekt var:

- Er der forskelle mellem køer i responset, der kunne være genetisk betinget
- Giver nutidige foderrationer samme respons på PBV

De tidligere forsøg viste en betydelig negativ effekt på foderoptagelsen ved underforsyning med PBV, og foderoptagelse blev derfor sammen med mælkeydelse mm. valgt som væsentligste måleparametre i forsøgene til belysning af hvorvidt der er forskelle mellem køer i responset på PBV tildeling. Rationerne blev sammensat så de afspejler foderrationer i praksis, og proteinkilder valgt med henblik på at kunne komme så langt ned i PBV som muligt uden negativ produktionsrespons.

Forsøgenes opbygning

Der blev gennemført 2 forsøg, F-617 i 2008 og F-663 i 2009, hvor F-663 var en gentagelse af F-617. Der indgik 32 køer i hvert forsøg, og forsøgsdesignet var 8 gentagne 4x4 romerkvadrater, hvor køer var blokket efter paritet og dage fra kælvning. Der var således i alt 256 observationer. Periode-længden for hver af de 4 perioder var 14 dage. Køerne var opstaldet i bindestald, med 2 gange daglig malkning. Ydelseskontrol blev gennemført på dag 7 samt dag 12, 13 og 14. På dag 13 blev der taget spot-prøver af urin og blod.

Fodring og behandlinger

Køerne blev fodret efter ædelyst med fuldfoder tildelt 2 gange dagligt og foderrester blev tilbagevejet dagligt. Behandlingerne var 4 proteinniveauer resulterende i 4 PBV niveauer. Niveauerne blev opnået ved ombytning af afskallet sojaskrå med melasse og sojaskaller (Tabel 2).

Tabel 2. Sammensætning af foderrationer (behandlinger)

	F-617				F-663			
Behand. (g råprot./kg ts)	121	134	150	167	121	134	150	167
Fodermiddel	g / kg tørstof							
Majsensilage	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ¹	300 ²	300 ²	300 ²	300 ²
Kløvergræsensilage	250 ¹	250 ¹	250 ¹	250 ¹	250 ²	250 ²	250 ²	250 ²
Byg, valset	298	298	298	298	298	298	298	298
Sojaskrå, afskallet	0	40	80	120	0	40	80	120
Melasse, rør	24	16	8	0	24	16	8	0
Sojaskaller	96	64	32	0	96	64	32	0
Mineral, vitamin mm.	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5
PFAD fedt	10	10	10	10	10	10	10	10
Næringsstofsammensætning								
Aske, g/kg ts	63	61	62	63	60	57	58	61
Råprotein, g/kg ts	117	133	149	168	124	135	151	166
NDF, g/kg ts	305	293	274	259	317	296	275	260
Tørstofindhold, g/kg foder	418	421	420	424	439	446	431	434
Beregnet sammensætning pr. kg ts								

Vom nedbr. råprotein ³ , g	84	94	105	115	83	94	104	115
NEL ³ , MJ	6,59	6,71	6,85	6,97	6,48	6,61	6,75	6,88

¹Majsensilage 8,9 % råprotein i ts, fordøjelighed organisk stof 77,4; Kløvergræsensilage 16,1 % råprotein i ts, fordøjelighed organisk stof 81,9 ²Majsensilage 8,1 % råprotein i ts, fordøjelighed organisk stof 77,4, Kløvergræsensilage 17,4 % råprotein i ts, fordøjelighed organisk stof 75,4 ³Beregnet i NorFor. I AAT/PBV systemet er de 4 proteinniveauer (gennemsnitlig) for AAT 87, 92, 97 og 102, og for PBV -36, -24, -12 og -1 g/kg tørstof.

Resultater

Køernes respons på de 4 niveauer af proteintildeling er efterfølgende som hovedregel givet som mindste kvadraters estimat på tværs af de 2 forsøg. De 4 behandlinger er navngivet ved de 4 niveauer for råprotein i totalrationens tørstof, dvs. 121, 134, 150 og 167 g råprotein/kg tørstof som gennemsnit for de 2 forsøg.

Foderoptagelse

Foderoptaget blev klart reduceret (Tabel 3) ved reduceret proteintildeling, dog ikke ved første reduktion fra 167 til 150 g/kg ts. Men yderligere reduktion til 134 og 121 g/kg tørstof medførte et fald på henholdsvis 0,4 og 1,0 kg ts/dag. Men i forhold til de tidligere danske forsøg nævnt i indledningen, er reduktionen i foderoptag kun ca. halvdelen af det forventede. Dette stemmer overens med hvad der blev fundet i nylige forsøg med tildeling af urea til rationer med proteinmangel (Røjen & Kristensen, 2010). Årsagen til at der findes mindre reduktion i foderoptag ved proteinmangel end forventet ud fra de 15-20 år gamle forsøg kendes ikke, men kunne være de ændringer, der er sket i grovfoder, hvor der foruden majsensilagens indtog er sket en øgning i grovfoderets fordøjelighed.

Mælkeydelse og sammensætning

Mælkeydelsen afspejlede foderoptagelsen, men det procentvise fald var større for mælkeydelse end for foderoptagelse. Hvor de tre reducerede proteinniveauer i forhold til højeste niveau for foderoptagelse var på 100, 98 og 93 %, var de for mælkeydelse på 98, 93 og 85 %. Også i forhold til reduktionen i produktions-FE (FE optag korrigeret for vedligehold) var faldet betydeligt større for mælkeydelse.

Proteinindholdet i mælken afspejlede udviklingen i foderoptagelse med samme relative fald ved reduceret proteintildeling. Fedtindholdet i mælken blev derimod øget og var i forhold til højeste proteintildeling på 100, 102 og 108 % for de 3 reducerede proteinniveauer.

Mælkeydelsen i energikorrigeret mælk (EKM) afspejlede i vid udstrækning udviklingen i kg mælk, dog var reduktionen i EKM ydelse ved sidste reduktion i protein mindre end reduktionen i mælkeydelse, da fedtprocenten blev øget betydeligt på laveste proteintildeling.

Hvorfor øger lav proteintildeling mælkens fedtprocent? Første gæt kunne være at den reducerede foderoptagelse gør kjerne ketotiske. Blodprøver viste et øget niveau af β -hydroxybutyrat (BOHB), men ikke et øget NEFA niveau (Tabel 3), og hvis det reducerede foderoptag havde øget mobilisering ville et øget indhold af NEFA i blodet have været forventet, hvilket ikke umiddelbart understøtter sult-ketose forklaringen. Derimod ses der en ganske betydelig reduktion i insulinniveauet ved de lave proteintildelinger, hvilket kunne antyde, at proteinmangel har en betydelig påvirkning på hele den intermediære omsætning.

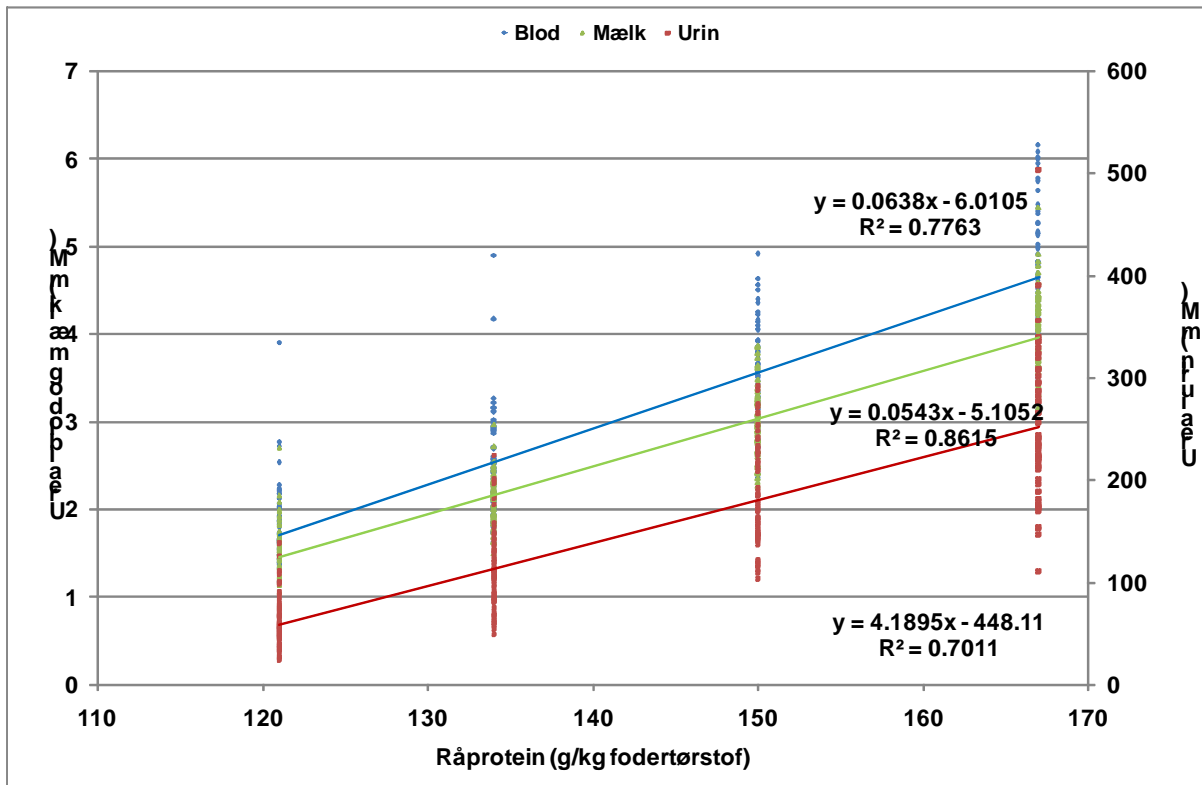
Tablet 3. Foderoptagelse, mælkeydelse og mælkens sammensætning, effektivitet i udnyttelsen af N i foderet, samt β -hydroxybutyrat (BOHB), ikke esterificerede fedtsyrer (NEFA) og insulin i blodet

	Behandling (g råprotein/kg ts)				P værdier			
	121	134	150	167	SEM	L ¹	K ²	Beh ³
Tørstof optag, kg/d	20,0	21,0	21,4	21,4	0,21	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Mælkeydelse, kg/d	26,2	28,7	30,2	30,8	0,48	< 0,01	< 0,01	< 0,01
EKM	27,1	29,1	30,6	31,1	0,46	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Protein, g/kg	33,8	34,7	35,4	35,3	0,26	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Fedt, g/kg	43,9	41,3	40,8	40,7	0,68	< 0,01	< 0,01	< 0,01
N i mælk % af N optag	35,7	34,4	32,5	29,7	0,4	< 0,01	< 0,01	< 0,01
BOHB (mM)	0,79	0,75	0,71	0,69	0,03	0,004	0,8	0,04
NEFA (mM)	0,075	0,064	0,065	0,078	0,006	0,7	0,04	0,2
Insulin (pM)	44,0	67,4	71,9	75,6	5,7	<0,0001	0,06	<0,0001

P værdier for ¹lineær, ² kvadratisk, ³behandlings effekt

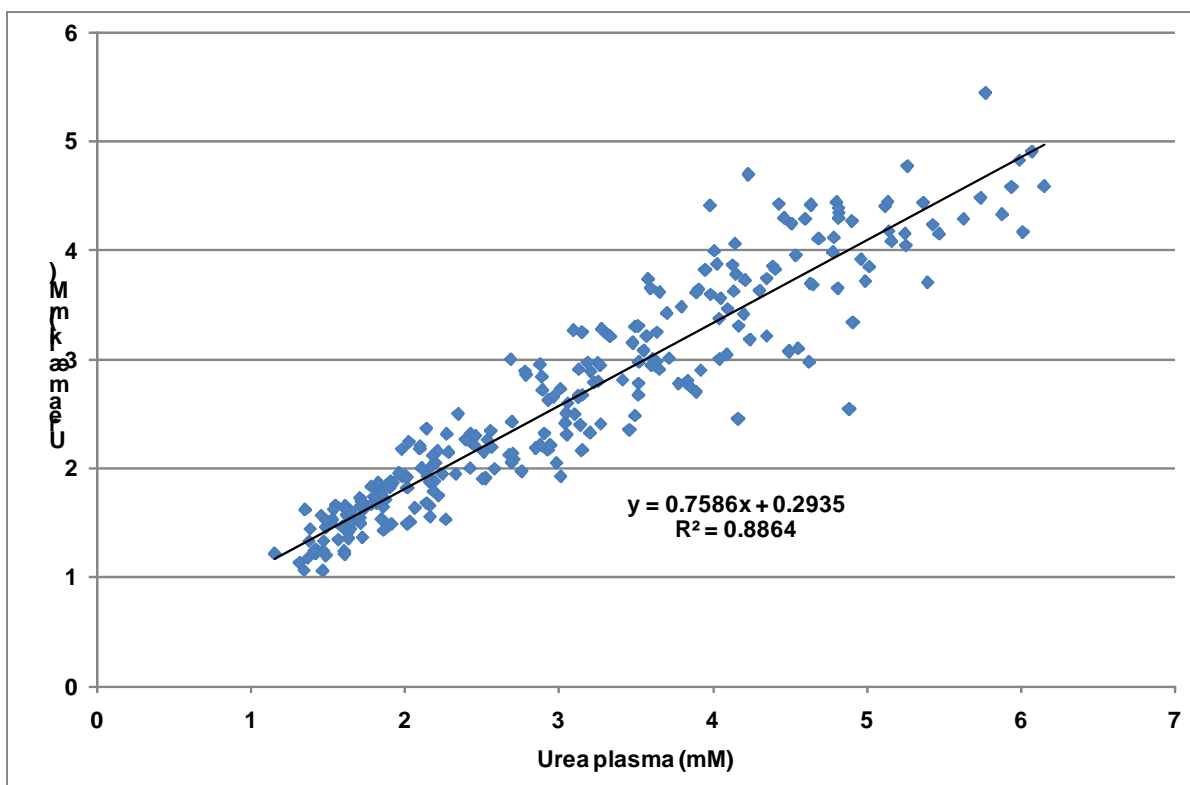
Urea i blod, mælk og urin

Det protein, der ikke ender i mælken, vil blive udskilt i gødningen og i urinen, og ved øgning af proteinniveau vil overskuddet langt overvejende blive udskilt som urea (urinstof) i urinen. Protein nedbrydes til ammoniak i vommen og i leveren, og da ammoniak i større mængder kan være toksisk omdannes det i leveren til urea. Urea i urinen er lettilgængelig, og derfor velegnet som plantenæring, når det udbringes på tider hvor planterne har et N behov, men er også kilden til ammoniakfordampning. Udvasningen kommer derimod overvejende fra organisk bundet kvælstof, der pga. langsom omsætning frigives i vinterhalvåret, hvor afgrøderne ikke kan opfange det. Urea indholdet i urinen er derfor afgørende, idet det er den faktor, der overvejende flyttes på ved ændret proteintildeling. I nedenstående figurer er sammenhængen mellem ureaindhold i blod, mælk og urin sammenlignet. Urea i mælk vist her er målt vådkemisk, målinger med NIR svarende til det, der er brugt i ydelseskontrollen indtil 2010, blev også udført, men NIR målingerne viste en betydelig bias i forhold til de vådkemiske målinger (Kristensen et al., 2009). Figur 2 viser, at øgningen i blod, mælk og urin forløber nogenlunde parallel ved øget proteintildeling, men med en tendens til kraftigere øgning i blod.

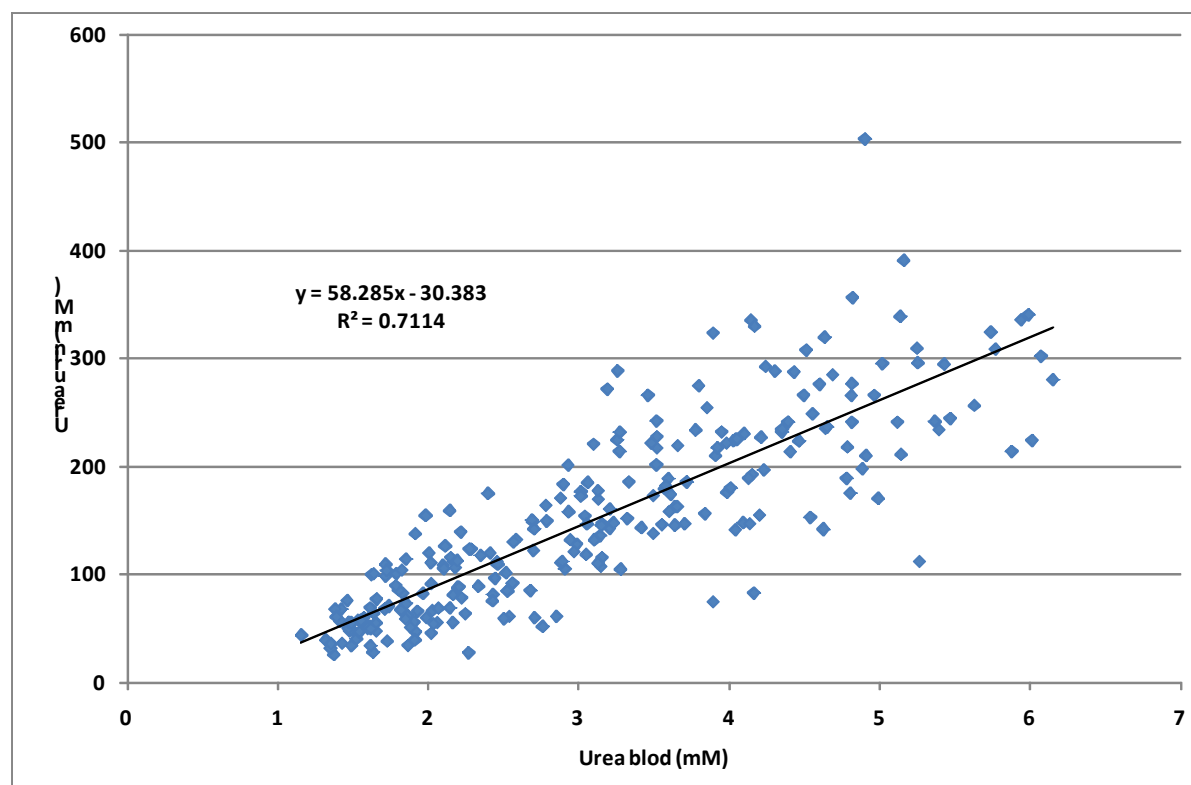


Figur 2. Respons i urea koncentrationen i blod, mælk og urin ved øget proteintildeling

Figur 3 viser, at ureaindholdet i mælken øges med 0,75 af øgningen i blodet. Figur 4 viser, at ureaindholdet i urinen øges i takt med øgning i blodet, men også at variationen i ureaindhold i urinen øges betydeligt ved øget ureaindhold i blodet.



Figur 3. Sammenhæng mellem urea i mælk og urea i blod



Figur 4. Sammenhæng mellem urea i urin og urea i blod

Responderer forskellige køer forskelligt på lav proteintildeling?

Et af de væsentligste forsøgsspørgsmål var, hvorvidt individuelle køer responderer forskelligt på lav proteinforsyning. Dette er interessant med henblik på, om der kunne være en genetisk forskel, således at der kunne avles for køer, der kunne opretholde en høj produktion med lav proteintildeling. Men udover den genetiske komponent kunne der være forskelle betinget af opvækst, størrelse, tidligere behandlinger og andet som vi ikke har registreret. Det skal nævnes, at individuelle forskelle i denne sammenhæng ligger ud over, hvad der kommer fra laktationsstadiet, laktationsnummer og lignende systematiske effekter.

For så vidt som effekterne har en genetisk baggrund benævnes de som ”genetik-miljøvekselvirkninger (GxE)” eller ”fænotypisk følsomhed” eller ”plasticitet”. Tidligere er GxE effekter af proteinniveau i foder vist på tilvækst hos mus i selektionsforsøg (Nielsen og Andersen, 1987).

Betydningen af individuelle effekter blev i dette forsøg opgjort som generelle effekter af ko (gentagelighed), og som effekter på hældningen af responset på ændret protein i form af lavere EKM og foderoptagelse. Hældningen på responset udgør selve følsomheden.

Generelle gentageligheder er angivet af Kristensen et al. (2010), og er ret høje, 0,77 for tørstofoptagelse, 0,38 for EKM og 0,52 for proteinudnyttelse. Disse gentageligheder (reperbarheder) angiver, om man finder samme niveau når man måler på en ko igen, dvs. hvorvidt køerne ved gentagne målinger holder deres rangering, efter der er korrigeret for gennemsnitlig effekt af proteinniveau.

Forskellige køer responderede faktisk forskelligt på proteinniveau, ved at hældningskoefficienterne for de individuelle køer adskiller sig fra hinanden både hvad angik EKM og tørstofoptagelse, men ikke for proteinudnyttelse.

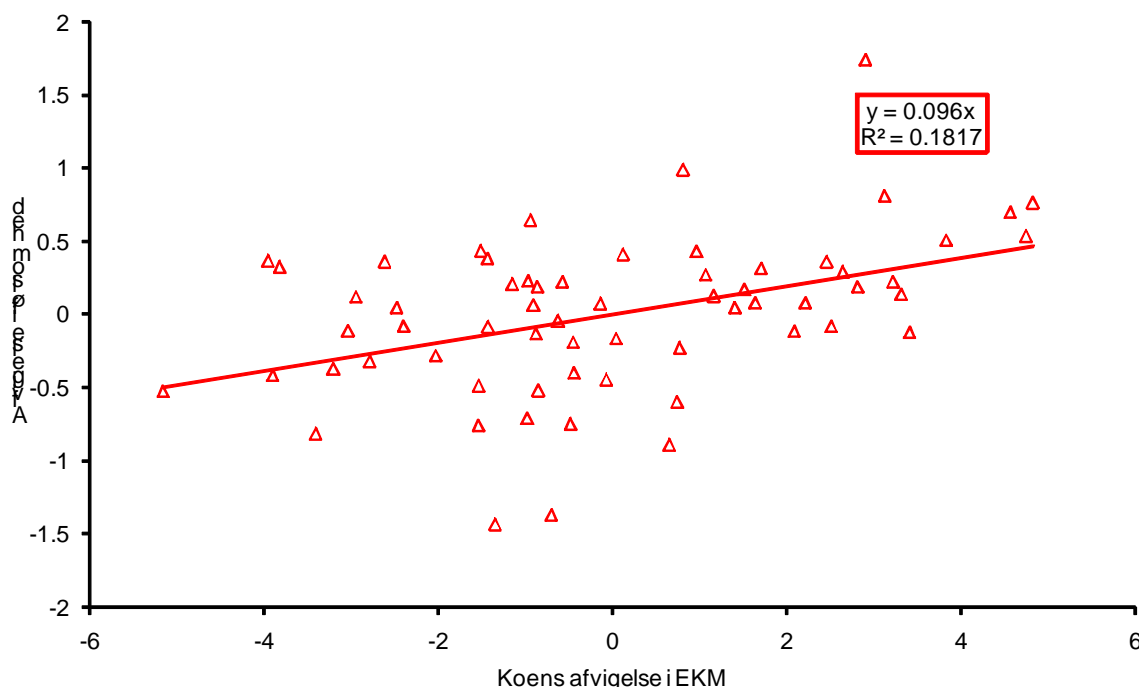
Vi kan ikke i dette materiale påvise i hvilken grad ovennævnte forskelle mellem køer i respons er en genetisk effekt, men vi kan teste om koens niveau korrelerer til følsomheden (hældningen). I Tabel 4 er vist, at responset i EKM på proteinniveau (hældning) havde en meget signifikant positiv korrelation (0,43) med koens ydelsesniveau, dvs. jo højere ydelse jo større var effekten af proteinniveau, hvilket tyder på en proportionalitet mellem følsomhed og ydelsesniveau. Noget overraskende blev det samme ikke fundet for foderoptagelse (tørstof), hvor der kun var en svag korrelation mellem niveau og hældning.

Der var, ikke overraskende, en betydelig korrelation mellem EKM ydelse og tørstofoptagelse, for såvel niveau som hældning.

Tabel 4. Korrelationer (i parentes P-værdi for signifikant korrelation) mellem niveau og hældninger for EKM ydelse og tørstofoptagelse. Baseret på 63 sæt af regressionsparametre for individuelle køer.

		EKM		Tørstofoptagelse	
		Niveau	Hældning	Niveau	Hældning
EKM	Niveau	1	0,43 (0,0005)	0,58 (<0,0001)	0,17 (<0,02)
	Hældning		1	0,04 (0,8)	0,42 (0,0006)
Tørstofoptagelse	Niveau			1	0,09 (0,47)
	Hældning				1

Betydningen af koens niveau for responset (afvigelse i følsomhed) er vist i Figur 5. Enheden for rations proteinindhold ved regressionsberegningerne var % råprotein i rationen. Det ses, at en øgning i koens niveau på 1 kg EKM øger responset med 0,1, dvs. køer der giver 40 kg EKM vil ved en øgning af proteinniveauet i rationen med 1 % enhed (10 g/kg ts) respondere med 1 kg EKM mere end køer der giver 30 kg EKM.



Figur 5. Betydning af koens EKM niveau for koens EKM respons (afvigelse i følsomhed).

Betydningen af de fundne individuelle forskelle i både niveau og hældning er at nutidens højt ydende køer har øget følsomhed overfor reduceret proteintildeling. For den enkelte ko kan dette

være en nødvendig strategi til at sikre den mod overdreven mobilisering ved utilstrækkelig proteinforsyning. Hvis man gennem avlsarbejdet ønsker at køer skal være højt ydende også når de fodres på lave protein niveauer peger nærværende resultater på, at der bør tages hensyn hertil. Ud fra modelforsøg med mus (Nielsen og Andersen, 1987) vil den bedste vej mod reduceret følsomhed især være at udnytte ydelsesdata fra køer, der fodres på lave proteinniveauer i avlsarbejdet, hvilket vil give køer med høj ydelse på både lave og høje protein niveauer.

Kan reduceret proteinniveau betale sig?

En simpel økonomiberegning på resultaterne fra nærværende forsøg er vist i Tabel 3. Det ses tydeligt, at selv ved en betydelig pris på suppleringsprotein vil det koste på indtjeningen pr. ko at reducere proteintildelingen, hvis produktionen reduceres nævneværdigt. Første reduktion (til 150 g råprotein/kg ts) har i beregningseksemplet positiv økonomisk effekt, da reduktionen i produktionen her er begrænset. Beregningseksemplet er gennemført med sojaskrå som proteinkilde og med aktuelle priser, derfor er suppleringsprisen på protein meget høj. Ved valg af billigere proteinkilder og i situationer med højere mælkepris, vil det direkte økonomiske incitament til at reducere proteintildelingen være endnu mindre. Den anvendte pris på suppleringsprotein var 4,4 kr/kg ved anvendelse af sojaskrå. Ved anvendelse af billigere proteinkilder kan prisen på suppleringsprotein beregnes til 2,7 kr/kg for rapsskrå, og 1,4 kr for foderurea (beregning baseret på aktuelle priser for byg, sojaskrå, rapsskrå og foderurea, personlig meddelelse, Martinus Müskens, DLG, april 2010).

Hvis N udskillelsen fra husdyrene er begrænsende for antallet af køer på en bedrift, ses det af Tabel 5, at der indenfor samme totale N udskillelse på bedriftsniveau ville kunne være 1,16, 1,36 eller 1,61 gange så mange køer i besætningen ved de 3 reducerede proteinniveauer. Så i en situation hvor kun N udskillelsen er begrænsende for produktionens omfang, vil en reduktion i proteinniveau kunne være relevant også selv om det koster ydelse.

Tabel 5. Simpel økonomiberegning

	Behandling (g råprotein/kg ts)			
	121	134	150	167
Tørstof optag, kg/d	20,0	21,0	21,4	21,4
Mælkeydelse, kg EKM/d	27,1	29,1	30,6	31,1
N udskilt, g/dag	249	294	345	400
Red. foder udgift (kr/dag)	1,32	0,36	0,00	0,00
Red. proteinudgift (kr/dag)	5,03	3,31	1,60	0,00
Red. mælkeindtægt (kr/dag)	8,40	4,20	1,05	0,00
Omkostning red. proteinniveau (kr/dag)	2,05	0,53	-0,55	0,00
Omkostning pr. årsko (kr)	750	192	-200	0
Relativ antal køer (samme totale N udsk.)	1,61	1,36	1,16	1,00

Forudsætninger: Foder pris 1 kr/kg ts, suppleringsprotein 4,4 kr/kg (pris suppleringsprotein ud fra byg og sojaskrå), mælk 2,1 kr/kg, ingen mobilisering eller tilvækst, N udskillelse er differencen mellem N i foder og N i mælk.

Potentiale for reduktion i proteintildelingen

Det gennemsnitlige proteinindhold i foderrationer til malkekøer er pt. på 163 g/kg ts i Danmark. Det gennemførte forsøg og ovennævnte simple økonomiberegninger viser, at proteinniveauet kan sænkes til 150 g/kg tørstof uden negative økonomiske effekter. Man skal dog være opmærksom på, at dette forsøg er gennemført med ret korte periodelængder (14 dage) og med køer i midtlaktation; således kan det ikke afvises at længere perioder ville have givet større udslag for proteinniveau, og det er også tænkeligt at køer i tidlig laktation ville respondere stærkere for reduceret proteinniveau. Ligeledes kan foderrationens sammensætning, som tidligere nævnt, også forventes at have betydning for responset.

Ved sænkning af proteinniveauet til f.eks. 150 g/kg ts vil man blive mere sårbar overfor unøjagtigheder i foderanalyser og rations sammensætning, idet et højere proteinniveau giver en vis sikkerhed for at man ikke kommer til at underforsyne. Derfor vil anvendelse af proteinniveauer i praksis på f.eks. 150 g/kg tørstof være afhængig af, at der er letmålelige indikatorer, der kan give alarm, hvis proteinniveauet kommer for langt ned, eksempelvis ureaindholdet i mælk.

Men der er et meget betydeligt potentiale for at reducere proteintildelingen. I Tabel 6 er vist scenarie beregninger sammenlignet med normtals-situationen (Lund & Aaes, 2010) for reduktion til 150, og til 121 g/kg tørstof (scenarie 150 og 121), hvor produktionen påvirkes som fundet i forsøget. Det ses, at der på landsplan er et potentiale for at reducere N ab dyr med 7 millioner kg uden nævneværdig reduktion i ydelse.

Tabel 6. Scenarier for reduceret proteintildeling, sammenligning af behandling 150 og 121 med Normtals-situationen, der er næsten overensstemmende med behandling 167

	Normtal ¹	Scenarie 150	Scenarie 121
g råprotein/kg ts	163	150	121
g råprotein/FE	172	158	128
EKM, kg/årsko	9485	9333	8265
Foder udn. (%)	83,0	82,1	81,4
Foder ts, kg/årsko	7375	7375	6893
N _{fæces} kg/årsko	75	75	66
N _{urin} kg/årsko	66	52	23
N _{ab dyr} kg/årsko	141	127	89
N _{ab dyr} g/kg EKM	14,9	13,6	10,7
N _{ab lager} kg/årsko	134	120	84
Køer/100 Ha	127	141	202
Ha/100 køer	79	71	50
Ha/10000 kg EKM	0,83	0,76	0,60
N ab dyr, mill. Kg N, alle Danmarks malkekøer ²	71	64	45

¹ Lund og Aaes, 2010. Øvrige forudsætninger er brug af forsøgets resultater for foderoptag og mælkeydelse, hvor ændringer i forhold til behandling 167 (normtalsituation) er anvendt. Arealkrav er beregnet som 170 kg N ab lager pr. ha, hvor ab lager er 0,95 af ab dyr.

² 540.000 malkekøer, korrigeret med 0,982 pga. jerseyandel

Konklusion

Overforsyning med protein skal undgås, da der kun er negative effekter af overforsyning, hvis foderrationen i øvrigt er fornuftig sammensat.

Reduceret proteintildeling under de gældende normer reducerer foderoptagelse og især mælkeproduktion, og økonomisk kan besparelsen i udgift til protein selv ved høje priser på suppleringsprotein kun opveje meget begrænsede reduktioner i mælkeproduktion. Nærværende forsøg viste, at 150 g råprotein pr. kg rationstørstof, der med PBV på -12/kg ts lå lidt under normen på 0, var optimal ved en høj pris på suppleringsprotein. Ved brug af billigere proteinalternativer ville de to højeste proteinniveauer økonomisk være nogenlunde jævnbyrdige. Proteintildeling under 150 g/kg ts vil kun være relevant i situationer, hvor der er harmoniproblemer.

Køerne responderede forskelligt på proteintildeling for EKM ydelse, således at køer med højest ydelse responderede mest. Men for foderoptagelse var der ikke forskelle i respons mellem køer på forskelligt foderoptagelses-niveau.

Referencer

- Bligaard, H.B., Petersen, M.B., Trinderup, M., Weisbjerg, M.R., Sehested, J., Nadeau, E., Aaes, O. 2010. Sammenhæng mellem fodring og gødningskonsistens hos malkekøer. Rapport, Agro-Tech. http://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/Malkekoeer-og-opdraet/Fodring-og-pasning/Filer/2080_rapport.pdf 18 pp.
- Danfær, A., Thyssen, I. & Østergård, V., 1980. Proteinniveauets indflydelse på malkekøernes produktion. I: Mælkeydelse, tilvækst og sundhed. 492. Beretning, Statens Husdyrbrugsforsøg. 165 pp.
- Kristensen, V.F. 1997. Optimal proteinforsyning. I: Malkekøernes ernæring. aktuel forskning vedrørende protein- og kulhydratomsætningen. Intern rapport 88, 46-55.
- Kristensen N. B., Hvelplund, T. Weisbjerg, M.R. Lund, P. and Løvendahl P. 2010. Repeatability coefficients for dry matter intake and efficiency of nitrogen utilization for milk production in lactating Holstein cows challenged with reduced N diets. Abstract, ADAS, Denver, accepted.
- Kristensen, N.B., Hvelplund, T., Weisbjerg, M.R., Lund, P., Løvendahl, P. & Aaes, O. 2009. Simple NIR bestemmelse af ureakoncentrationen i kontrolmælk fra enkeltkøer er behæftet med stor unøjagtighed. KvægInfo nr 2045. 4 pp.
- Lund, P. & Aaes, O. 2010. Normtal for mængde og sammensætning af fæces og urin samt udskillelse af N, P og K i fæces og urin hos kvæg (2010/2011). Bilag, 9 pp.
- Madsen, J., Misciattelli, L., Kristensen, V.F. & Hvelplund, T. 2003. Proteinforsyning til malkekøer. I: Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2 – Fodring og produktion. Ed.: F. Strudsholm & K. Sejrsen. DJF rapport nr. 54. 113-131.
- Nielsen, B.V.H. og S. Andersen. 1987. Selection for growth on normal and reduced protein diets in mice. I. Direct and correlated responses for growth. Genetical Research Cambridge 50, 7-15.
- Røjen, B.A. & Kristensen, N.B. Effekt af urea infusion på udskillelsen og recirkulering af kvælstof hos malkekøer. I dette bilag.
- Weisbjerg, M.R. 1997. Recirkulering af kvælstof til vommen. I: Malkekøernes ernæring - aktuel forskning vedrørende protein- og kulhydratomsætningen. Intern Rapport Nr. 88, Statens Husdyrbrugsforsøg. 18-29.

- Weisbjerg, M.R., Hvelplund, T, Kristensen, V.F. & Stensig, T. 1998. The requirement for rumen degradable protein and the potential for nitrogen recycling to the rumen in dairy cows. Proceedings of the 25th Scientific Conference AICC – Arusha , August 5-7, 1998. TSAP Conferences Series, 25, 110-118.
- Zimmerman, C.A., Rakes, A.H., Jaquette, R.D., Hopkins, B.A. & Croom, W.J. 1991. Effects of protein level and forage source on milk production and composition in early lactation dairy cows. J. Dairy Sci. 74, 980-990.

Effekt af urea infusion på udskillelsen og recirkulering af kvælstof hos malkekøer

*Betina Amdisen Røjen & Niels Bastian Kristensen
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet*

Sammendrag

Otte vomfistulerede og multikateteriserede malkekøer blev brugt til at undersøge effekten af kontinuerlig infusion af stigende mængder af foder-urea i den ventrale vomsæk til en foderration med et N indhold under behovet for optimal mikrobiel protein syntese i vommen, på udskillelsen, udnyttelsen og recirkuleringen af kvælstof. Behandlingerne var som følger: Kontinuerlig infusion af 0, 4.1, og 8.5 g urea/kg ts, svarende til en samlet råproteinforsyning på hhv. 12.6, 13.8, og 15.0 %. Forsøget viste, at køerne klart responderer på reduceret N indtag ved procentvist at øge urea-N recirkuleringen over det portåre-drænede væv (PDV) i forhold til leverproduktionen af urea-N og mindske urea-N udskillelsen i urin. Også nyrene er i stand til at konservere urea-N ved en øget reabsorption af urea-N, som derved igen via blodet bliver potentielt tilgængeligt for recirkulering til mavetarmkanalen. Ammoniak frigivelsen fra vom til blodet var på alle behandlinger større end recirkuleringen af urea-N over PDV, hvilket indikerer, at køerne har brug for at recirkulere mere urea-N end der er tilgængeligt på lave N indtag for at opretholde NH_3 koncentrationen i vommen. Kvantitativt var der ingen effekt af behandling på urea-N recirkuleringen ved reduceret N indtag, og køerne var dermed ikke i stand til at kompensere for reduceret N indtagelse med øget urea-N recirkulering.

Introduktion

Når N tilførslen overstiger malkekoens behov til diverse livsytringer udskilles N i stigende grad som urea-N i urinen og ved 18.5 % råprotein i en foderration til kvier fandtes 75 % af N udskillelsen som urea-N (Marini & Van Amburgh, 2003). Mens et af vore egne tidligere eksperimenter med malkekøer fodret med en frisk kløvergræs baseret ration med lavt råprotein-indhold (11.3 %) viste en urea-N andel af total N i urin på kun 32 % (Røjen et al., 2008). Forsøg har endog vist, hos stude fodret med enten hø af en meget dårlig kvalitet (4.9 % råprotein), eller samme hø men suppleret med kasein via vomfistel, til et niveau nær behovet for vom-nedbrydeligt protein, værdier på kun hhv. 1.1 og 7.1 % udskilt som urea-N af total N i urin (Wickersham et al., 2008). Urea syntetiseret i leveren kan, hvis det ikke udskilles i urinen (eller i mælken), føres tilbage til mave-tarmkanalen direkte fra blodet eller via spyttet til vommen. I vommen nedbrydes urea-N til ammoniak (NH_3) og kan igen indgå i den mikrobielle proteinsyntese sammen med N fra foderet (Lapierre & Lobley, 2001). Ovenstående illustrerer altså kvægets unikke evne til at recirkulere N i form af urea-N, specielt i situationer hvor N indtaget er lavt. En bedre N udnyttelse opnås i teorien ved, at N indholdet i foderet nedsættes samtidig med, at den mikrobielle proteinsyntese i vommen i højst muligt omfang baseres på recirkuleret N. Alt andet lige, burde N-udskillelsen i urin mindskes, og N udnyttelsen stige. Passerer det nedbrudte urea-N videre til tarmen, eller bliver urea-N recirkuleret til tarmen frem for til vommen, så nedsættes chancen for, at koen kan udnytte det mikrobielle protein.

Der er i dag fortsat en række uafklarede forhold omkring reguleringen af urea-N recirkuleringen og betydningen hos højtydende malkekøer. Men det er dokumenteret, at faldende N indtag medfører en øget reabsorption af urea-N i nyrene, en faldende urea-N koncentration i blodet samt en øget plasma

clearance af urea-N (den mængde blodplasma der 'renses' for urea pr. tidsenhed) (Marini & Van Amburgh, 2003). Ligeledes, ved stigende arteriel koncentration af urea-N falder ekstraktionen af det tilgængelige arterielle urea-N over PDV (Røjen et al., 2008). Bemærkelsesværdigt er det dog, at den absolutte mængde af urea-N som recirkuleres ikke syntes at øges med faldende N indtag (Marini & Van Amburgh, 2003; Wickersham et al., 2008). Modsat, har andre fundet en lineær sammenhæng mellem den arterielle urea-N koncentration og urea-N recirkuleringen over PDV (Sunny et al., 2007). Generelt ser det således ud til, at koen klart responderer på ændringer i N indtaget via en fysiologisk regulering af urea-N transporten over mave-tarmkanalen og bedst ved lav N forsyning, men at malkekoens potentiale for at udnytte evnen til recirkulering af N er relativt dårligt udnyttet under konventionelle produktionsbetingelser.

For yderligere at belyse det fysiologiske respons på N recirkuleringen hos højtydende malkekøer, havde nærværende forsøg til formål at undersøge effekten af kontinuerlig vom-infusion af stigende mængder foder-urea til en foderration med et N indhold under behovet for optimal mikrobiel proteinsyntese i vommen på udskillelse, udnyttelse og recirkulering af N.

Metoder og Materialer

Otte vomfistulerede og multikateteriserede malkekøer blev brugt i forsøget. Køerne blev tilfældigt fordelt på et tripliceret ufuldstændigt 3 x 3 romer kvadrat med forsøgsperioder af 14 dage. Alle køerne blev tildelt den samme laktationsration (Tabel 1) tre gange dagligt med 8 timers interval. Behandlingerne var som følger: Kontinuerlig infusion i den ventrale vomsæk af **0 g urea/kg ts**, **4.1 g urea/kg ts**, og **8.5 g urea/kg ts**. Infusion af urea (opløst i vand) blev gennemført med en slange ført gennem vomfistlen. Foderoptagelse og mælkeydelse blev registreret dagligt. Den sidste uge af forsøgsperioden blev køerne fodret med 95 % af deres ad libitum indtag. På den sidste dag i perioden blev der taget blodprøver fra en arterie, portåren, levervenen (hepatica), og en vomvene hver time i 8 timer, startende ½ time før fodring. Samtidig blev der udtaget vom-, og urinprøver, og derudover blev der taget fæces-, og mælkeprøver. Blodflowet i portåre og levervene blev bestemt ved fortynding af blodflow-markøren para-aminohippursyre, som blev infunderet i blodet med konstant hastighed.

Tabel 1. Sammensætning af foderrationen

	Ration
Fodermiddel, % af ts	
Majs ensilage	47.5
Kløvergræs ensilage	18.5
Natrium-hydroxid behandlet hvede	15.5
Rapskage, 00, 13% fedt, beskyttet	10.0
Roemelasse	1.0
Roepiller- umelasseret	6.4
Mineral mix	1.0
Krom(III)oxid	0.1
Næringsstoffer, g/kg ts	
Tørstof	416 ± 12
Aske	65.1 ± 2.66

NDF	307 ± 2.6
Råfedt	42.0 ± 1.21
Råproterin	12.6 ± 0.30
Fordøjelig energi, MJ/kg ts ¹	16.0 ± 0.24

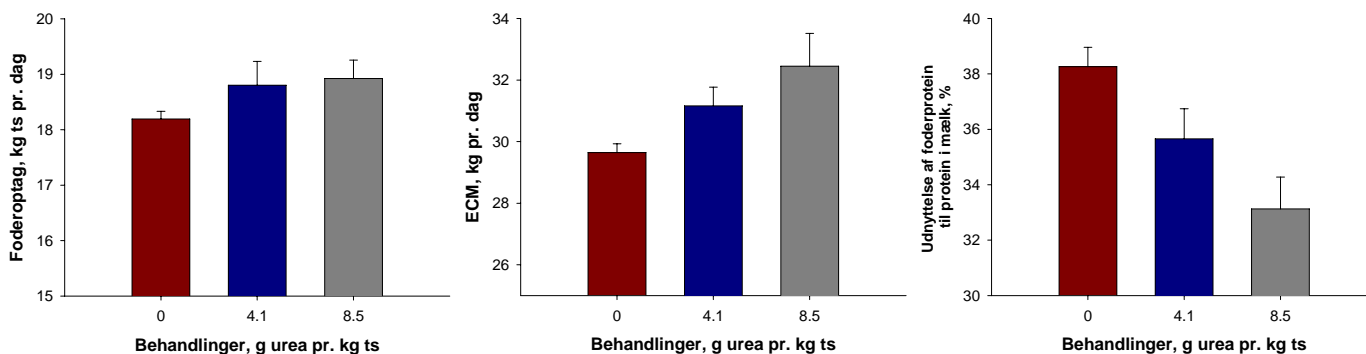
¹Beregnet ud fra det danske foder-evalueringssystem.

Netto fluxen af urea-N og andre metabolitter over de portåre-drænede væv og leveren blev beregnet som produktet af arterie-venøse differencer og blodflowet. Ekstraktionen af urea-N over PDV og vom-epithelet samt renal transport og flux blev beregnet. For yderligere detaljer omkring dyremodel, beregninger, og kemiske analyser se Kristensen et al. (2007) og Kristensen et al. (2010). Data blev analyseret i SAS via proc mixed som romer kvadrat design, med tidspunkterne for udtagning af blodprøver behandlet som gentagne målinger.

Resultater og Diskussion

Foderindtag og mælkeydelse

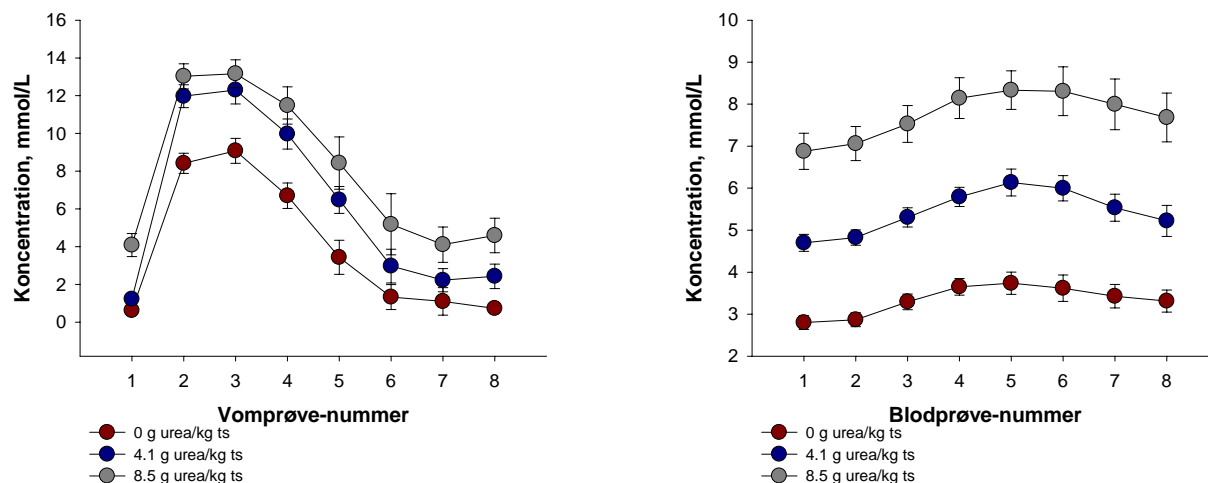
De tre behandlinger resulterede i en samlet råproteinforsyning på 12.6, 13.8, og 15.0 % for hhv. 0, 4.1, og 8.5 g urea/kg ts, og behandlingerne havde en PBV-værdi på -25, -6, og 9 g/SFU for hhv. 0, 4.1, og 8.5 g urea/kg ts og var dermed underforsynede eller nær minimum behovet på 0 g PBV/SFU for vomnedbrydeligt protein (Madsen et al., 1995). Foderoptagelsen, ydelse af energikorrigeret mælk, og udnyttelsen af foderprotein til mælkeprotein (Figur 1a, 1b, og 1c) steg lineært ($P = 0.01$ til $P < 0.01$) med stigende urea infusion. Især på foderoptagelsen slog behandling 0 g urea/kg ts igennem ved en ringere foderoptagelse sammenlignet med 4.1, og 8.5 g urea/kg ts. En klar indikation af, at køerne har været underforsynet med N.



Figur 1. a: Foderoptag i kg tørstof pr dag. b: Energi-korrigeret mælkeydelse, kg pr. dag. c: Foderproteinets udnyttelse til protein i mælk, %.

Vom NH₃-, og arteriel urea-N koncentration

Koncentrationen af NH₃ i vommen steg som forventet kraftigt efter fodring, ligeledes observeredes en lineær effekt ($P < 0.01$) af urea infusion på niveauet af NH₃ i vommen (Figur 2a), hvilket også gjorde sig gældende for den arterielle koncentration af urea-N ($P < 0.01$; Figur 2b).



Figur 2. a: Koncentrationen af ammoniak i vommen, mmol/L. b: Den arterielle urea-N koncentration, mmol/L.

Ammoniakkoncentrationen i vommen var i perioder af døgnet væsentligt under klassiske estimater for minimumskravet til maksimering af mikrobiel vækst på 3.6 mM (Satter og Slyter, 1974) specielt for behandlingen med infusion af 0 g urea/kg ts. Som konkluderet af Reynal og Broderick (2005) er den optimale NH_3 koncentration i vommen påvirket af de kemiske og strukturelle karakteristika af det fordøjelige substrat, hvilket i dette forsøg inkluderer det infunderede urea, som i vommen lynhurtigt vil nedbrydes til NH_3 af urease producerende bakterier (Wallace, 1979). Det kan tænkes, at den hurtige nedbrydning af infunderet urea bevirker, at NH_3 således ikke blandes så effektivt med den mediale vompulje og har større chance for at blive absorberet til blodet sammenlignet med en kvælstofkilde, der indtages med det almindelige foder, og dermed bliver NH_3 puljen begrænsende for den mikrobielle vækst.

Urea-N transport

Leverens produktion af urea-N (netto hepatica flux af urea-N) steg lineært ($P < 0.01$; Tabel 2) med stigende urea infusion. Denne stigning i urea-N produktion bidrager til at øge den arterielle urea-N koncentration. Frigivelsen af NH_3 over PDV til blodet (netto portåre flux af NH_3) steg lineært ($P < 0.01$) med stigende urea-N infusion, mens der ikke var nogen effekt af behandling på optaget af urea-N over PDV (netto portåre flux af urea-N) dvs. ingen øget recirkulering af urea-N fra blodet til mavetarmkanalen med faldende N indtag. Dog sås en tendens til en kvadratisk effekt ($P = 0.08$) på netto portåre fluxen af urea-N afspejlet ved en tendens til større urea-N flux ved behandling 4.1 g urea/kg ts i forhold til 0, og 8.5 g urea/kg ts. Det gjaldt for alle tre behandlinger, at NH_3 fluxen var større end urea-N fluxen, altså blev der absorberet mere NH_3 til blodet end der blev recirkuleret urea-N til vommen. Det vil sige at kørerne, som var underforsynet med N for at kompensere for den høje NH_3 flux, ville være nødt til at recirkulere urea-N mere end én gang for at understøtte optimal mikrobiel syntese i vommen, hvilket tyder på at NH_3 absorptionen til blodet er for effektiv i forhold til urea-N transporten til vommen.

Tabel 2. Effekt af urea infusion på portåre, hepatica, og splanknikus netto flux¹ af urea-N og ammoniak, samt PDV- og vom-optag af arterielt urea-N

	Urea infusion (g/kg ts)			SEM	P-værdi ²		
	0	4.1	8.5		Lin	Kvad	Tid
Netto portåre flux, mmol/h							
Urea N	-223	-306	-274	24	0.14	0.08	0.21
Ammoniak	308	391	487	16	<0.01	0.73	<0.01
Netto hepatica flux, mmol/h							
Urea N	344	497	547	30	<0.01	0.18	<0.01
Ammoniak	-307	-392	-487	16	<0.01	0.80	<0.01
Netto splanknikus flux, mmol/h							
Urea N	120	192	263	32	0.07	0.99	<0.01
Ammoniak	1.7	-1.3	-1.3	2.1	0.29	0.55	0.09
PDV-ekstraktion af arterielt urea-N, %	4.33	3.64	2.34	0.23	<0.01	0.30	<0.01
Vom-ekstraktion af arterielt urea-N, %	16.8	11.4	7.4	1.1	<0.01	0.69	<0.01

¹En negative flux betyder, at der har været et *netto optag* af en metabolit over pågældende væv, mens en positiv flux betyder, at der har været en *netto frigivelse*.

²Lin = lineær effekt, Kvad = kvadratisk effekt, Tid = Effekt af tid indenfor opsamlingsdag

Den manglende effekt af behandling på urea-N recirkuleringen er i overensstemmelse med andre forsøg med adapterede ændringer i N indtaget (Marini & Van Amburgh, 2003; Wickersham et al., 2008) og viser, at koen, selv på lave N indtag, kvantitativt ikke recirkulerer mere urea-N. Anderledes ser det ud når recirkuleringen udtrykkes som den andel af det arterielle urea-N, der ekstraheres over PDV. I dette forsøg sås et fald i PDV ekstraktionen af arterielt urea-N ($P < 0.01$) med stigende urea infusion, dvs. den procentvise ekstraktion af det tilgængelige arterielle urea-N blev mindre. I Røjen et al. (2008) resulterede en meget lav arteriel urea-N koncentration på maks. 2.5 mM ikke i et øget procentvist optag over PDV, end hvad der tidligere er observeret i køer på rationer knap så underforsynede med vomnedbrydeligt protein. Det samme gør sig gældende i dette forsøg ved den laveste N behandling, og det er interessant at PDV, trods N underforsyning, ikke ekstraherede mere end 4.33 % af det arterielle urea-N. Ser vi derimod på ekstraktionen af arterielt urea-N over vommen faldt ekstraktionen ($P < 0.01$) ligeledes med stigende urea infusion, men var på den laveste N behandling 3.9 fold større end PDV ekstraktionen. Ovenstående indikerer, at permeabiliteten af urea-N over epitelet ned-reguleres med stigende urea infusion og, at en differentiell regulering af urea-N recirkuleringen finder sted mellem vom og tarme, muligvis med en specifik op-regulering af transporten af urea-N over vommen relativt til resten af mave-tarmsystemet (Siddons et al., 1985) hvilket er hensigtsmæssigt, da det primært er i vommen, at urea-N kan udnyttes til syntese af mikrobielt protein.

N recirkulerings-kinetik

I Tabel 3 er angivet de vigtigste metabolismeveje for urea-N af betydning for N omsætningen. Netto portåre fluxen af urea-N, angiver som sagt recirkuleringen af urea-N over PDV via blodet, og mangler bidraget fra spyt som primært er afhængig af plasmakoncentrationen af urea (Bailey & Balch, 1961), og som kan udgøre en relativt stor andel af den samlede recirkulering ved høj N forsyning (Huntington, 1989). Ved angivelsen af total urea-N recirkulering tages der højde for urea-N i spyt, idet der, udover

bidraget fra blodet, også er indregnet den mængde urea-N, som bliver recirkuleret via spyttet til vommen. Med sput-bidraget indregnet fandtes der fortsat ikke nogen behandlingseffekt på transporten af urea-N over PDV.

Tabel 3. Effekt af urea infusion på N recirkulerings-kinetik

	Urea infusion (g/kg ts)				P-værdi ¹		
	0	4.1	8.5	SEM	Lin	Kvad	Tid
N indtag (foder), mmol/h	1089	1131	1141	14	0.01	0.36	-
N indtag (infusion), mmol/h	0	106	220	3	<0.01	0.37	-
Lever produktion af urea-N, mmol/h	344	497	547	30	<0.01	0.18	<0.01
Total urea-N recirkulering, mmol/h	265	345	280	29	0.70	0.07	<0.01
Urea-N i sput, mmol/h	25	23	-28	29	0.20	0.50	0.32
Urea-N i mælk, mmol/h	2.1	3.5	5.2	0.2	<0.01	0.56	-
Urea-N i urin, mmol/h	79	161	270	7	<0.01	0.11	<0.01
Total N i urin, mmol/h	201	289	403	16	<0.01	0.52	-
Total urea-N recirkulering af urea-N syntesen i leveren, %	71	63	45	3	<0.01	0.19	<0.01
Urea-N i urin af total N i urin, %	41	57	69	3	<0.01	0.24	-
Urea-N i urin af N indtaget, %	7	13	20	0.4	<0.01	0.22	-
Total urea-N recirkulering af N indtag, %	24	28	20	3	0.30	0.09	-
PDV urea-N clearance, L/h	79	64	36	6	<0.01	0.37	<0.01

¹Lin = lineær effekt, Kvad = kvadratisk effekt, Tid = Effekt af tid indenfor opsamlingsdag

Bemærk i Tabel 3 hvorledes urea-N i sput er negativ. Dette bør reelt ikke kunne lade sig gøre, men pga. den store standardafvigelse, som dels er en konsekvens af, at urea-N i sput er beregnet som en differens mellem total urea-N recirkulering og netto fluxen af urea-N, så vil det være muligt at få et negativt sput-bidrag, når værdien er tæt på nul. Uanset, må bidraget fra sput i dette forsøg anses for ikke at være af større betydning for den overordnede urea-N recirkulering og i god overensstemmelse med de forholdsvis lave urea-N koncentrationer i blodet. Koncentrationen af urea-N i mælk steg lineært ($P < 0.01$) med stigende urea infusion, men må siges at være negligerbar i forhold til den egentlige udskillelsesvej for urea-N, nemlig gennem urinen. Ikke overraskende, observeredes en lineær stigning ($P < 0.01$) i total N i urin, og urea-N i urin med stigende urea infusion. Ligeledes sås en lineær stigning ($P < 0.01$) i den procentvise urea-N andel af total N i urin med stigende urea infusion, hvilket er i fuld overensstemmelse med andre forsøg (Marini & Van Amburgh, 2003; Sunny et al., 2007). Således udskiltes 41 og 69 % som urea-N ud af total N ved hhv. 0 og 8.5 g urea/kg ts. På trods af at behandlingen, som gav det højeste N indtag, lå omkring niveauet for minimum PBV-behov, så fandtes altså en relativt stor udskillelse af urea-N ud af total N i urin. Alligevel kan vi tillade os at sige, at køerne faktisk er i stand til ret effektivt at udnytte det urea-N de har til rådighed, især på lave N indtag da den mængde urea-N, som blev udskilt med urinen på den laveste N behandling, kun var 7 % af den samlede N indtagelse. Andelen af total urea-N, som blev recirkuleret, var 71 kontra 45 % ($P < 0.01$) for hhv. 0 og 8.5 g urea/kg ts, og bekræfter igen koens evne til når der fodres med lavt N indhold at udnytte urea-N effektivt til recirkulering. Når recirkuleringen udtrykkes som urea-N clearance over PDV fandtes en lineær behandlingseffekt ($P < 0.01$) reflekteret ved faldende urea-N clearance med

stigende urea infusion, hvilket igen indikerer, at en ned-regulering af urea-N transporten over epitelet finder sted med stigende N indtag.

På tværs af behandlingerne genfandt man kun mellem 46 og 53 ± 1 % af foderets N som N i mælk og urea-N i urin (data ikke vist), dvs. at den øvrige udskillelse af N i gødning og non-urea-N andelen i urin udgør op imod 50 % af N indtaget. I dette forsøg blev størsteparten af N udskilt i fæces (data ikke vist) og har, udover ufordøjet foder N, sandsynligvis for en stor del bestået af metabolisk fæces N, dvs. N i fordøjelsesenzymer, afstødte epitelceller og mikrobielt protein (Kebreab et al., 2002).

Renal N kinetik

Den renale urea-N clearance steg lineært ($P < 0.01$; Tabel 4) med stigende urea infusion, dvs. ved den laveste urea infusion 'rensende' nyrene et mindre blod-volumen for urea-N per tidsenhed end ved den højeste urea infusion. Filtrationsraten af urea-N i nyren steg ligeledes lineært ($P < 0.01$) med stigende urea infusion. At både den renale urea-N clearance og filtrationsraten af urea-N steg med stigende urea infusion er en konsekvens af den arterielle koncentration af urea-N, som gør tilgængeligheden af urea-N i blodet større, samt at det renale plasma flow også steg ($P = 0.01$) lineært med stigende urea infusion.

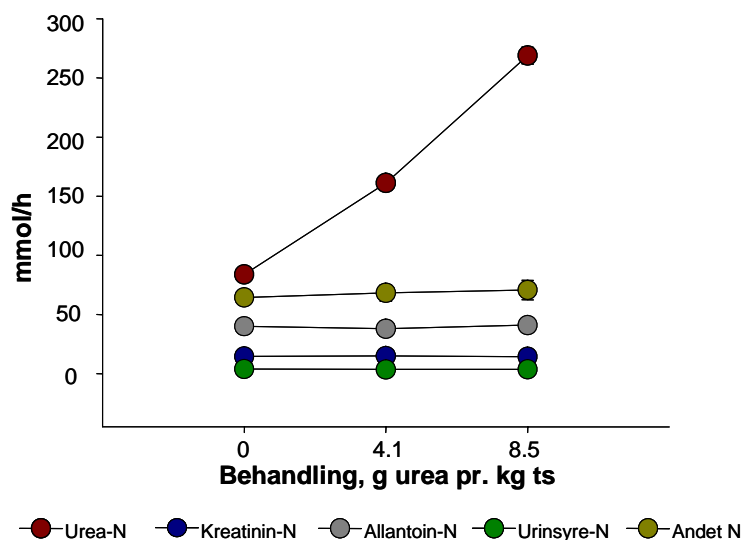
Tabel 4. Effekt af urea infusion på renale urea-N clearance, renale plasma flow, filtreret urea-N i nyren, reabsorberet urea-N i nyren samt udskillelse af total N, urea-N kreatinin-N, allantoin-N, og urinsyre-N i urin

	Urea infusion (g/kg ts)			SEM	<i>P</i> -værdi ¹		
	0	4.1	8.5		Lin	Kvad	Tid
Renale Urea-N clearance, L/h	25	30	35	1	<0.01	0.83	<0.01
Renale plasma flow, L/h	302	323	336	8	0.01	0.73	<0.01
Filtreret urea-N, mmol/h	186	335	475	18	<0.01	0.86	<0.01
Reabsorberet urea-N, %	57	52	42	3	<0.01	0.43	<0.01
N-bestanddele i urin, mmol/h							
Total N	201	289	403	16	<0.01	0.52	-
Urea-N	79	161	270	7	<0.01	0.11	<0.01
Kreatinin-N	14	15	14	1	0.91	0.40	0.16
Allantoin-N	39	38	41	2	0.58	0.42	-
Urinsyre-N	3.8	3.5	3.7	0.20	0.61	0.40	-
Ikke identificeret N-kilde	64	72	74	14	0.56	0.86	-

¹Lin = lineær effekt, Kvad = kvadratisk effekt, Tid = Effekt af tid indenfor opsamlingsdag

Efter urea-N er filtreret, kan det enten reabsorberes til blodet eller udskilles i urinen (Trinh-Thrang-Tan & Bankir, 1998); og i dette forsøg fandtes en nedsat reabsorption af urea-N med stigende urea infusion, altså en indikation af, at nyrene er i stand til aktivt at konservere urea-N i systemet, når N indtaget er lavt. Denne øgede reabsorption på lavt N indtag menes at være en konsekvens af en øget expression af urea transporter protein i det indre medullære samlerør (Terris et al., 1997). Urea-N, som ikke reabsorberes, udskilles i urinen sammen med andre non-urea-N komponenter såsom purin derivater, hippursyre, kreatin/kreatinine, frie aminosyrer samt ammoniak (Bristow et al., 1992). Det fremgår af Figur 3, at langt den væsentligste kilde til ekstra N i urin ved øget N indtag er via urea-N, men ved især lave N indtag hvor urea-N andelen af total N mindskes, vil en øget viden om non-urea-N

komponenterne være af væsentlig interesse for vurdering af mulighederne for yderligere reduktion i den obligate N udskillelse i urinen.



Figur 3. Udskillelse af urea-N og non-urea-N komponenter i urin.

Konklusion

Stigende infusion af urea i vommen hos malkekøer på lavt N indtag medførte et fald i ekstraktionen af arterielt urea-N over det portåredrænede væv samt over vom-epitelet, men den relative ændring i ekstraktionen over vommen var generelt større end ændringen i ekstraktionen over PDV, hvilket tyder på en differentiell regulering af urea-N recirkuleringen mellem vom og tarme. Clearance af urea-N over PDV blev ned-reguleret med stigende urea infusion, og understøtter dermed, at en regulering af urea-N transporten finder sted. Dog var de absolutte mængder af urea, som blev recirkuleret ikke forskellig mellem behandlingerne. I nyrerne blev en stigende andel af filtreret urea-N reabsorberet, når N indtaget faldt, hvilket indikerer, at også nyrerne er i stand at konservere urea-N i situationer, hvor N er i underskud. På den laveste urea infusion var køerne i stand til at recirkulere 71 % af leverens produktion af urea-N, og kun 7 % af foderets N indhold udskiltes som urea-N i urin. Men køerne var ikke i stand til at forsyne vom-mikroberne med stigende mængder af recirkuleret urea-N, når N indtaget blev reduceret.

Referencer

- Bailey, C. B., and C. C. Balch. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *Br. J. Nutr.* 15:383-402.
- Bristow, A. W., D. V. Whitehead, and J. E. Cockburn. 1992. Nitrogenous Constituents in the urine of Cattle, Sheep, and Goats. *J. Sci. Food Agric.* 59:387-394.
- Børsting, C. F., Kristensen, T., and Aaes, O. 2001. Kvæg, ab dyr. Side 42-58 i DJF Rapport, Nr. 36. Kvælstof, fosfor og kalium i husdyrgødning – normtal 2000. Poulsen, H. D., Børsting, C. F., Rom, H. B., Sommer, S. G. eds. Danmarks JordbrugsForskning, Husdyrbrug.

- Huntington, G. B. 1989. Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. *Can. J. Anim. Sci.* 69:215-223.
- Kebreab, E., J. France, J. A. N. Mills, R. Allison, and J. Dijkstra. 2002. A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment. *J. Anim. Sci.* 80:248-259.
- Kristensen, N. B., A. Storm, B. M. L. Raun, B. A. Røjen, and D. L. Harmon. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1364-1377.
- Kristensen, N. B., A. C. Storm, and M. Larsen. 2010. Effects of dietary nitrogen content and intravenous urea infusion on ruminal and portal-drained visceral extraction of arterial urea in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* Accepted.
- Lapierre, H., and G. E. Lobley. 2001. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. *J. Dairy Sci.* 84 (E. supp 1.):E223-E236.
- Madsen, J., T. Hvelplund, M. R. Weisbjerg, J. Bertilsson, R. Spöndly, I. Olsson, O. M. Harstad, H. Volden, M. Tuori, T. Varvikko, R. Huhtanen and B. L. Olafsson. 1995. The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. A revision. *Norwegian J. Agric. Sci. Supp.* 19:1-37.
- Marini, J. C., and M. E. Van Amburgh. 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 81:545-553.
- Reynal, S. M., and G. A. Broderick. 2005. Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88:4045-4065.
- Røjen, B. A., P. Lund, and N. B. Kristensen. 2008. Urea and short-chain fatty acids metabolism in Holstein cows fed a low-nitrogen grass-based diet. *Animal.* 2:500-513.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Siddons, R. C., J. V. Nolan, D. E. Beaver, and J. C. Macrae. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. *Br. J. Nutr.* 54:175-187.
- Sunny, N. E., S. L. Owens, R. L. Baldwin, VI, S. W. El-Kadi, R. A. Kohn, and B. J. Bequette. 2007. Salvage of blood urea nitrogen in sheep is highly dependent upon plasma urea concentration and the efficiency of capture within the digestive tract. *J. Anim. Sci.* 85:1006-1013.
- Terris, J., C. A., Ecelbarger, J. M. Sands, and M. A. Knepper. 1998. Long-term regulation of collecting duct urea transporter proteins in rat. *J Am Soc Nephrol.* 9: 729-736.
- Trinh-Trang-Tan, M. M., and L. Bankir. 1998. Integrated function of urea transporters in the mammalian kidney. *Exp. Nephrol.* 6:471-479.
- Wallace, R. J., K.-J. Cheng, D. Dinsdale, and E. R. Ørskov. 1979. An independent microflora of the epithelium and its role in ecomicrobiology of the rumen. *Nature* 279:424-426.
- Wickersham, T. A., E. C. Titgemeyer, R. C. Cochran, E. E. Wickersham, and D. P. Gnad. 2008. Effect of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming low-quality forage. *J. Anim. Sci.* 86:3079-3088.

Malkekoens potentiale for recirkulering af kvælstof

Niels Bastian Kristensen¹, Peter Kappel Theil¹ & Robert Fenton²

¹Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

²Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

Sammendrag

Urea dannes i leveren og udskilles enten i urinen eller hydrolyseres af bakterielle ureaser i mavetarmkanalen. Urea der hydrolyseres af bakterielle ureaser i mavetarmkanalen, definerer vi som værende recirkuleret. Når urea spaltes, dannes ammoniak og kuldioxid og det frigivne ammoniak kan anvendes af mikroorganismene i f.eks. vom og vomepitel som kvælstofkilde eller blive genabsorberet til blodet, taget op i leveren og omdannet til urea endnu en gang. I modsætning til vor oprindelige hypotese ser det ud til, at malkekoen har en relativt dårlig udnyttelse af recirkuleret urea, og den kun har en beskedent evne til opregulering af den absolutte mængde af urea der recirkuleres. Det er hidtil ikke lykkedes, at identificere de transportproteiner, der formodes at regulere vomepitelets permeabilitet for urea. De foreliggende data tyder på at recirkulering af urea-N fra blodet til mavetarmkanalen kun vil kunne yde et meget beskedent bidrag til forbedring af malkekoens kvælstofudnyttelse.

Introduktion

Idet den gennemsnitlige danske malkeko årligt indtager ca. 191 kg kvælstof (N) og mindre end 30% som gennemsnit opsamles i mælk vil ca. 142 kg N udskilles med fæces og urin. Køer fodret med moderate mængder N vil udskille omkring 40% af dette ikke udnyttelige N som urea i urinen. Urea er et meget polært molekyle med et højt kvælstofindhold (46,65% af vægten af urea er N) og er derfor velegnet til at bære N ud af kroppen via udskillelse i urin, men samtidigt er kvælstoffet i urea principielt også relativt let tilgængeligt. Hydrolyse af urea til ammoniak kræver tilstedeværelse af urease enzym. Pattedyr udtrykker ikke selv dette enzym, men bl.a. bakterier, der koloniserer vomvæggen, udtrykker dette enzym og kan katalysere hydrolyse af urea.

Tilstedeværelse af bakterier, der udtrykker urease enzym i mavetarmkanalen, betyder at hvis urea undgår udskillelse i urinen og i stedet transporteres til mavetarmkanalen vil kvælstoffet i urea blive tilgængeligt som ammoniak for mikroorganismene. Ammoniak er en af de væsentlige kvælstofkilder for den mikrobielle proteinsyntese og den mængde ammoniak, som vommens mikroorganismer kan tilføres gennem tilbageførsel af kvælstof fra blodet til vommen (recirkulering), kan spares i foderet. Dermed er det oplagt at større recirkulering af urea fra blod til vom hos køer, og bedre kendskab til reguleringen af recirkulering kunne være et væsentligt værktøj til at øge kvælstofudnyttelsen hos malkekøer.

Perspektiverne i anvendelse af recirkulering til forbedring af kvægs kvælstofudnyttelse er store og kunne være af væsentlig betydning også for ammoniakemissionen fra kvæg urin/gylle. Nærværende præsentation vil undersøge om vores forhåbninger til betydningen af kvælstof-recirkulering stadig kan holdes i live efter forskningsmæssig granskning af disse ideers fysiologiske ophæng.

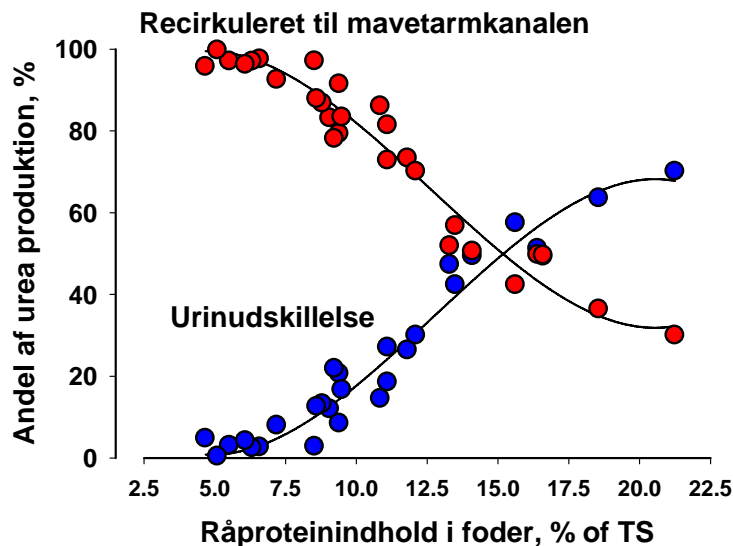
Materialer og Metoder

De her præsenterede undersøgelser er gennemført med multikateteriserede malkekøer, hvilket har gjort det muligt at måle ureaproduktionen i leveren og ureaoptagelsen fra blodet under passage af mavetarmkanalen. Opsamling af urinprøver og kontinuerlig infusion af markør betyder at diuresen kan bestemmes, og forskellen mellem den totale ureaproduktion og ureaoptagelsen i mavetarmkanalen, urea-udskillelsen i urin og mælk sættes lig urea-udskillelsen med spyttet. I flere forsøg er der udtaget vompapiller som er undersøgt for ekspresion af gener der koder for transportproteiner og immunohistologiske undersøgelser af hvor transport-proteiner er lokaliseret i epitelet.

Resultater og Diskussion

Er urea-recirkulering drøm eller virkelighed

Der sker fysiologiske forandringer hos køer når kvælstofindholdet i foderet ændres. Disse forandringer har stor indflydelse på hvor stor en andel af urea dannet i leveren, der udskilles med urinen, og hvor stor en andel, der nedbrydes af mikrobielle ureaser i mavetarmkanalen. Figur 1 viser, at ved stærk underforsyning med N vil næsten 100% af den urea der dannes i leveren blive hydrolyseret i mavetarmkanalen og dermed recirkuleret, hvorimod ved stærk overfodring med N vil mere end 60% af den mængde urea, der dannes i leveren, blive udskilt med urinen.

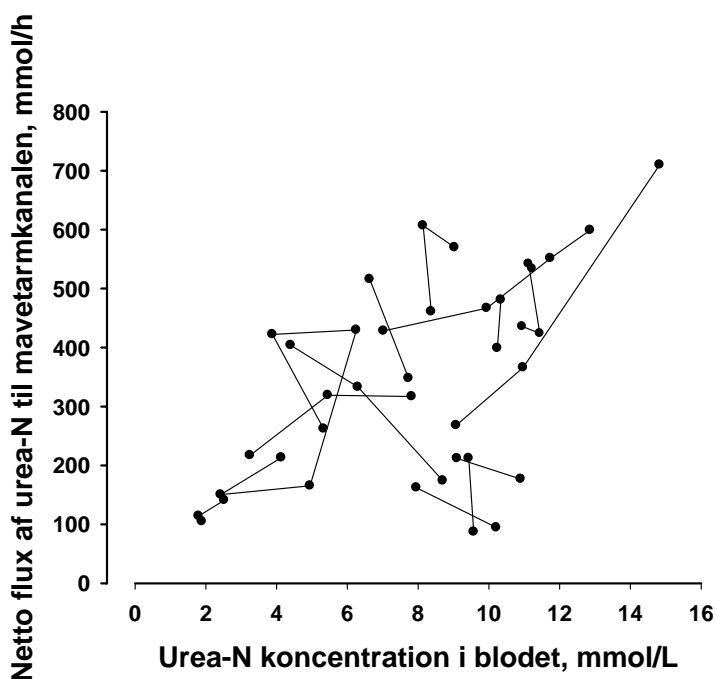


Figur 1. Figuren viser hvor stor en andel af den mængde urea som er dannet i leveren, der udskilles med urinen, og hvor stor en andel der recirkuleres til mavetarmkanalen. Gentegnet fra (Reynolds and Kristensen, 2008).

Figur 1 kunne dermed tyde på, at koen er i stand til at respondere på den udfordring hun præsenteres for ved det lave N-indhold i foderet. Problemet er blot, at selvom koen tilsyneladende responderer, er hun ikke i stand til at øge den absolutte mængde af N, der flyttes fra blodet til mavetarmkanalen; hun er alene i stand til at øge overførslen relativt til leverens produktion af urea, som jo er faldende. Resultatet bliver, at en øget andel af en faldende mængde overordnet set giver en uændret til faldende overførsel af urea. Figur 2 viser hvordan optagelsen af urea over mavetarmkanalen generelt har en trend i den forkerte retning, hvis vores hypotese er at reciklring af urea skal kompensere for et lavere N-indhold i foderet.

Vi står dermed med et biologisk system, som tilsyneladende responderer på den udfordring det sættes overfor, men responset er ikke stærkt nok. Et af de afgørende spørgsmål der er rejst på baggrund af disse informationer er, om den tilsyneladende regulering vi ser, er et artefakt af en transportmekanisme for urea, der opererer ved nogenlunde konstant hastighed, uanset hvilken koncentration af urea der er i blodet. Hvis dette er tilfældet, vil det synes som om ekstraktionen af urea ændres med urea-koncentrationen i blodet, hvor det i virkeligheden måske alene er konsekvens af den reducerede koncentration i blodet. Den anden mulighed er, at det reelt er transporten af urea over mavetarmkanalens epitel, der responderer på den lavere N-tildeling, men hvis opreguleringen af urea ikke kan kompensere for den faldende ureakoncentration i blodet giver det ikke megen ekstra N til mikroberne i vommen.

Forsøg ved DJF har forsøgt at skabe klarhed over hvilken af de to muligheder, der forklarer den observerede urea-transport.



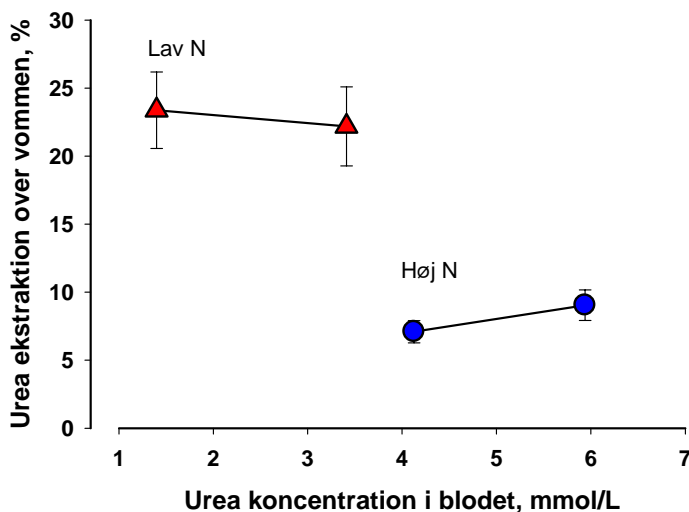
Figur 2. Figuren viser overførslen af urea-N fra blodet til mavetarmkanalen ved stigende urea-N indhold i blodet hos malkekøer. Hvis recirkulering af urea-N kompenserede effektivt for et faldende N-indhold i foderet, ville figuren have vist en markant stigende overførsel fra blodet til mavetarmkanalen ved faldende urea-N indhold i blodet. Gentegnet efter (Calsamiglia et al., 2010)

Regulering af ureatransport over mavetarmkanalens epitel

Køer fodret med henholdsvis lavt (12,1% råprotein) og højt/almindeligt (17,1% råprotein) N-indhold i foderet blev anvendt i et urea-infusions test hvor målinger af ureaomsætning først blev foretaget uden intravenøs urea-infusion og derefter under intravenøs urea-infusion. På denne måde blev det muligt at

undersøge vekselvirkninger mellem adaptation af koen til foderets N-indhold og urea-transporten ved forskellig urea-indhold i blodet.

Det helt overordnede formål med forsøget var at undersøge om urea-transporten ville opføre sig som en massevirkningsreguleret proces således, at ekstraktionen af urea over mavetarmkanalens epiteler ville være konstant med og uden urea-infusion og alene påvirket af om køerne var adapteret til lavt eller højt N-indhold i foderet.



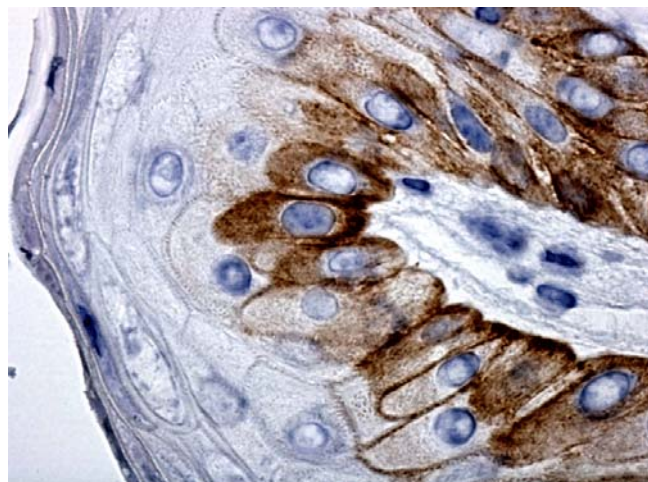
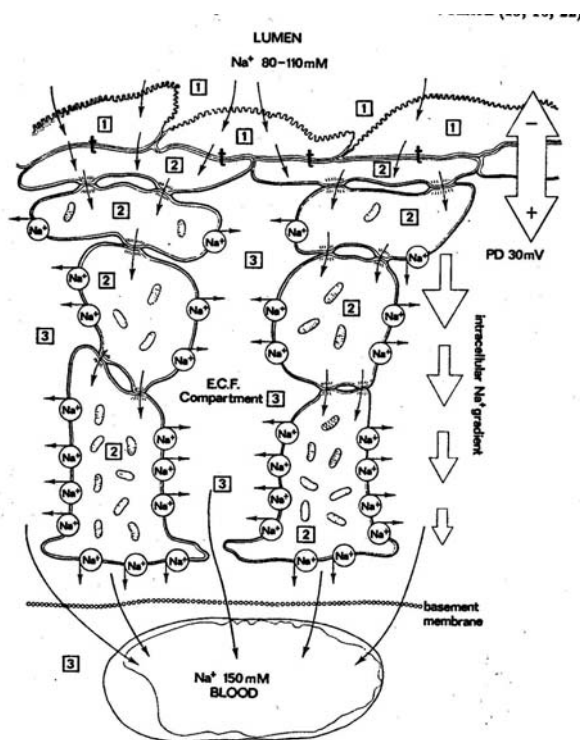
Figur 3. Figuren viser ekstraktionen af urea (arteriel konc. – venøs konc. / arteriel konc.) over vomvæggen på malkekøer fodret med lav N (12,9% råprotein) eller Høj N (17,1% råprotein) og derefter undersøgt før og under intravenøs urea-infusion. Urea-infusion forøgede blodkoncentrationen af urea med ca. 2 mM for begge foderbehandlinger og det ses af figuren, at urea-ekstraktionen responderede kraftigt på det ændrede N-indhold i foderet, men ikke på korttidsændringen induceret ved intravenøs urea-infusion (Kristensen et al., 2010).

Forsøget viste dermed en markant effekt af foderrationens N-indhold på bl.a. vomepitelets egenskaber for transport af urea og viste dermed at forklaringen på den manglende forøgelse i urea-transporten ikke kan være en transportmekanisme, der arbejder ved nogenlunde konstant hastighed. Det tyder derfor på at en ko, der tildeles en ration med lavt N-indhold vil øge bl.a. vomepitelets permeabilitet for urea. Forøgelsen af permeabiliteten for urea ser dog ikke ud til at være stor nok til, at der i væsentlig grad kompenseres for den lavere urea-koncentration i plasma.

Har recirkuleret urea nogen værdi for vommens mikroorganismer?

Værdien af recirkuleret urea-N afhænger af om det ammoniak, der frigives ved hydrolyse af urea, reelt kommer frem til de mikroorganismer, der har behov for kvælstoffet til dannelse af aminosyrer og dermed om urea-N reelt vil bidrage til den mikrobielle vækst. Studier baseret på N-15-mærket urea har indikeret, at den ammoniak, der produceres på baggrund af urea fra blodet, kun i mindre omfang blev indbygget i mikrobielt stof (Sunny et al., 2007). Så en ting er, at urea ekstraheres når blodet passerer mavetarmkanalens epiteler, men for at opnå et reelt udbytte af denne urea transport og omsætning skal den frigivne ammoniak samles op af vommens mikroorganismer. Som det fremgår af Figur 4 er vomepitelet en kompleks struktur opbygget af en række cellelag (flerlaget pladeepitel) og data fra forsøgene med urea-infusion indikerer, at ikke alt det urea, der forsvinder over epitelet transporteres

hele vejen til vommen. En betydelig del af den ammoniak, der dannes ved hydrolyse af urea optaget over vomepitelet står ikke i ligevægt med ammoniak-puljen i vommen. Data tyder derfor på, at der findes en ammoniak-pulje i vomepitelet. Det er uklart hvor dybt epitelet er inficeret med tilhæftede mikroorganismer, men det er givet at vomepitelet er inficeret med en række bakterier, der er strækt tilhæftede til epitelet, og disse bakterier udtrykker urease, der hydrolyserer urea (Wallace et al., 1979). Dermed synes der at være overensstemmelse mellem isotopstudier med får og flux-studier med malkekøer med hensyn til den negative konklusion, at recirkuleret urea tilsyneladende kun har en beskedent tilgængelighed for vommens mikroorganismer. Derimod synes recirkuleret urea at være en fortrinlig N kilde for de mikroorganismer, der har koloniseret vomepitelet.



Figur 4. Skitse af vomepitelets struktur (venstre; Steven and Marshall, 1970; 1 = vomfase, 2 = epitel intracellulær fase, 3 = interstitiel fase) og snit af vompapil behandlet med antistof mod Na,K-ATPase (brunfarvning = Na,K-ATPase; R. Fenton). Epitelets diffusionsbarriere findes i de apikale cellelag (stratum granulosum / corneum), hvorimod der er et mere åbent interstitielt rum i de basale cellelag. Der findes en stærk tilhæftning af bakterier til de apikale cellelag.

Er det koen eller bakterierne der styrer recirkuleringen af urea?

Det er hævet over enhver tvivl, at der sker en betydelig ændring af vomepitelets transport af urea ved faldende N indtag hos koen, men det er uklart, hvordan det sker. Der findes flere transportproteiner der tilskrives specielle funktioner med hensyn til regulering af transporten af urea bl.a. i nyrerne, erythrocytter m.v. (Sands, 2003) og af disse er UT-B også fundet udtrykt i vomepitel (Stewart et al., 2005). Problemet er, at UT-B i tidligere forsøg ikke har vist nogen korrelation til epitelets urea transport (Marini et al., 2004). I nærværende undersøgelse har vi derfor udover UT-B (og UT-A som vi

ikke har kunnet påvise er udtrykt i vomepitel) undersøgt ekspresion af andre proteiner (aquaporiner), der muligvis også kan være af betydning for epitelets urea permeabilitet (Litman et al., 2009).

For nærværende er analyseret mRNA for UT-B, AQP-3 og AQP-7 (AQP = aquaporin, der findes en række forskellige aquaporiner) i biopsier af vomepitel fra køerne fodret med henholdsvis lavt og højt N indhold i foderet (se ovenstående). Der var ikke forskel mellem behandlingerne med hensyn til UT-B mRNA, men både mRNA indholdet for AQP-3 og AQP-7 var højere i biopsierne udtaget ved fodring med højt N indhold sammenlignet med fodring med lav N. Selvom vi endnu ikke har data for hvor meget af de enkelte proteiner, der er udtrykt i epitelet, så synes de fundne effekter med hensyn til mRNA koncentrationer at indikere, at det hverken er UT-B, AQP-3 eller AQP-7, der forklarer den forøgede urea permeabilitet af epitelet ved tildeling af foder med lavt indhold af N. Det er for tidligt at afvise, at koen selv er i stand til at påvirke vomepitelets permeabilitet for urea. Det er muligt at koen ændrer ekspresionen af transportproteiner, der katalyserer en transcellulær transport af urea eller at koen ændrer aktiviteten af en mere eller mindre konstant pulje af transportproteiner; eller at koen ændrer epitelets egenskaber med hensyn paracellulær transport af urea ved at påvirke epitelets struktur. Der er dog yderligere den mulighed, at det ikke er koen selv, men netop de mikroorganismer der selv har direkte udbytte af en forøget kvælstofforsyning fra urea, der påvirker epitelets permeabilitet for urea. Det kan ikke afvises, at bakterier, der kan ændre deres ekspresion af urease som funktion af kvælstofforsyningen (Collins and D'Orazio, 1993), også kan udtrykke proteiner, der påvirker epitelets urea permeabilitet (Stewart and Smith, 2005). Vi kender ikke disse proteiner eller hvordan de evt. påvirker epitelet, men det synes som en oplagt hypotese, at det kunne være de mikroorganismer, der tilsyneladende har den mest direkte gavn af urea-recirkuleringen, der også var i stand til at påvirke recirkuleringen.

Konklusion

Udtrykt relativt til leverens produktion af urea sker der en meget betydelig ændring af udskillelsen af urea med faldende kvælstof (N) indtagelse hos malkekøer. Når N-indtaget falder udskilles en mindre andel af urea i urinen og en større andel recirkuleres til mavetarmkanalen. Vore undersøgelser har vist, at der er tale om en reel opregulering af specielt vomepitelets ekstraktion af urea fra blodet, men koen formår ikke at øge den absolutte mængde af urea, som recirkuleres, fordi blodets koncentration af urea falder, og en øget ekstraktion af en mindre mængde fører til uændret transport. Undersøgelserne tyder også på, at kvælstoffet fra recirkuleret urea udnyttes relativt dårligt til mikrobiel vækst i vommen. Hidtil har det ikke været muligt at identificere opregulering af transportproteiner, der kan forklare den øgede permeabilitet for urea i vomepitel, og der er derfor rejst tvivl om, hvorvidt recirkulering af urea over vomepitelet i stedet kunne være påvirket af de bakterier, der koloniserer epitelet.

Referencer

- Calsamiglia, S., A. Ferret, C. K. Reynolds, N. B. Kristensen, and A. M. Van Vuuren. 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal* In Press.
- Collins, C. M., and E. F. D'Orazio. 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 9:907-913.
- Kristensen, N. B., A. C. Storm, and M. Larsen. 2010. Effect of dietary nitrogen content and intravenous urea infusion on ruminal and portal-drained visceral extraction of arterial urea in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* In Press.
- Litman, T., R. Sjøgaard, and T. Zeuthen. 2009. Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190:327-358.
- Marini, J. C., J. D. Klein, J. M. Sands, and M. E. Van Amburgh. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *J. Anim. Sci.* 82:1157-1164.
- Reynolds, C. K., and N. B. Kristensen. 2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants - an asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.* 86(E. Suppl.):E293-E305.
- Sands, J. M. 2003. Mammalian urea transporters. *Annu. Rev. Physiol.* 65:543-566.
- Steven, D. H., and A. B. Marshall. 1970. Organization of the rumen epithelium. Pages 80-100 in *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, UK.
- Stewart, G. S., C. Graham, S. Cattell, T. P. L. Smith, N. L. Simmons, and C. P. Smith. 2005. UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289:R605-R612.
- Stewart, G. S., and C. P. Smith. 2005. Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. *Nutr. Res. Rev.* 18:49-62.
- Sunny, N. E., S. L. Owens, R. L. Baldwin, VI, S. W. El-Kadi, R. A. Kohn, and B. J. Bequette. 2007. Salvage of blood urea nitrogen in sheep is highly dependent upon plasma urea concentration and the efficiency of capture within the digestive tract. *J. Anim. Sci.* 85:1006-1013.
- Wallace, R. J., K.-J. Cheng, D. Dinsdale, and E. R. Ørskov. 1979. An independent microflora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature* 279:424-426.

Potential for reduction of methane emissions from dairy cows

*Maike Johannes, Anne Louise Frydendahl Hellwing, Peter Lund, Martin Riis Weisbjerg & Torben Hvelplund
Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet*

Abstract

Methane is a gas cows naturally produce in the rumen. However, it is also a potential greenhouse gas. Therefore, there is a certain interest from an environmental point of view to reduce methane emissions from dairy cows. Estimates from earlier studies indicate that there is a potential to reduce methane production by 10 to 25% by changing the feeding strategies.

Several feedstuffs influence methane production, such as additional fat. The increase of the concentrate proportion can potentially decrease methane by decreasing the rumen degradability of the diet or by changing the rumen fermentation, while fibre and sugar enhance methane emissions. Fat can be regarded as the most promising feed additive at the moment.

At AU, respiration chambers have been installed to enable methane measurements from dairy cows combined with digestibility trials, and at present studies are being conducted concerning different forms of rapeseed supplementation (cake, seeds, and oil) in order to increase the fat content as well as different forages.

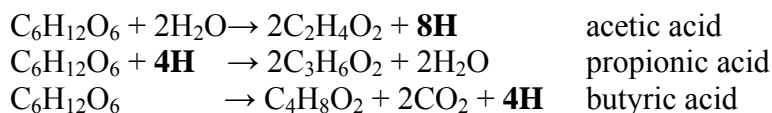
Sammendrag

Metan er en gasart, som køer naturligt producerer i vommen. Det er dog også en potentiel drivhusgas. Derfor er der også en vis miljømæssig interesse i at reducere metanudslip fra malkekøer. Beregninger fra tidligere studier tyder på, at metanproduktionen potentielt kan reduceres med 10-25 % ved at ændre fodringsstrategi. Mange fodertyper har indflydelse på metanproduktionen, f.eks. tilsætning af fedt. Forøgelse af koncentrationsforholdet kan potentielt sænke metanen ved at sænke vomnedbrydning af diæten eller ved at skifte vomfermentering, mens fibre og sukker forøger metanudslip. I øjeblikket ses fedt som den mest lovende fodertilsætning. På AU er der blevet opstillet respirationskamre for at muliggøre metanmålinger fra malkekøer. Dette kombineres med fordøjelsesforsøg. For øjeblikket laves der både forsøg med forskellige slags rapsfrøsupplementer (kage, frø, olie) for at forøge fedtindholdet og med forskellige slags foder.

Introduction

Production and excretion of methane are natural processes in ruminant animals and a result of rumen fermentation as an anaerobic process.

Cows produce methane in order to excrete surplus H^+ . During rumen fermentation, the feed carbohydrates are degraded mainly to three volatile fatty acids (VFA): Acetic acid, propionic acid and butyric acid. In this process the following three reactions take place:



The surplus H^+ from acetic and butyric acid production then reacts with CO_2 to form methane and water:



During the production of butyrate and acetate, H^+ is produced while it is used for the production of propionate. Which VFA exactly is produced depends strongly on the substrate, i.e. carbohydrate source. Fibre for instance enhances acetic acid fermentation whereas starch enhances propionic acid.

The methanogenic bacteria gain energy for growth for themselves (Boadi et al., 2004), but they also keep ruminal hydrogen pressure low which is essential for the fermenting bacteria species (Moss et al., 2000).

However, according to Bannink et al. (2005) the type of volatile fatty acid (VFA) formed from degraded organic matter (OM) is only one of three factors particularly influencing the quantity of enteric methane production since the quantity of OM degraded in the rumen and the efficiency of microbial growth also play major roles. The former factor is strongly influenced by the level of intake and the degradation characteristics (passage rate) (Monteny et al., 2006). Regarding the latter, environmental conditions in the rumen also have a major impact on the efficiency of microbial synthesis. However, this affects the rumen H_2 balance much less than the quantity of OM degraded or the type of VFA produced.

Therefore, different feed components or feeding strategies would influence one or several of the above mentioned factors. Many strategies reducing methane emission also reduce digestibility, especially of fibre. This might enhance methane emissions from the slurry since the nutrients are fermented later in the slurry tank. From the nutrition point of view, the feed utilization is decreased although this is partly counterbalanced by the decreased energy loss in methane.

Quantitative potential for reduction

The estimates of a potential reduction in earlier studies range between 10 and 25%. Beauchemin et al. (2007) reported reduced methane production by 15 % expressed on the basis of digestible energy intake when 3.3 % fat was added. Machmüller (2006) even found that energy loss via methane was reduced by 27 % in lambs and Beauchemin et al. (2008) estimated that 10 to 25 % reductions are likely to be achieved if the fat supplementation is implied in commercial practice. Jentsch et al. (2007) reviewed a 16 to 21 % decrease in methane production after adding 4 to 5 % fat to the diet. Also increasing the concentrate could reduce methane by about 20 % (Benchaar et al., 2001; Moss et al., 2000).

This is, however, quite an eager goal regarding Danish circumstances because the changes in feeding systems already brought along reduction in methane as a “side-effect”. Since changing from sugar beets to maize silage, changes in practical dairy cow feeding in Denmark during the last years led to decreases in methane emission of 10 % from 1991 to 2002 (Danfær, 2005). Estimates of reduction from the literature are often calculated for a reference value with for example forage-only feeding which means that the lower estimates of 10 to 15 % are probably more realistic.

There is probably a reduction potential when changes in nutrition take place together with activities in other fields like breeding and microbiology. Furthermore, improving milk production, feed conversion or longevity will also influence the methane emissions directly.

For the present project a careful quantification is already the first step since there is nearly no data for Danish circumstances available at present. Measurements are already necessary in order to make a quantitative statement.

Table 1: Estimates of the reduction potential

Study	Reduction	Feedstuff
Moss et al. 2000	20 %	Increasing concentrate
Benchaar et al. 2001	23 %	Starchy vs fibrous concentrate
Benchaar et al. 2001	15 %	Stage of growth of forage
Bannink et al. 2005	15 %	Increasing concentrate
Machmüller, 2006	25 %	Coconut oil
Beauchemin et al. 2007	17 %	Fat
Jentsch et al. 2007	16 – 21 %	Fat
Beauchemin et al. 2008	10 – 25 %	Fat

How to reduce emissions

In theory, there are two main ways of reducing methane emissions: First, by reducing the proportion of feed that is fermented in the rumen, i.e. reduce the rumen degradability of feedstuffs. Methane is to a major extent (87 %) produced in the rumen, so reducing rumen digestion will reduce methane. This happens for example with a high feed intake since it is connected with a high passage rate but also for particular single feedstuffs such as fat, bypass protein or starch.

The second possibility is to alter rumen fermentation. As shown in the equations above, acetic acid fermentation results in 8 mol H⁺ per mol acetic acid produced. The H⁺ has to be excreted as methane, and therefore acetic acid is the most methane enhancing, while propionic acid fermentation can be seen as an alternative H⁺ sink. To a certain extent, rumen fermentation can be altered by feeding, e.g. from fibre to starch fermentation.

If the methane production of dairy cows is expressed as CH₄/kg milk, anything increasing productivity will decrease CH₄/kg milk because the needs for maintenance are diluted. However, the production level in Denmark is quite high so further room for improvement is limited.

Various feedstuffs influence methane production by more or less influencing both rumen fermentation and the proportion of feed fermented in the rumen to a varying extent.

Feedstuffs

The different components of an ordinary dairy cow diet can already alter methane production. In the trials presently conducted we concentrate on feedstuffs used in normal dairy cow diets and vary their concentration and quality in order to quantify their effect on methane production.

Fat supplementation

Adding fat to the diet has been known to reduce methane production for a long time (e.g. Czerkawski, 1966) and is among the most promising to depress methane excretion from ruminants (Martin et al., 2008). In contrary to most other additives it also has a long-term effect (Jouany, 2008).

The effect of fat supplementation is mainly due to reduction in fermentable substrate because fatty acids are not fermented in the rumen. However, it also shifts rumen fermentation towards propionic acid because fat in the diet inhibits fibre degradation and therefore acetic acid fermentation. Furthermore, fat decreases methanogenic bacteria activity and lowers the number of ruminal protozoa.

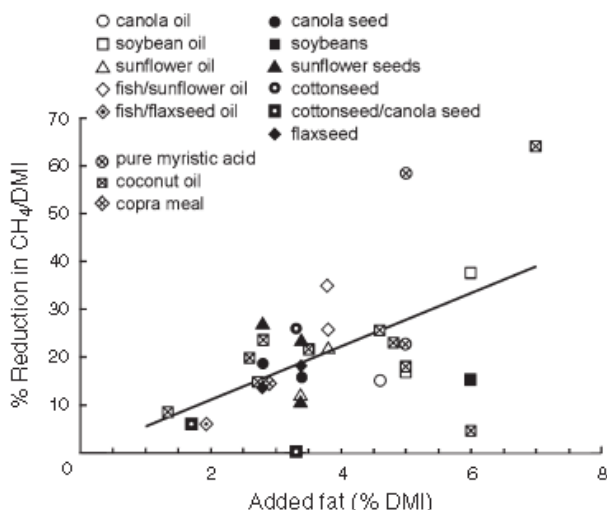


Figure 1: The effect of different sources and amounts of fat on methane production; Flaxseed = linseed
Canola = rapeseed

Especially medium-chain fatty acids (MCFA) seem effective against protozoa (Johnson and Johnson, 1995; Machmuller et al., 2000). Figure 1 shows that the extent of methane reduction depending on amount of fat and of fat source, i.e. chain length and degree of unsaturation of the fatty acids. The most effective ones according to figure 1 are the MCFA (coconut oil or pure myristic acid). This is attributed to toxicity for methanogenic bacteria and consequently MCFA also affect rumen environment in an unfavourable way as they reduce diet digestibility, especially of fibre.

Among the long chain fatty acids (LCFA) the degree of unsaturation plays an important role. Linseed for example is rich in linolenic acid (18:3) and more effective in methane reduction than sunflower or rapeseed fat (rich in 18:2 and 18:1, respectively). There are several reasons why unsaturation is so important. The higher the degree of unsaturation, the greater the effect on rumen metabolism, e.g. propionate production which is an alternative H⁺ sink (Danfær, 2005; Jentsch et al., 2007), but another effect is also the biohydrogenation of unsaturated FA. This requires H₂ and therefore less H₂ is available for methane production. However, there is evidence that only a small amount of H₂ is used for biohydrogenation (1 %) compared to the 48 % used for methane production (Johnson and Johnson, 1995). Hegarty (1999) reported that competition for H₂ alone would result in reduced methane production by 0.75 mol/mol linoleic acid provided, but in fact the suppression was greater than 2 mol/mol, so Hegarty (1999) concluded that the remaining effect was due to toxicity for rumen methanogens.

Among the long chain fatty acids (LCFA) the degree of unsaturation plays an important role. Linseed for example is rich in linolenic acid (18:3) and more effective in methane reduction than sunflower or rapeseed fat (rich in 18:2 and 18:1, respectively).

Total fat content should not exceed 6 to 7 % of dietary DM. Figure 1 shows that there is a linear decrease for methane production, but a too high fat percentage in the diet will be unhealthy for the rumen environment and also reduce intake (Beauchemin et al., 2007) since fibre degradation is depressed. Starch digestion is, however, not affected by fat supplementation (Martin et al., 2008).

Form of fat supplementation

It is not only of importance to consider the fatty acid composition when trying to reduce methane but also the physical form (oil vs seeds vs cake). According to Martin et al. (2008), it is generally thought that supplementation in the form of seeds delays the fatty acid release in the rumen and free oil might interact more rapidly with the rumen microbes. Czerkawski *et al.* (1966) reported that it could be of importance to achieve momentarily high FA concentrations in the rumen fluid rather than its constant

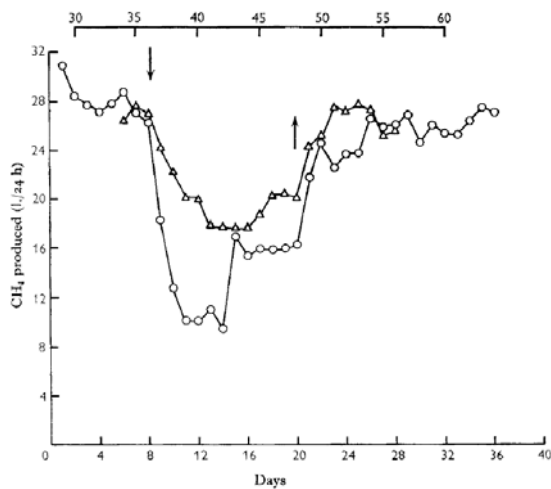


Fig 2: The effect of continuous (Δ) or rapid (○) infusion twice daily of linseed oil in sheep (Czerkawski et al. 1966). The arrows indicate start and stop of infusion

presence. This was achieved with rapid or continuous infusion, respectively, in figure 2, but the same effect could explain the difference between oil and oilseeds.

For the future, fat seems to be a potent feedstuff to reduce methane emissions. Presently, the main questions are if it is important in which physical form the fat is fed (oil, seed or cake?) and if there are interactions with other feedstuffs. For example, the forage plant should be considered as there might be stronger negative effects of fat on methane production with corn silage based diets than with hay. Further differences can be expected when comparing silages of different quality or ensiled grass and pasture. Another question is if fat supplementation affects milk quality.

Forage : Concentrate ratio

It is well established that replacing forage with non-structural carbohydrates in the form of concentrate will reduce the methane loss. There are estimates for a potential of up to 20 % (Moss et al., 2000). As a consequence of increasing starch and decreasing NDF content ruminal passage rates are reduced and microbial efficiency is decreased. This is due to two factors: Firstly, the pH is linearly reduced with the increasing proportion of concentrate (Benchaar et al., 2001). The lower rumen pH connected with starch digestion is unfavourable for methanogenic bacteria (Hegarty, 1999). Bannink et al. (2005) reported that the methane yield declined 0.1 % of GE per 0.1 unit pH.

Secondly, starch affects rumen fermentation pattern. As observed by Benchaar et al. (2001), the pH was linearly reduced and the total VFA production increased with the increasing proportion of concentrate. Acetate increased with concentrate proportion until a concentrate proportion of 50 % and decreased for higher proportions but propionate and valerate increased linearly with concentrate proportion. Thus, starch fermentation results in a high propionate production and reduction in H₂ production compared to fibre with lower methane emissions as a final consequence.

For extreme circumstances, energy losses via methane fell to 2 to 3 % of the GE intake on extreme diets in feedlots, where over 90 % grain was fed (Johnson and Johnson, 1995). However, while the inhibited methane production is a positive effect, the lower pH as well as substrate effects resulting from high starch supplementation are unfavourable for a microbial protein synthesis (Benchaar et al., 2001) and increase the risk of other malfunctions such as rumen acidosis, laminitis or fertility problems (Moss et al., 2000).

Concentrate feeding can not be generalized since feeding pattern and type of starch also play an important role. Feeding frequency, for instance, has an important impact on the rumen pH. It might not be the average pH value that is of importance but extreme values. In lactating dairy cows, feeding concentrate in 6 portions increased methane loss by 10 % (GE basis) compared to feeding only 2 portions over the day (Boadi et al., 2004).

Furthermore, it must be distinguished between different types of starch, i.e. slowly and rapidly degradable starch. According to Benchaar *et al.* (2001) replacing barley (rapidly degradable) with corn grain (slowly degradable) resulted in reduced methane losses of 16% on GE basis. The authors claim that this was more due to alteration of the rumen fibre degradation than reduction in starch fermentation, but Jentsch *et al.* (2007) reported that corn starch as a slowly degradable component also increased starch escape to the small intestine and reduced methane production by reducing the part of the feed that is fermented in the rumen. However, starch that escapes to the small intestine has to be degraded there in order to reduce methane emissions. Otherwise, it will be fermented in the large intestine (Benchaar *et al.*, 2001) or in the slurry and will also result in methane production.

Sugar

Water-soluble carbohydrates are more methanogenic than starch (Johnson and Johnson, 1995), Bannink *et al.* 2005. The methane enhancing effect of sugar is due to a more complete degradation in the rumen (Jentsch *et al.*, 2007) and the preferential production of butyrate on the expense of propionate during rumen fermentation of sugars (Hindrichsen *et al.*, 2004). However, this is only valid if the rumen pH remains on a high level. Thus, in practice sugar increases methane production only if it is supplied evenly over the whole day and if it replaces another type of supplement and not forage, i.e. in mixed diets with a high proportion of forage. Danfær (2005) reported that changes in practical dairy cow feeding in Denmark during the last years led to decreases in methane emission of 10 % from 1991 to 2002. The reason is that fodder beets (with about 70 % sugar in DM) have been more and more replaced by maize silage (with about 2 % sugar and 30 % starch in DM). Furthermore, the fibre digestion was affected by the type of rapidly degradable carbohydrate as it was higher for sucrose diets than for starch, and therefore it was assumed that the methane increasing effect of sugar was mainly due to impacts on fibre digestion (Hindrichsen and Kreuzer, 2009).

Forages

Regarding forages some differences in the methane production can be expected from different forage plants and also within one forage species with different harvest times and preservation patterns.

Regarding the forage species the differences in chemical composition result in a different methane production. Bannink *et al.* (2005) reported that maize silage is less methanogenic than grass silage which can be explained with the higher starch content in maize and other cereal silage. The starch then favours propionate production as well as an increased DMI and faster passage rate (Beauchemin *et al.*, 2008). Furthermore, increased voluntary intake will also lead to better animal performance and therefore to decreased methane emission/kg product.

Regarding legume silages the methane loss should also be lower compared to grass silage since legumes have a faster passage rate (Boadi and Wittenberg, 2002) and contain condensed tannins but less fibre than grass (Beauchemin *et al.*, 2008). Condensed tannins are secondary plant compounds that are likely to suppress methane production.

Grassland management, such as the maturity of the plants at harvest or N fertilization, influences the final product, the forage, also regarding its methanogenic properties.

Boadi and Wittenberg (2002) reported that the methane emission per kg digestible organic matter (DOM) intake increased by 25 % when forage *in vitro* organic matter digestion (IVOMD) declined by

12.2 %, and also Jouany (2008) reported that methane losses are lowest with highly-digestible diets. Mainly, high digestibility is associated with a faster passage rate (Boadi and Wittenberg, 2002). Furthermore, earlier-cut silages were fermented faster and lead to lower pH values in the rumen fluid, as Rinne et al. (1997) observed a linear increase in rumen pH from 6.17 to 6.49 when silage harvest was delayed for one month. By the same time, acetate production in the rumen increased and butyrate decreased, but propionic acid remained stable, so the glucogenic:lipogenic VFA ratio remained unchanged. However, Corbett et al. (1966) observed something different as they tested early and late season herbage in sheep and found that despite similar OM digestibility, there was a lower proportion of acetic acid and a higher proportion of propionic acid on the early-herbage diet compared to the late-herbage diet. This can be explained by the fact that the early herbage included a higher soluble carbohydrate content while the cellulose of the late herbage was digested to a greater extent.

There are certain effects of forage preservation affecting the methane production regardless of forage plant or digestibility. Chopping or pelleting of forages for instance reduce methane loss (Moss, 1994) since smaller particles require less degradation before they can leave the rumen and enable a higher intake (Benchaar et al., 2001), especially when the intake level is already high.

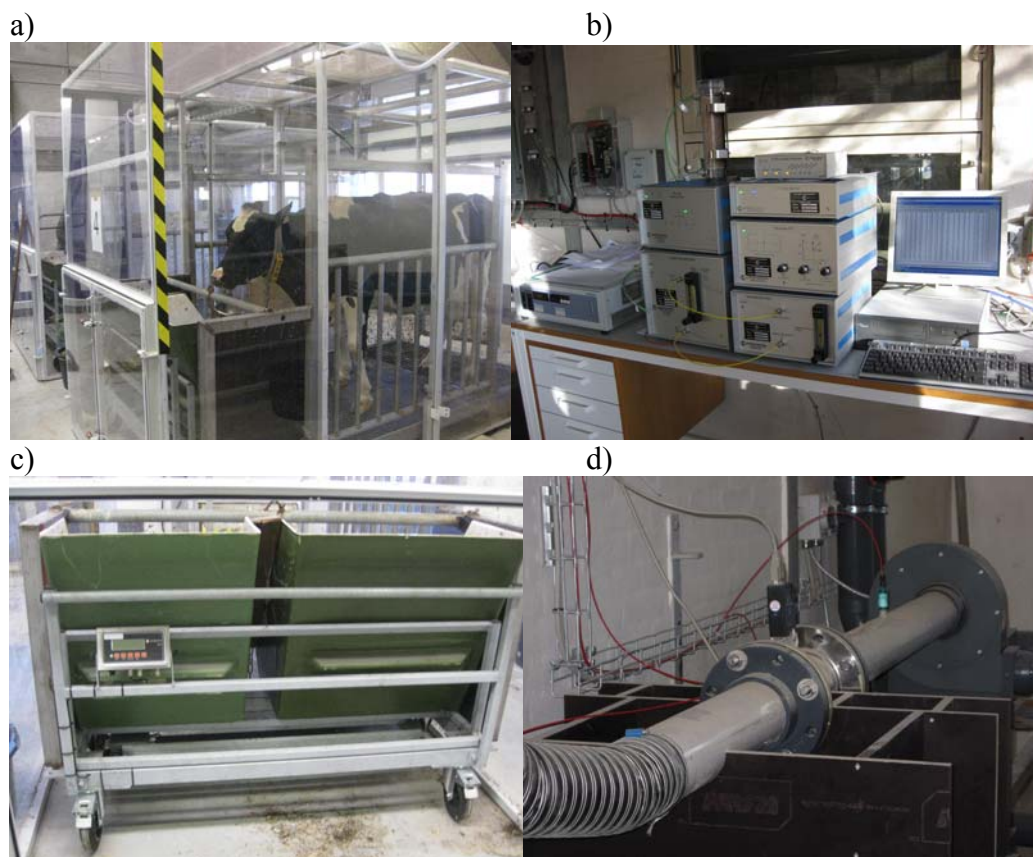
Regarding fermentation Benchaar et al. (2001) reported that on a constant DM intake there is less methane produced by animals on silage compared to hay diets because ensiled forages are already partly fermented during silage making (Boadi et al., 2004), and the sugar content is therefore much lower. However, low fermentation quality, high acetic acid content and high fibre content in the silage lead to an increased acetate concentration and acetate to propionate ratio in the rumen (Keady and Mayne, 2001). These are circumstances that are favourable for methane production. High lactic acid contents in the silage, on the other hand, result in increased propionate production in the rumen (Moss, 1994).

The silage fermentation pattern can also be affected by additives, as Boadi et al. (2004) reported that inoculant-enzyme as silage additive has greater potential to reduce methane than formic acid.

Present activities at AU:

Research in this field will be intensified in Denmark with new, adequate measuring devices available. Methane excretion can be measured in two ways: Either in respiration chambers or with a marker (SF_6). At AU, open-circuit respiration chambers were chosen because they are more precise. By now, there are four chambers installed. They are made of plastic and considered to be more animal friendly than traditional steel chambers because the cows can see and smell each other and remain in their normal surroundings since the chambers are in the same barn. The cows are less stressed and need less adaptation time but remain stable regarding feed intake and milk production.

The chambers are open at the bottom (approximately 1 to 3 cm) where air can be sucked in. The volume of the outflow air is measured and a sample is taken for analysis of air for the CO_2 , O_2 and CH_4 content. Furthermore, also the barn air is analysed so from composition of inlet air and outlet air and the flow (m^3 per hour), O_2 consumption as well as CO_2 and CH_4 production can be calculated.



Pictures: a) The chamber during measurements b) Analyze tools c) Feed and water intake are automatically recorded d) The motor for ventilation (in back), flow meter and gas sampler

The data from the analysis of air composition is transferred to a computer and can be read as an Excel spreadsheet.

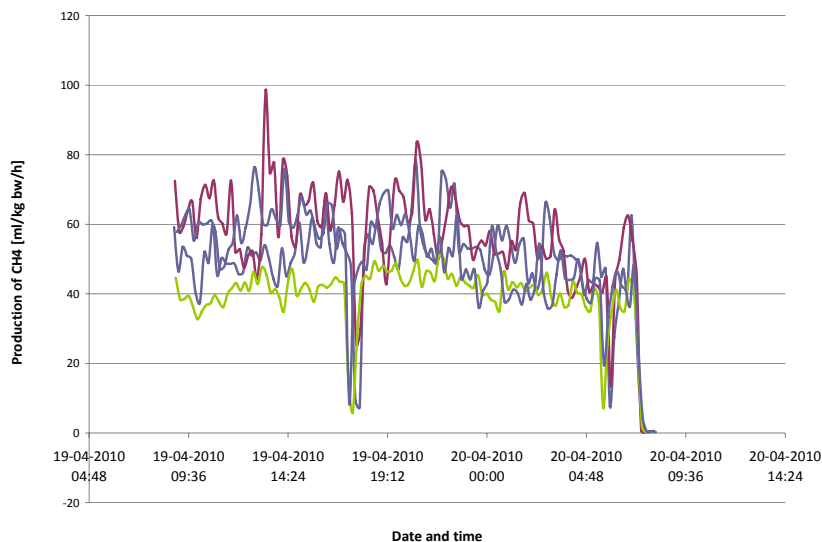
Experiments are planned on fat supplementation where different forms of rapeseed (cake, whole seeds and oil) are added to a diet in order to increase the fat content. Then, the effect of different physical forms of fat on methane production is measured. Furthermore, the trial has a digestibility part where the fistulated cows are sampled and not only the impact of fat on feed intake but also on digestibility and rumen environment can be studied.

Rapeseed was chosen even though it might – from a fatty acid composition point of view – be less effective than for example linseed or coconut oil, but it is a domestic oil plant highly used in ruminant feeding, and when the purpose is to reduce greenhouse gas emissions, long transports should also be avoided.

One of the major questions is which form of rapeseed can finally be recommended to farmers. Rapeseed cake and crushed whole seeds might be cheaper because of less processing costs, and they might also be easier to handle on the farm than oil. After looking at the different fat forms possible interactions of fat supplementation with forage are investigated as well as the methanogenic potential of the forages alone. For this purpose the most common forages are used: Maize silage and clover grass silage of different harvest times.

Moreover, the first experiment has been conducted with cows receiving TMRs based on different grass silage and with high or low concentrate supplementation. Preliminary data from that experiment show what the measurements look like.

Figure 3: Data from methane measurements of four cows over 24 hours.



Furthermore, the methanogenic potential of the feed-cow-manure chain is investigated, i.e. if reductions in enteric methane emissions might enhance emissions from slurry. On the fat topic, there is also a microbiologic approach.

Future questions

It is likely that there also are also ways of reducing methane genetically, i.e. by breeding. However, this would require scanning a large number of animals regarding their individual methane production. With the respiration chamber this would be extremely time and labour intensive, but the development of easier measurement approaches (Madsen et al., 2010) are also in progress.

Another open question is the long-term effects and the impact on the milk production. In the intensive trials with fistulated cows we can find out which diet is the least favourable in terms of methane production, but we do not know how much milk the cows can produce from the different diets, neither do we know if the reduction is permanent or whether the rumen bacteria adapt after some time and return to earlier methane levels.

Finally, the carbon footprint of whole products should be considered. Many of the methane reducing attempts have the potential to increase greenhouse gas emissions at other points of the production chain. For example, better forage quality requires more fertilizer, or higher concentrate amounts would increase grain production and transport.

Conclusions

There is a potential to reduce methane emissions from dairy cows by 10 to 15 % by changing the feeding strategy. Increasing concentrate proportion and improving forage digestibility are options for reduction as well as improving productivity of the animals (milk yield). The most promising tool seems

to be an increased fat feeding of 6 to 7 % in the diet for all cows. Therefore, different forms of rapeseed fat and its interactions with several forage types are investigated this year regarding their ability to reduce methane emissions.

References

- Bannink, A., J. Dijkstra, J. A. N. Mills, E. Kebreab, and J. France. Nutritional strategies to reduce enteric methane formation in dairy cows. 367-376. 2005. Emissions from European agriculture. Kuczynski, T edit.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:21-27.
- Beauchemin, K. A., S. M. Mcginn, and H. V. Petit. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science* 87:431-440.
- Benchaar, C., C. Pomar, and J. Chiquette. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science* 81:563-574.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84:319-335.
- Boadi, D. A. and K. M. Wittenberg. 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science* 82:201-206.
- Czerkaws, J. W., K. L. Blaxter, and F. W. Wainman. 1966. Effect of Linseed Oil and of Linseed Oil Fatty Acids Incorporated in Diet on Metabolism of Sheep. *British Journal of Nutrition* 20:485-&.
- Danfær, A. Methane emissions from dairy cows. 12-24. 2005. Arbejdsrapport fra miljøstyrelsen Nr.11 2005. Evaluering af mulige tiltag til reduction af landbrugets metanemissioner.
- Hegarty, R. S. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:1299-1305.
- Hindrichsen, I. K. and M. Kreuzer. 2009. High methanogenic potential of sucrose compared with starch at high ruminal pH. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93:61-65.
- Hindrichsen, I. K., H. R. Wettstein, A. Machmuller, C. R. Soliva, K. E. B. Knudsen, J. Madsen, and M. Kreuzer. 2004. Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. *Canadian Journal of Animal Science* 84:265-276.
- Jentsch, W., M. Schweigel, F. Weissbach, H. Scholze, W. Pitroff, and M. Derno. 2007. Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Archives of Animal Nutrition* 61:10-19.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane Emissions from Cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483-2492.
- Keady, T. W. J. and C. S. Mayne. 2001. The effects of concentrate energy source on feed intake and rumen fermentation parameters of dairy cows offered a range of grass silages. *Animal Feed Science and Technology* 90:117-129.
- Machmuller, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agriculture Ecosystems & Environment* 112:107-114.

- Machmuller, A., D. A. Ossowski, and M. Kreuzer. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Animal Feed Science and Technology* 85:41-60.
- Madsen, J., B. S. Bjerg, T. Hvelplund, M. R. Weisbjerg, and P. Lund. 2010. Methane and carbon dioxide ratio in excreted air for quantification of the methane production from ruminants. *Livestock Science* 129:223-227.
- Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science* 86:2642-2650.
- Monteny, G. J., A. Bannink, and D. Chadwick. 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agriculture Ecosystems & Environment* 112:163-170.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49:231-253.
- Rinne, M., S. Jaakkola, and P. Huhtanen. 1997. Grass maturity effects on cattle fed silage-based diets .1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science and Technology* 67:1-17.

Managing rations on the limit – monitoring dairy cows fed rations optimized to minimize emissions of phosphorus, nitrogen, and methane

Jon Moorby

Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, UK

jon.moorby@aber.ac.uk

Introduction

The production of milk is associated with significant releases of pollutants to the local environment. Diffuse and point-source pollution from dairy farms contribute significant quantities of nitrogen (as ammonia, nitrate and nitrous oxide), methane and phosphorus, leading to reductions in air and water quality, and contribute to global warming. A host of EU and global policy instruments are in place to drive a reduction in the amounts of pollutants released, including:

- EU National Emission Ceilings Directive
- The Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, in particular the Gothenburg Protocol
- EU Integrated Pollution Prevention and Control Directive
- EU Air Quality Directive
- The Kyoto Protocol
- EU Emissions Trading Scheme
- EU Nitrates Directive
- EU Water Framework Directive

Until relatively recently, increased efficiency of utilisation of feed nutrients was largely viewed as a way of increasing the output of animal products. In the last few years the impact of farming on the environment has become much more apparent and a focus of national and international policy development. Thus, reduced excretion of nitrogen (N), phosphorus (P) and energy-rich substances (particularly methane; CH₄) is a major goal not only because of the loss of productivity but also because of the release of greenhouse gases and other potential pollutants such as ammonia. Indeed, agricultural processes contribute significantly to emissions of the greenhouse gases CH₄ and nitrous oxide (N₂O), globally accounting for approximately 50% of CH₄ and 60% of N₂O emissions from anthropogenic sources (Smith et al., 2007). Livestock and livestock-related activities contribute approximately a third of CH₄ emissions (Beauchemin et al., 2008) and half of N₂O emissions (de Klein and Eckard, 2008). An increased efficiency of nutrient utilisation to promote productivity and reduced excretion are mutually compatible objectives, and the use of biomarkers to monitor dairy cow performance has a substantial role to play in these objectives.

Nitrogen

The ruminant animal has evolved to maximise the digestion of roughage through its symbiotic relationship with the rumen microbial population (Mackie, 2002). Ruminant tissue physiology is adapted to utilising volatile fatty acids produced during the fermentation of feeds. However, although energy is efficiently extracted from forages, proteins are typically used inefficiently, with a large proportion of dietary N being excreted (typically as much as 70-80% of dietary intakes in dairy cows). After freshly grazed plant material enters the rumen, and prior to extensive plant cell wall degradation, there is often a phase of rapid proteolysis which may be mediated by plant proteases. This liberates peptides and amino acids to the colonising rumen microbial population but can exceed that needed to maintain the microbes. Although the mechanisms(s) that control and

direct these plant-microbe interactions have yet to be determined, it is clear that the microbial population uses liberated forage protein breakdown products to synthesise more microbial protein, from which much of the milk protein is ultimately derived. A source of energy is needed to drive this microbial synthesis, but when protein breakdown products are present in abundance the colonising microbial population is likely to be energy limited due to the much slower rates of degradation of their main energy yielding substrates, the structural carbohydrates, cellulose and hemicellulose. Thus, it is possible that the microbial population uses protein breakdown products during initial colonisation of freshly ingested herbage both as the building blocks for new microbial biomass and as an energy source to drive microbial maintenance and synthesis. Where amino acids are used to produce energy, ammonia is produced as a waste product. Alternatively, scarcity of readily available energy during time of maximal protein degradation restricts microbial protein synthesis and only a modest proportion of the available N released from the forage protein is incorporated into microbial protein. In the two cases outlined above, ammonia accumulates and, if it is not incorporated into microbial proteins, is absorbed from the rumen. It is subsequently converted to urea in the liver (Lobley et al., 1995) and is either recycled back to the rumen or excreted as waste nitrogen in urine. This imbalance in the timing (or asynchrony) of nitrogen and energy sources in the rumen has long been considered (Figure 1; Johnson, 1976), and improving the synchrony of availability of nitrogen and energy in the rumen should theoretically improve nitrogen utilisation and reduce its excretion (Figure 2).

Figure 1. Schematic representation of the asynchrony principle in the rumen, in which forage nitrogen is quickly available but energy comes from slowly fermented sources such as cell walls. The efficiency of utilisation of rumen available nitrogen by the microbial population is therefore low (after Johnson, 1976).

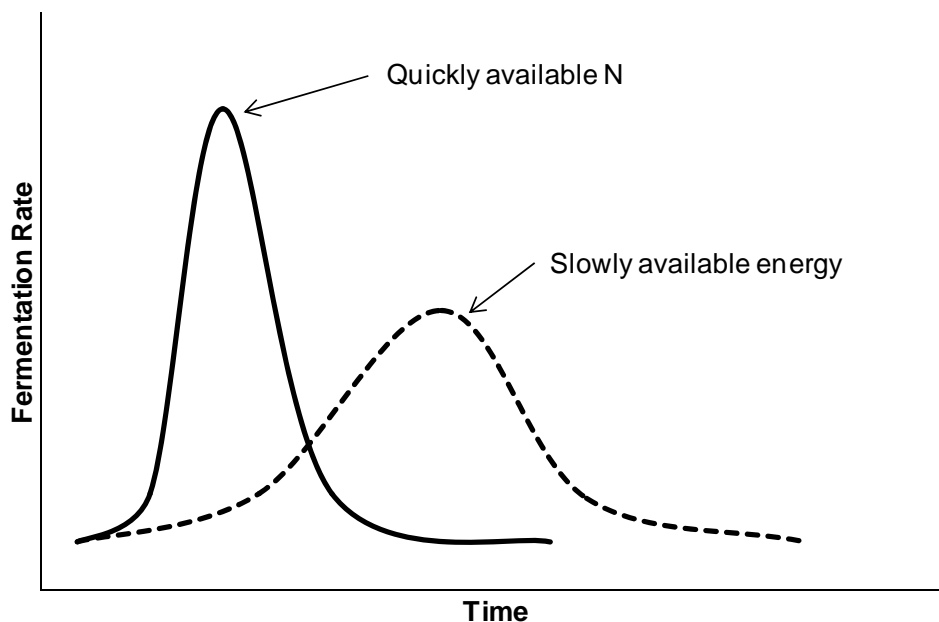
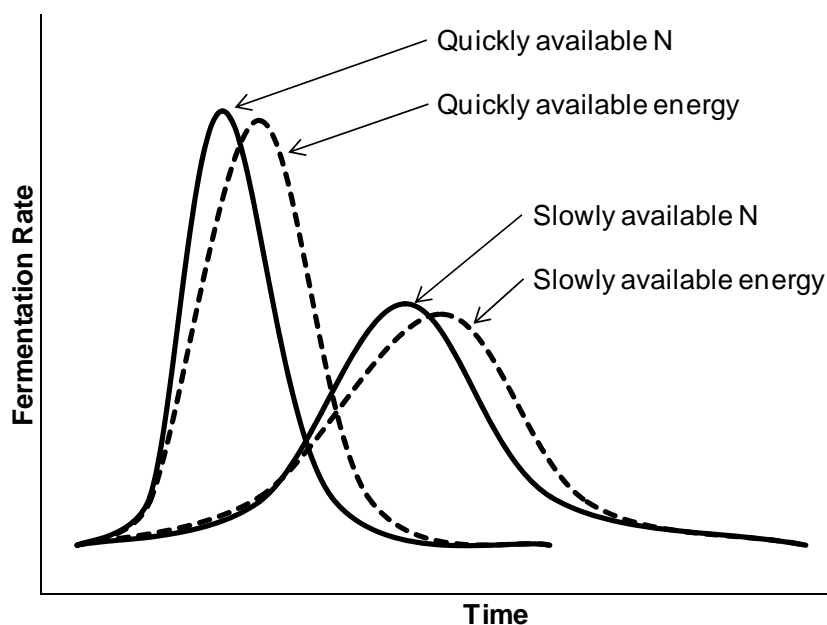


Figure 2. Schematic representation of matching availability of nitrogen and energy in the rumen to optimise the efficiency of feed utilisation.



Phosphorus

Dietary P is absorbed in ruminants in direct relation to P intake. Phosphorus is often fed to cows in excess of daily requirements, but with no beneficial effects this is a waste of a limited global resource. Concerns over the long-term availability of natural P deposits for fertiliser and feed stocks (Vaccari, 2009), in addition to the effects that excreted P can have on the eutrophication of water courses, mean that feed P supplies should be restricted to quantities that the animal requires. Most consumed P is either excreted in faeces (from the body via saliva) or secreted in milk, with relatively little being lost in urine (Morse et al., 1992). At levels of dietary intake above requirements, P can be stored in the body in soft tissues and (mainly) bone, for release at times when dietary intake is deficient (Horst, 1986).

Methane

Although ruminants are efficient at extracting energy from plant cell walls compared with monogastric animals, it has been known for a long time that the production of methane as a product of rumen fermentation is an inefficiency in the use of feed energy (Beijer, 1952). Up to 15% (although more usually less than this) of gross energy intake can be lost as a result of methane production (Van Soest and Demeyer, 1996). A number of authors have recently reviewed the effects of nutrition on methane emissions from ruminants (Boadi et al., 2004; Kebreab et al., 2006; Monteny et al., 2006; Beauchemin et al., 2008). Increasing the proportion of concentrate in the ruminant's diet is a major factor in decreasing the emissions of methane (Blaxter and Clapperton, 1965) which is driven by the chemistry of methane production by the methanogenic microbial population in the rumen and a change in the fermented substrate from fibre in forages to starch in concentrate feeds. Increasing the concentration of starch in forage diets can be achieved using

whole-crop cereals, such as maize silage and whole-crop wheat silage, although the effects of starch from ensiled cereals on methane emissions may not be as clear as the effect of feeding concentrate sources (e.g. Cammell et al., 2000). Feeding fat has long been known to reduce methane emissions (Czerkawski et al., 1966), and more recently the effects of a number of plant secondary products such as saponins and tannins have been shown to be effective at reducing methane by altering the rumen microbial population (Hess et al., 2003; Carulla et al., 2005; Ramírez-Restrepo and Barry, 2005).

Monitoring Cows

The main aim of economic milk production is efficient utilisation of resources. This implies the maximisation of conversion of feed nutrients into useful product, i.e. milk and growth (foetal or heifer), and the minimum excretion of unused nutrients. Efficient production is achieved from healthy, fertile cows, and therefore maximising animal health and enabling appropriate calving intervals is an essential part of system efficiency and productivity. However, the effect of diet on health and fertility parameters, while important, is beyond the scope of this paper. Increasing the efficiency of milk production can be achieved by reducing the input of nutrients that are included when formulating rations as an ‘insurance policy’. The short-term economic cost of including, for example, a bit more protein or phosphorus, is less than the potential reduction in milk yield that might result from inaccurate feedstuff analysis or mixing leading to nutrient supplies that are less than the animal’s requirements. In addition to this dairy cows are individuals generally fed as a group, and variation the requirements among the members of that group means that nutrients are supplied in excess to some cows and in deficit to others. An ultimate goal in modern dairy production could be real-time ration formulation for individual animals, perhaps using a common basal diet supplemented with a mixture of feeds supplied to cows based on measurements of their performance, digestive processes, and physiological status. This sort of intensive monitoring of the cow could balance a reduction of feed inputs and excretion outputs with increased productive performance.

Much of the complexity of feeding the dairy cow is a direct consequence of rumen function and the lack of nutritional precision that can be applied to ruminants compared to monogastric animals such as pigs and poultry. For both experimental and practical (on-farm) applications, there has been much work done to develop and refine the use of less- or non-invasive biomarkers of rumen fermentation and in particular the efficiency of microbial protein synthesis. The ultimate goal for such diagnostic tests is for use in commercial conditions to characterise within-animal dietary N use efficiency and methane production, to maximise diet nutrient incorporation into useful products (i.e. meat and milk) and to minimise the excretion of pollutants. A number of parameters may be monitored to help maximise the efficiency of milk production, ranging from easy-to-measure variables, such as milk yield, to more detail measurements of compounds in blood, urine and breath.

Blood analysis

In a move towards improving the precision of nutrition of dairy cows, several tests were developed in the 1960’s based on the study of blood metabolic profiles (Payne et al., 1970). While a number of blood parameters can help in the diagnosis of health problems (e.g. plasma concentrations of ketone bodies to detect ketosis; Enjalbert et al., 2001), their use in nutrition studies is limited by the body’s homeostatic mechanisms that maintain plasma concentrations of key metabolites, and the importance of measuring the flux of some metabolites rather than simple concentrations. Nevertheless, plasma concentrations of proteins such as albumin can reflect long term protein

nutrition of the animal (Moorby et al., 2000; Moorby et al., 2002). Plasma urea concentrations are correlated with ammonia uptake from the rumen (Oltner and Wiktorsson, 1983), although they have a short half-life and therefore time of sampling can significantly affect the interpretation of results. Blood phosphorus concentrations, although related to absorption from the gut (Horst, 1986), are buffered by stores in the cow, so even animals on low P diets can have seemingly normal blood concentrations for some time (Morse et al., 1992).

Blood is not an easy medium to sample routinely in a commercial environment, and other products such as excreta and milk offer more scope for experimental or even routine on-farm analysis.

Faeces analysis

Phosphorus in faeces

Faeces is easily collected, although obtaining a sample uncontaminated with feed or bedding can be a challenge on a commercial farm if not collected directly from the rectum. Determination of water-soluble inorganic P in faeces may offer a practical indication of the adequacy of dietary P supplementation. Dou et al. (2002) suggested a reference concentration of approximately 2 g/kg DM to indicate adequate P status – with higher concentrations representing oversupply. Analysis of faeces or manures (Toor et al., 2005a) can help reduce overall farm P mass surpluses, and therefore reduce potential pollutant risks from dairy farms (Toor et al., 2005b; Maguire et al., 2007; Ghebremichael et al., 2008).

Urine analysis

Purine derivatives

A key requirement of precision ration formulation for dairy cows is knowledge of the flow of microbial protein from the rumen to the small intestine. The urinary excretion of purine derivatives (PD: allantoin, uric acid, hypoxanthine, and xanthine) appears to be a reliable method to estimate the microbial N flow to the duodenum that has been used experimentally for some time. The principle is that the duodenal flow of nucleic acids and their derivatives comes mainly from the rumen microbial populations, which is to a large extent digested and absorbed in the small intestine. Purine bases (PB) are catabolised to their derivatives and excreted in urine (Topps and Elliot, 1965). Therefore, the duodenal flow of PB and consequently microbial N flow can be estimated from the quantitative excretion of PD in urine (Tas and Susenbeth, 2007). This hypothesis has been proven in our own studies (Moorby et al., 2006) where we confirmed the strong relationship ($r^2 = 0.79$) between microbial N flow at the duodenum and urinary PD excretion.

In a review of the use of PD as indicators of microbial N flow, Tas and Susenbeth (2007) discussed the use of urinary excretion of total PD excretion (i.e. the sum of xanthine, hypoxanthine, uric acid and allantoin) or using the excretion of allantoin alone (Figure 3). With high performance liquid chromatography (HPLC) methods it is possible to measure the concentrations of allantoin, xanthine, hypoxanthine and uric acid simultaneously (Balcells et al., 1992), however the allantoin peak in the chromatogram is always the biggest and is not resolved from interfering peaks. In dairy cows the proportion of allantoin in total PD excretion remains relatively constant, between 0.87 (Dewhurst et al., 1996) and 0.91 mol/mol (Vagnoni et al., 1997) although its proportion can be slightly modified by the diet (Martín-Orúe et al., 2000b) or by physiological state (Stefanon et al., 1995). As consequence of this a similar correlation was found between PB flow and allantoin excretion ($r^2 = 0.94$) as for total PD excretion ($r^2 = 0.92$) (Vagnoni et al., 1997). However, the difference in accuracy of prediction of microbial N flow with urinary excretion of allantoin and total PD needs to be determined in further research.

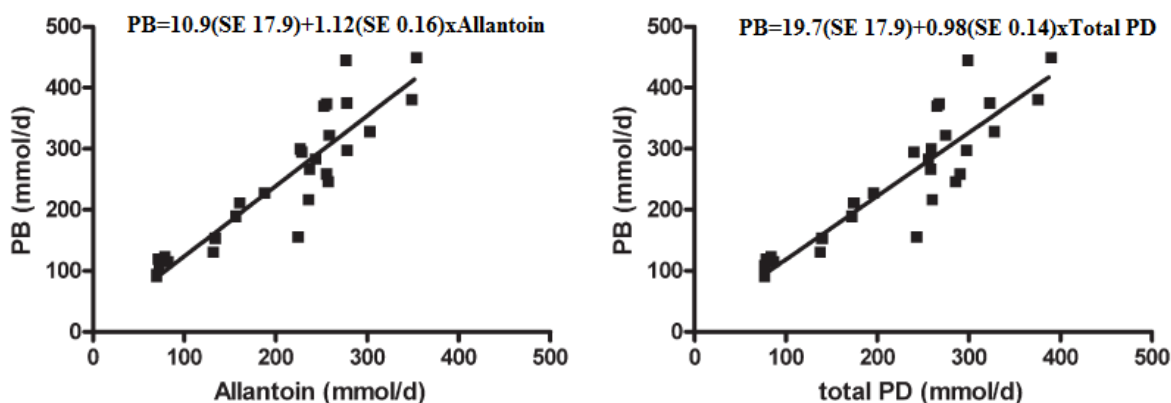


Figure 3. Relationship between duodenal purine base (PB) flow (mmol/d) and urinary excretion of allantoin or total purine derivatives (PD) (mmol/d) determined with data (30 observations) from four different studies (Martín-Orúe et al., 2000a; Orellana Boero et al., 2001; González-Ronquillo et al., 2003; González-Ronquillo et al., 2004).

By measuring the excretion of PD in urine it is possible to estimate the flow of microbial N from the rumen to the duodenum. A number of different models have been proposed, based on excretion of allantoin alone or on the excretion of all PD. Several authors (Antoniewicz et al., 1980; Sibanda et al., 1982; Giesecke et al., 1984; Fujihara et al., 1987) have published linear models of the response between the duodenal flow of nucleic acids and the urinary excretion of PD. Others have proposed non-linear models for use in cows (Verbic et al., 1990) that included the salvage of purines (re-utilisation in intestinal mucosa), considering a reuse rate of 0.25 of the endogenous PB. However, it is now known that this salvage of purines depends mainly on the activity of xanthine oxidase in intestinal mucosa, blood and liver, and this can be influenced by the physiological stage of the animal (Orellana Boero et al., 2001).

Cows have a high xanthine oxidase activity and the model of response observed differs due to the endogenous losses of purines depending on the stage of lactation. Thus, González-Ronquillo et al. (2003) proposed two different equations to estimate to relate urinary excretion of PD (y) with the duodenal flow of PB (x) depending on the level of milk production or stage of lactation:

High production of milk (early lactation):

$$y = 58.86 (\pm 3.89) + 0.56 (\pm 0.016)x \quad r^2 = 0.90 \quad \text{RSD} = 18.7$$

Medium production of milk (later lactation):

$$y = 58.86 (\pm 3.89) + 0.70 (\pm 0.046)x \quad r^2 = 0.80 \quad \text{RSD} = 44.6$$

To estimate the microbial N flow with PD it is necessary to know the daily PD excretion in urine. Therefore, an measurement of urine volume is required, and the total urine production needs to be collected and quantified from animals fitted with urethral catheters or with external urine collection devices attached. These methods are laborious, costly, may modify the behaviour of the animals, and are not applicable to either on-farm use or use in outdoor or extensive conditions. Indeed, even under experimental conditions only a small number of animals can be used for total urine collections. Several approaches have been tried in an attempt to indirectly estimate the volume of urine excreted. One example is the intake and urinary excretion of minerals (Na, K) and N (Bannink et al., 1999; Nennich et al., 2006), another is the use of milk urea N concentration (Jonker

et al., 1998; Kohn et al., 2002) and urinary N concentration. However, these prediction equations need further evaluation.

In the absence of urine volume data, it is common practice to use a volume marker against which the concentrations of other constituents can be assessed. To this end, the urinary concentration of creatinine is considered as the most accurate marker of urine volume because the rate of excretion of creatinine is relatively constant (Chizzotti et al., 2008). The accuracy of urine spot sampling depends of the diurnal variation of PD or allantoin (Chen, 1992; Chen et al., 1995), and small variations in the ratio of PD to creatinine have been observed in steers (Chen et al., 1992). However, these studies demonstrated a high correlation ($r^2=0.92$) between the estimation of PD excretion with spot sampling and total urinary recovery. Although some authors (Dewhurst et al., 1996) did not find a significant effect of sampling time on urinary PD/creatinine ratio, others (Shingfield and Offer, 1998b; J. M. Moorby, unpublished data) found large diurnal variation depending on the feeding system. The main reason of this variability was the large between-animal variation in creatinine excretion (Faichney et al., 1995; Dapoza et al., 1999), although the physiological status of the animal can also modify rate of creatinine excretion. This was demonstrated by Dapoza et al. (1999) when pregnant ewes showed a higher rate of creatinine excretion than lactating ewes, which was affected by the negative energy balance of the lactating animals coupled with the concomitant decrease in muscle mass and creatinine pool. Similar modifications in creatinine excretion can be observed in cows mobilising body/muscle mass (Susmel et al., 1995). A consequence of this is that creatinine excretion is not constant, presenting high between-animal variability that can be affected by the physiological state of the animal. Therefore, this may result in substantial errors in predicting the urinary PD or allantoin excretion using spot sampling methods.

Milk analysis

Individual cow milk yield is an easily measured parameter in suitably equipped milking parlours, and trends in milk yields beyond those expected as part of the normal lactation curve can signify a disturbance in the supply of nutrients to the mammary gland. Two parameters that have been investigated to indicate the efficiency of dietary nutrient use efficiency are milk urea concentration and milk odd- and branched-chain (OBCFA) fatty acid content. Collection of milk samples from individual animals or at a herd level from the bulk tank is a relatively trivial task compared to the collection of other biological samples, and therefore analysis of milk for biological markers of efficiency is the goal of many research activities.

Milk urea concentrations

Urea readily diffuses from blood into milk. Its concentration in milk depends on rumen metabolism, and the relative supplies of energy- and protein-yielding nutrients in the diet. Ammonia produced through protein degradation in the rumen can be used by the rumen microbial population only if the amount of readily fermentable carbohydrates is sufficient. Therefore, although milk urea can be used to evaluate the use of dietary N of dairy herds (Eicher et al., 1999; Jonker and Kohn, 2001; Jonker et al., 2002; Frand et al., 2003; Hojman et al., 2004), the meaning of specific milk urea concentrations are not easy to ascertain (Westwood et al., 1998) and are affected by many factors other than nutrition (Wattiaux et al., 2005). Physiological balance in a dairy cow is obtained with a ration containing about 14% crude protein for a daily milk yield of 20 kg (Kaufmann, 1982; Kirchgessner et al., 1985; Beening, 1993). To increase milk production, farmers often raise the protein:energy ratio of the diet resulting in an increased release of ammonia in the rumen that cannot be used by the rumen bacterial population. Much of this ammonia is absorbed by

the animal, which is converted to urea in the liver and leads to an increase in blood urea concentrations (Journet et al., 1975; Kaufmann, 1982; Oltner et al., 1985). Free urea in the blood rapidly diffuses through cell membranes and, together with some recycling back into the gut via saliva, is eliminated from the body in urine and milk. Thus, determination of milk urea nitrogen represents an alternative to its analysis in plasma or serum (Oltner and Wiktorsson, 1983; Spohr and Wiesner, 1991).

In a recent review Sederevičius et al. (2008) showed that although ammonia formation in the rumen is the main cause of the excretion of urea in milk, it is also produced by catabolism of tissue proteins and amino acids absorbed from the intestinal tract, particularly in cases when an animal receives an inadequate amount of protein or a mixture of amino acids with a relatively poor biological value. Urea is also produced by pyrimidine catabolism and may be recycled into different parts of the intestinal tract. Consequently these processes also influence the concentration of urea in milk (Westwood et al., 1998).

High milk urea N concentrations can be caused by dietary imbalances of energy and protein and by losses of endogenous amino acids. For this reasons, a high milk urea concentration is an indicator of potential milk losses in addition to risk of infertility (Arunvipas et al., 2007) and high rates of nitrogen excretion (van Duinkerken et al., 2005). Conversely, a reduced concentration of milk urea nitrogen often indicates a positive change in the ecosystem of the rumen. In this way a reduction of milk urea N from 20 to 10 mg/dL (7.1 to 3.6 mM urea N) was associated with a 13.9% increase in the probability of conception during the first service (Arunvipas et al., 2007), while decreasing from about 14 to about 12 mg/dL of milk urea N (5.0 to 4.2 mM urea N) indicated a reduction of ammonia emissions of about 12.5% (van Duinkerken et al., 2005). Similarly, low milk protein concentrations and low levels of milk production can result from limiting supplies of protein in the diet (Jonker and Kohn, 2001), and so target milk urea N concentrations are suggested to be between 8 and 12 mg/dl (2.9 to 4.3 mM urea N; Jonker and Kohn, 2001).

During recent years, several research groups have been working to develop prediction systems based on milk urea and milk protein concentrations as indicators of the protein-energy balance of the ration. Dry matter intake and forage composition tend to be responsible for the base level of milk urea concentration in a herd. However, in practical conditions the amount of concentrate feed given to animals is usually determined according to milk yield, and is thus mostly responsible for individual animal variation in milk urea concentration. Nevertheless, there are other intrinsic cow factors such as parity, milk yield, days in milk, and somatic cell counts that can modify milk urea concentrations considerably among herds (Spohr and Wiesner, 1991). This is not an issue when monitoring a ration fed within a single herd, and this evaluation scheme seems to be optimal for this purpose when prediction equations are developed for individual herds. However, for the use of these variables in studies comparing several herds, grouping the herds according to similar patterns or following a cluster analysis is recommended (Eicher et al., 1999).

Finally, milk urea N concentrations can be used to estimate urine N excretion from dairy cattle with additional knowledge of body weight (BW): urinary N excretion (g/d) = 0.026 BW (kg) × milk urea N (mg/dl) (Kauffman and St-Pierre, 2001). Burgos et al. (2007) also found a good correlation between milk and urine urea concentrations, particularly at low milk urea concentrations, and suggested the use of milk urea as a tool to predict ammonia-N losses from dairy farms.

Milk OBCFA secretion

Odd- and branched-chain fatty acids (OBCFA) are trace components in most ingredients used in ruminant diets (Diedrich and Henschel., 1990), but are relatively abundant in milk of cows (Polidori et al., 1993) and other animals that benefit from of symbiotic gut fermentation (Käkelä et al., 1996). The reason for this is that OBCFA are present in, and are characteristic of, bacterial cell membrane lipids (Lechevalier, 1989). Thus, because lipids from rumen bacterial membranes are the main source of OBCFA in ruminant milk (Kaneda, 1991; Mackie et al., 1991), the concentrations of C15:0 and C17:0 in human adipose tissue (Wolk et al., 1998) and serum (Smedman et al., 1999) have been used to predict the consumption of ruminant products by humans and their possible negative effects for health.

Nearly five decades ago Keeney et al. (1962) suggested using OBCFA as potential microbial markers to quantify bacterial matter leaving the rumen. However, it is only relatively recently, because of the increasing need to obtain a suitable and non-invasive method to predict the rumen microbial synthesis in on-farm conditions, that research has intensified in this area. For example, recent studies have used OBCFA to investigate the microbial colonization of ingested grass (Kim et al., 2005), the microbial composition of digesta reaching the small intestine (Vlaeminck et al., 2006b; 2007), and to predict rumen fermentation and volatile fatty acid production (Vlaeminck et al., 2006c; Craninx et al., 2008).

Several studies have shown that the secretion of odd-chain *anteiso* fatty acids into milk was higher than that of their corresponding duodenal flows, suggesting possible endogenous *de novo* synthesis in the mammary gland or other cow tissues, or release of OBCFA from fat stores at certain times of the lactation cycle (e.g. in early lactation). Also, higher concentrations of linear odd-chain fatty acids (C17:1) in milk compared with blood plasma have been observed (Kay et al., 2005; Loor et al., 2005), so this fatty acid must also be synthesised in the udder (Fievez et al., 2003). However, a substantial part of the remainder of the OBCFA in milk fat are derived from incorporation of OBCFA from rumen bacterial lipids, suggesting only minor endogenous contributions.

Recent studies have shown that the duodenal flow of microbial N is closely correlated with milk secretion of OBCFA (Figure 4). Research has also shown that measurements of milk OBCFA allowed relatively accurate predictions of rumen proportions of volatile fatty acids (Vlaeminck et al., 2004).

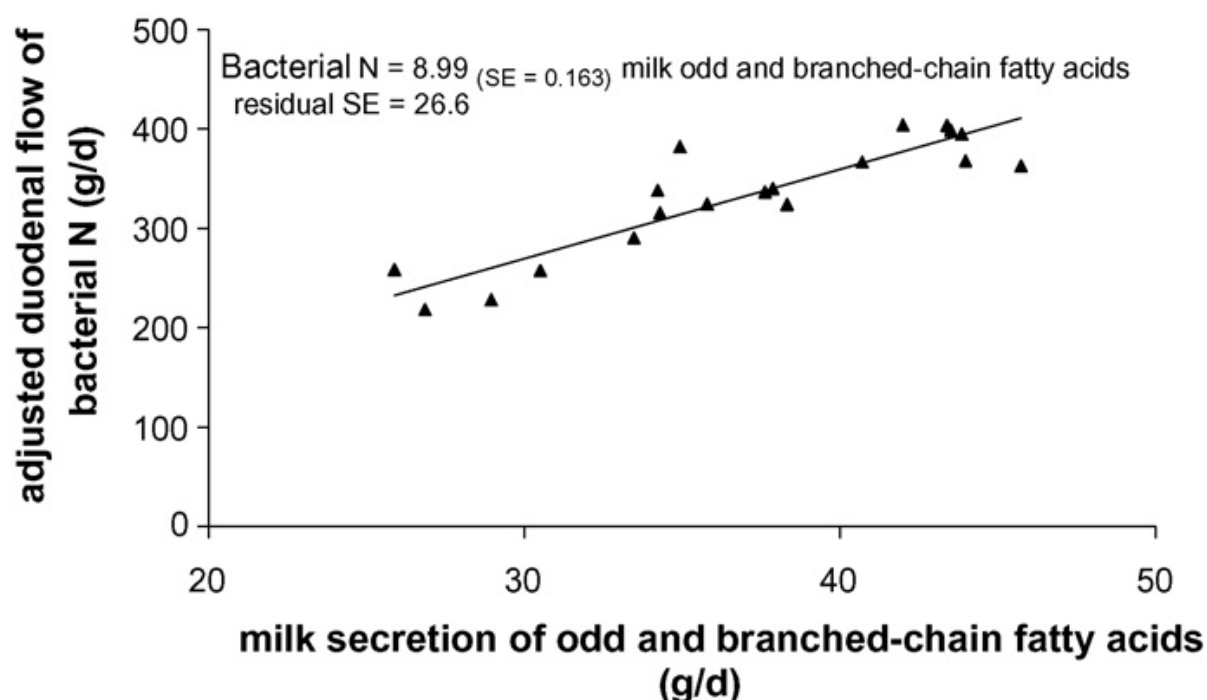


Figure 4. Relationship between milk secretion of odd- and branched-chain fatty acids and duodenal flow of microbial N (data from Cabrita et al., 2003; Dewhurst et al., 2003; Vlaeminck et al., 2005).

The slope of the regression line in Figure 4 suggests that the ratio of OBCFA:N in mixed rumen bacteria is 0.111. An interesting aspect is that this varies only little with the microbial extract being considered (i.e. slopes of 0.096 and 0.090 for LAB or SAB respectively; Vlaeminck et al., 2006a) compared to other N:microbial marker ratios. The relationship between duodenal flow of microbial N and milk secretion of OBCFA in milk confirms the potential use of OBCFA as an indirect marker of microbial protein synthesis in non-fistulated dairy cows. However, additional studies are needed to validate and develop accurate prediction equations and to identify factors that contribute to variation in OBCFA secretion in milk.

Milk purine derivative excretion

Although urinary excretion of PD is useful in an experimental situation, urine samples from livestock are not practical for diagnostic purposes in an on-farm situation because they are not immediately accessible and total collections of urine are impossible. Spot samples of urine are marginally easier to collect, although their use, including the use of an internal volume marker such as creatinine, introduces additional error (Van Niekerle et al., 1963). Consequently, alternative sample media, such as milk, have been investigated. Milk in particular is easy to collect, is typically associated with yield information, and collection can be scaled up to a whole-farm level. The concentration of allantoin in milk has been shown to be closely correlated with blood plasma concentrations (Roskopf and Giesecke, 1992). On the other hand, the concentration of uric acid in milk was higher than in plasma, a phenomenon that was attributed to purine catabolism to uric acid (but not allantoin) in the mammary gland (Giesecke et al., 1994). Consequently, the uric acid concentration in milk is not a suitable microbial marker of rumen microbial synthesis (Timmermans et al., 2000).

Several authors (Giesecke et al., 1994; Gonda and Lindberg, 1994; Timmons et al., 2001) have observed a positive relationship between milk allantoin excretion (mmol/d) and dry matter intake,

net energy intake, proportion of concentrate in the diet, and with milk yield (González-Ronquillo et al., 2003). Conversely, excretion of milk allantoin was poorly correlated with estimated microbial N flow ($r^2 = 0.09$; Shingfield and Offer, 1998a; Timmermans et al., 2000).

Purine derivative excretion in milk represents between 0.03 and 0.019 mol/mol of urinary or total PD excretion respectively. However, the partitioning between urinary and non-urinary excretion of PD can be affected by endogenous secretions at different stages of lactation (Johnson et al., 1998; González-Ronquillo et al., 2003). In any event, the secretion of PD in milk can only explain a small part of incomplete urinary recovery (Giesecke et al., 1994; Gonda and Lindberg, 1994; Dewhurst et al., 1996).

The two factors of the low rate of allantoin excretion in milk and the strong positive correlation between milk allantoin secretion and milk yield, both lead to the conclusion that this method is not a suitable indicator to estimate duodenal microbial N flow in ruminants.

Breath analysis

Gases expelled from the mouth and nose of the cow ('breath') include a mixture from the lungs and from the rumen headspace. The composition of this gaseous mixture, which is approximately 75% carbon dioxide, 22% methane, 2% N₂, and a small proportion of other volatile compounds (Moate et al., 1997), can be indicative of rumen fermentation processes. Automated analysis of breath by gas sensors (and 'electronic nose' technology; Gardner et al., 1999; Llobet et al., 1999) built into milking parlours or feeders offers an attractive non-invasive assessment of dairy cow performance.

Sulphur compounds

Dewhurst et al. (2001) found a positive relationship between the appearance of sulphur-containing compounds (hydrogen sulphide, methyl sulphide, and dimethyl sulphide) in rumen headspace gas and ammonia concentrations in rumen liquor, and hypothesised that the measurement of these compounds in cow breath may be diagnostic of rumen processes, and particularly of rumen protein utilisation. Dewhurst et al. (2004) studied the relationship between rumen proteolysis and concentration of hydrogen sulphide in rumen head-space gas. Their aim was to detect sulphides that, like ammonia, are products of the rumen proteolysis of sulphur amino acids (methionine and cysteine; Hungate, 1966). The relationship between bacterial production of sulphides and proteolysis has been well studied in other fields such as flavour development by cheese bacteria (Bonnarme et al., 2000) and in the process of ulcerative colitis in humans (Magee et al., 2000). Using *in vitro* techniques, Dewhurst et al. (2004) confirmed increasing concentrations (by 10 to 20 times) of hydrogen sulphide in the head-space gas when cysteine and methionine were added in the diet. However, sulphides have a short half-life in the rumen (10-15 minutes; Bray and Till, 1975) suggesting that proteolysis in the rumen is a very quick process that could explain the low levels of microbial synthesis in diets with a high proportion of quickly degradable protein and slowly degradable carbohydrates. Use of hydrogen sulphides has also been used to follow the pattern of proteolysis of different grass species, grass treatments (i.e. silage, hay), and other factors. When feeding a variety of fresh forages, Dewhurst et al. (2007) showed that that the physical and chemical properties of the forage had a major effect on the evolution of hydrogen sulphide. Thus, more development work is necessary to understand the potential use and application of rumen gases (and particularly hydrogen sulphide) to monitor rumen fermentation and predict microbial protein synthesis.

Methane

Methane produced by the dairy cows is a by-product of enteric fermentation in the rumen and in the large intestine. However, much of the methane produced in the hind gut is absorbed and released from the lungs, meaning that approximately 95% of methane produced from comes out of the animal's mouth and nose having been eructated and respired.

A host of nutritional management regimes are known to affect methane emissions from ruminants, including increasing the amount of starch and oils in the diet, the use of ionophores (currently banned in the EU), and supplementation with saponins, tannins, and various yeast cultures (Boadi et al., 2004; Beauchemin et al., 2008). Because methane emissions represent a loss of energy from the animal, factors which reduce methane emissions should improve the supply of energy for milk production, so long as diet digestibility is not compromised (e.g. Beauchemin et al., 2009).

Methane output is generally measured using a chamber technique, in which all gaseous emissions are collected from an enclosed animal (Johnson and Johnson, 1995), or estimated using a tracer method such as the sulphur hexafluoride (SF₆) technique (Johnson et al., 1994). However, neither methods are practical for on-farm application, requiring skilled operation and expensive analytical equipment. More recent approaches, currently being developed, include the use of methane 'sniffers' that sample the animals breath during feeding or milking (e.g. Defra project AC0219 at Nottingham University). Intermittent measurements of methane concentrations in breath can be used in a model to estimate total daily emissions from dairy cows.

Direct rumen measurements

Analysis of urine, milk or breath, as outlined above, aims to estimate parameters associated with rumen fermentation that indicate nutrient use efficiency. Direct analysis of rumen function parameters such as pH and ammonia concentrations can be achieved in fistulated animals, but this is not practical in commercial situations. However, electronic boluses that measure variables such as pH, temperature, pressure and redox potential, and transmit the data wirelessly to a remote logging station are produced by companies such as Kahne Animal Health (www.kahneanimalhealth.com) and eCow (www.ecow.co.uk). Data can be logged by the bolus and transmitted when near a receiver (e.g. in a milking parlour). Current limitations in battery life and sensor technology limit the current usefulness of such electronic boluses. However, future development of boluses that enable measurement of parameters variables such as rumen ammonia and methane concentrations has huge potential to help refine dairy cow diets to reduce pollutant emissions.

Metabolomic analysis of biological fluids

Research is currently underway as part of the REDNEX EU project to generate and evaluate novel biomarkers of dairy cow efficiency, specifically to reduce N excretion rates. Metabolomic fingerprinting or metabolite profiling (e.g. Schauer et al., 2005) of blood, milk and urine by techniques such as nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry are being used to search for correlations between sample composition and duodenal protein flow, rumen N use efficiency, and other parameters. The metabolome of a sample – that is, the collection of metabolites – is measured to generate an information-rich spectrum or chromatogram, which is correlated using a variety of statistical methods with known information, such as microbial protein flow, efficiency of organic matter digestion in the rumen, or amino acid absorption. One or more metabolites may act as proxy markers of the required information, either using specific concentrations or in relative concentrations to other markers. Ultimately, if the identity of specific

biomarkers can be determined, more targeted and less expensive methods of analysis, which may include online analysis of milk samples, for example, are the overall goal of the project. These analyses could be carried out on-farm to help feedback information to a farmer on the efficiency of the nutrition of the dairy cow, to reduce nutrient input requirements and therefore reduce excretion product outputs.

Summary

The detrimental effect of dairy farming on the environment is a huge political and social problem, and dairy farmers have a responsibility to reduce the amount of pollutants that their farms emit. Precision ration formulation can be helped by information generated from biomarkers in media such as blood, urine, milk and breath. Some markers, such as purine derivatives in urine offer detailed information in experimental situations, while others such as milk urea are already used routinely by some dairy farmers. Technology is currently developing to enable the routine measurement of breath for methane emissions, and this may extend to intra-ruminal devices for direct measurements of rumen function. Research is also ongoing to discover new biomarkers that can be used for routine analysis of dairy cow outputs that could lead to real-time ration formulation, precisely formulating diets tailored to individual animal needs to maximise the efficiency of milk production and minimise excretion product outputs.

References

- Antoniewicz, A. M., W. W. Heinemann, and E. M. Hanks. 1980. The effect of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 95:395-400.
- Arunvipas, P., J. A. Van Leeuwen, I. R. Dohoo, E. R. Leger, G. P. Keefe, A. S. Burton, and K. D. Lissemore. 2007. Milk urea-nitrogen negatively affected first-service breeding success in commercial dairy cows in Prince Edward Island, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 82:42-50.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 575:153-157.
- Bannink, A., H. Valk, and A. M. VanVuuren. 1999. Intake and excretion of sodium, potassium, and nitrogen and the effects on urine production by lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82:1008-1018.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:21-27.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, C. Benchaar, and L. Holtshausen. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* 92:2118-2127.
- Beening, J. 1993. Detection of suboptimal feeding of cows using milk constituents. *Untersuchungen zur Erkennung suboptimaler Fütterung von Kühen anhand von Milchhaltsstoffen.*:171 pp.
- Beijer, W. H. 1952. Methane Fermentation in the Rumen of Cattle. *Nature* 170:576-577.
- Blaxter, K. L. and J. L. Clapperton. 1965. Prediction of amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition* 19:511-522.

- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84:319-335.
- Bonnarne, P., L. Psoni, and H. Spinnler. 2000. Diversity of L-Methionine Catabolism Pathways in Cheese-Ripening Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5514-5517.
- Bray, A. C. and A. R. Till. 1975. Metabolism of sulphur in the gastro-intestinal tract. Pages 243-260 in: *Digestion and Metabolism in the Ruminant* I. W. P. McDonald and A. C. I. Warner (eds). University of New England Publishing Unit, Armidale, New South Wales, Australia.
- Burgos, S. A., J. G. Fadel, and E. J. DePeters. 2007. Prediction of Ammonia Emission from Dairy Cattle Manure Based on Milk Urea Nitrogen: Relation of Milk Urea Nitrogen to Urine Urea Nitrogen Excretion. *Journal of Dairy Science* 90:5499-5508.
- Cabrita, A. R. J., A. J. M. Fonseca, R. J. Dewhurst, and E. Gomes. 2003. Nitrogen supplementation of corn silages. 2. Assessing rumen function using fatty acid profiles of bovine milk. *Journal of Dairy Science* 86:4020-4032.
- Cammell, S. B., J. D. Sutton, D. E. Beever, D. J. Humphries, and R. H. Phipps. 2000. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows 1. Energy and nitrogen utilization. *Animal Science* 71:381-390.
- Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmuller, and H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 56:961-970.
- Chen, X., Grubic, G., Ørskov, ER, and Osuji, P. 1992. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Production* 55:185-191.
- Chen, X. B., G. Grubic, E. R. Ørskov, and P. Osuji. 1992. Effect of feeding frequency on diurnal-variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Animal Production* 55:185-191.
- Chen, X. B., A. T. Mejia, D. J. Kyle, and E. R. Orskov. 1995. Evaluation of the Use of the Purine Derivative-Creatinine Ratio in Spot Urine and Plasma Samples As an Index of Microbial Protein Supply in Ruminants - Studies in Sheep. *Journal of Agricultural Science* 125:137-143.
- Chizzotti, M. L., S. d. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, F. H. M. Chizzotti, and L. O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science* 113:218-225.
- Craninx, M., V. Fievez, B. Vlaeminck, and B. De Baets. 2008. Artificial neural network models of the rumen fermentation pattern in dairy cattle. *Computers and Electronics in Agriculture* 60:226-238.
- Czerkawski, J. W., K. L. Blaxter, and F. W. Wainman. 1966. The effect of linseed oil and of linseed oil fatty acids incorporated in the diet on the metabolism of sheep. *British Journal of Nutrition* 20:485-494.
- Dapoza, C., C. Castrillo, J. Balcells, S. MartinOrue, and J. A. Guada. 1999. On the variation of urinary excretion of creatinine and purine derivatives in pregnant and lactating ewes given diets with different protein contents. *Animal Science* 68:555-566.
- de Klein, C. A. M. and R. J. Eckard. 2008. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:14-20.
- Dewhurst, R. J., R. T. Evans, T. T. Mottram, P. Španel, and D. Smith. 2001. Assessment of rumen processes by selected-ion-flow-tube mass spectrometric analysis of rumen gases. *Journal of Dairy Science* 84:1438-1444.
- Dewhurst, R. J., W. J. Fisher, J. K. S. Tweed, and R. J. Wilkins. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science* 86:2598-2611.

- Dewhurst, R. J., L. J. Harris, and R. T. Evans. 2004. Factors affecting the concentration of hydrogen sulfide in the rumen gas of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87:52-52.
- Dewhurst, R. J., E. J. Kim, R. T. Evans, A. R. J. Cabrita, and A. J. M. Fonseca. 2007. Effects of dietary sulphur sources on concentrations of hydrogen sulphide in the rumen head-space gas of dairy cows. *Animal* 1:531-535.
- Dewhurst, R. J., A. M. Mitton, N. W. Offer, and C. Thomas. 1996. Effects of the composition of grass silages on milk production and nitrogen utilization by dairy cows. *Animal Science* 62:25-34.
- Diedrich, M. and K. P. Henschel. 1990. The natural occurrence of unusual fatty acids. 1. Odd numbered fatty acids. *Nahrung* 34.
- Dou, Z., K. F. Knowlton, R. A. Kohn, Z. Wu, L. D. Satter, G. Zhang, J. D. Toth, and J. D. Ferguson. 2002. Phosphorus Characteristics of Dairy Feces Affected by Diets. *Journal of Environmental Quality* 31:2058-2065.
- Eicher, R., E. Bouchard, and M. Bigras-Poulin. 1999. Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 39:53-63.
- Enjalbert, F., M. C. Nicot, C. Baourthe, and R. Moncoulon. 2001. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 84:583-589.
- Faichney, G. J., R. J. Welch, and G. H. Brown. 1995. Prediction of the Excretion of Allantoin and Total Purine Derivatives By Sheep From the Creatinine Coefficients. *Journal of Agricultural Science* 125:425-428.
- Fievez, V., B. Vlaeminck, M. S. Dhanoa, and R. J. Dewhurst. 2003. Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acids in milk. *Journal of Dairy Science* 86:4047-4053.
- Frاند, X., E. Froidmont, N. Bartiaux-Thill, V. Decruyenaere, A. Van Reusel, and J. Fabry. 2003. Utilization of milk urea concentration as a tool to evaluate dairy herd management. *Animal Research* 52:543-551.
- Fujihara, T., E. R. Orskov, P. J. Reeds, and D. J. Kyle. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 109:7-12.
- Gardner, J. W., E. L. Hines, F. Molinier, P. N. Bartlett, and T. T. Mottram. 1999. Prediction of health of dairy cattle from breath samples using neural network with parametric model of dynamic response of array of semiconducting gas sensors. *Iee Proceedings-Science Measurement and Technology* 146:102-106.
- Ghebremichael, L. T., T. L. Veith, J. M. Hamlett, and W. J. Gburek. 2008. Precision feeding and forage management effects on phosphorus loss modeled at a watershed scale. *Journal of Soil and Water Conservation* 63:280-291.
- Giesecke, D., L. Ehrentreich, M. Stangassinger, and A. F. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77:2376-2381.
- Giesecke, D., M. Stangassinger, and W. Tiemeyer. 1984. Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusions. *Canadian Journal of Animal Science* 64:144-145.
- Gonda, H. L. and J. E. Lindberg. 1994. Evaluation of Dietary Nitrogen Utilization in Dairy Cows Based On Urea Concentrations in Blood, Urine and Milk, and On Urinary Concentration of Purine Derivatives. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* 44:236-245.

- González-Ronquillo, M., J. Balcells, A. Belenguer, C. Castrillo, and M. Mota. 2004. A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87:2211-2221.
- González-Ronquillo, M., J. Balcells, J. A. Guada, and F. Vicente. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *Journal of Dairy Science* 86:1282-1291.
- Hess, H. D., M. Kreuzer, T. E. Diaz, C. E. Lascano, J. E. Carulla, C. R. Soliva, and A. Machmuller. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109:79-94.
- Hojman, D., O. Kroll, G. Adin, M. Gips, B. Hanochi, and E. Ezra. 2004. Relationships between milk urea and production, nutrition, and fertility traits in Israeli dairy herds. *Journal of Dairy Science* 87:1001-1011.
- Horst, R. L. 1986. Regulation of Calcium and Phosphorus Homeostasis in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* 69:604-616.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- Johnson, K. A., M. Huyler, H. H. Westberg, B. Lamb, and P. R. Zimmerman. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* 28:359-362.
- Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane Emissions from Cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483-2492.
- Johnson, L. M., J. H. Harrison, and R. E. Riley. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. *Journal of Dairy Science* 81:2408-2420.
- Johnson, R. R. 1976. Influence of Carbohydrate Solubility on Non-Protein Nitrogen Utilization in Ruminant. *Journal of Animal Science* 43:184-191.
- Jonker, J. S. and R. A. Kohn. 2001. Using milk urea nitrogen to evaluate diet formulation and environmental impact on dairy farms. *TheScientificWorld 1 Suppl 2*:852-859.
- Jonker, J. S., R. A. Kohn, and R. A. Erdman. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81:2681-2692.
- Jonker, J. S., R. A. Kohn, and J. High. 2002. Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets. *Journal of Dairy Science* 85:939-946.
- Journet, M., R. Verite, and B. Vignon. 1975. Non-protein nitrogen in milk: factors of variation. *Lait* 55:212-223.
- Käkelä, R., H. Hyvärinen, and P. Vainiotalo. 1996. Unusual fatty-acids in the depot fat of the Canadian beaver (*Castor canadensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 113:625-629.
- Kaneda, T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55:288-302.
- Kauffman, A. J. and N. R. St-Pierre. 2001. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 84:2284-2294.
- Kaufmann, W. 1982. Variation in composition of the raw-material milk with special regard to the urea content. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 37:6-9.
- Kay, J. K., E. S. Kolver, N. A. Thomson, J. R. Roche, and L. H. Baumgard. 2005. The effect of Vitamin E supplementation on production and fatty acid profiles. *Journal of Dairy Research* 72:1-11.

- Kebreab, E., K. Clark, C. Wagner-Riddle, and J. France. 2006. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 86:135-158.
- Keeney, M., I. Katz, and M. J. Allison. 1962. On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 39:198-201.
- Kim, E. J., R. Sanderson, M. S. Dhanoa, and R. J. Dewhurst. 2005. Fatty acid profiles associated with microbial colonization of freshly ingested grass and rumen biohydrogenation. *Journal of Dairy Science* 88:3220-3230.
- Kirchgessner, M., D. A. Roth-Maier, and G. Rohmoser. 1985. Urea contents in milk of cows with energy and protein restriction and subsequent realimentation. *Zeitschrift fur Tierphysiologie Tierernahrung und Futtermittelkunde - Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 53:141-151.
- Kohn, R. A., K. F. Kalscheur, and E. Russek-Cohen. 2002. Evaluation of models to estimate urinary nitrogen and expected milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science* 85:227-233.
- Lechevalier, M. P. 1989. Lipids in bacterial taxonomy. Pages 455-561 in: *Practical handbook of microbiology*. W. M. O'Leary (ed). CRC, Boca Raton, Florida, USA.
- Llobet, E., E. L. Hines, J. W. Gardner, P. N. Bartlett, and T. T. Mottram. 1999. Fuzzy ARTMAP based electronic nose data analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical* 61:183-190.
- Lobley, G. E., A. Connell, M. A. Lomax, D. S. Brown, E. Milne, A. G. Calder, and D. A. H. Farningham. 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition* 73:667-685.
- Loor, J. J., M. Doreau, J. M. Chardigny, A. Ollier, J. L. Sebedio, and Y. Chilliard. 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of trans-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 119:227-246.
- Mackie, R. I. 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integrative and Comparative Biology* 42:319-326.
- Mackie, R. I., B. A. White, and M. P. Bryant. 1991. Lipid metabolism in anaerobic ecosystems. *Critical Reviews in Microbiology* 17:449-479.
- Magee, E. A., C. J. Richardson, R. Hughes, and J. H. Cummings. 2000. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 72:1488-1494.
- Maguire, R. O., D. A. Crouse, and S. C. Hodges. 2007. Diet modification to reduce phosphorus surpluses: A mass balance approach. *Journal of Environmental Quality* 36:1235-1240.
- Martín-Orúe, S. M., J. Balcells, J. A. Guada, and M. Fondevila. 2000a. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures. *Animal Feed Science and Technology* 88:171-188.
- Martín-Orúe, S. M., J. Balcells, F. Vicente, and C. Castrillo. 2000b. Influence of dietary rumen-degradable protein supply on rumen characteristics and carbohydrate fermentation in beef cattle offered high-grain diets. *Animal Feed Science and Technology* 88:59-77.
- Moate, P. J., T. Clarke, L. H. Davis, and R. H. Laby. 1997. Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *Journal of Agricultural Science* 129:459-469.
- Monteny, G. J., A. Bannink, and D. Chadwick. 2006. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agriculture Ecosystems & Environment* 112:163-170.
- Moorby, J. M., R. J. Dewhurst, R. T. Evans, and J. L. Danelon. 2006. Effects of dairy cow diet forage proportion on duodenal nutrient supply and urinary purine derivative excretion. *Journal of Dairy Science* 89:3552-3562.

- Moorby, J. M., R. J. Dewhurst, R. T. Evans, and W. J. Fisher. 2002. Effects of level of concentrate feeding during the second gestation of Holstein-Friesian dairy cows. 2. Nitrogen balance and plasma metabolites. *Journal of Dairy Science* 85:178-189.
- Moorby, J. M., R. J. Dewhurst, J. K. S. Tweed, M. S. Dhanoa, and N. F. G. Beck. 2000. Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science* 83:1795-1805.
- Morse, D., H. H. Head, C. J. Wilcox, H. H. Van Horn, C. D. Hissem, and B. Harris, Jr. 1992. Effects of Concentration of Dietary Phosphorus on Amount and Route of Excretion. *Journal of Dairy Science* 75:3039-3049.
- Nennich, T. D., J. H. Harrison, L. M. VanWieringen, N. R. St-Pierre, R. L. Kincaid, M. A. Wattiaux, D. L. Davidson, and E. Block. 2006. Prediction and evaluation of urine and urinary nitrogen and mineral excretion from dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89:353-364.
- Oltner, R., M. Emanuelson, and H. Wiktorsson. 1985. Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livestock Production Science* 12:401-407.
- Oltner, R. and H. Wiktorsson. 1983. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. *Livestock Production Science* 10:457-467.
- Orellana Boero, P., J. Balcells, S. M. Martín-Orúe, J. B. Liang, and J. A. Guada. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science* 68:243-250.
- Payne, J. M., S. M. Dew, R. Manston, and M. Faulks. 1970. The use of a metabolic profile test in dairy herds. *Veterinary Record* 87:150-158.
- Polidori, P., G. L. Maggi, V. M. Moretti, F. Valfre, and P. Navarotto. 1993. A note on the effect of the use of bovine somatotrophin on the fatty acid composition of the milk fat in dairy cows. *Animal Production* 57:319-322.
- Ramírez-Restrepo, C. A. and T. N. Barry. 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120:179-201.
- Roskopf, R. and D. Giesecke. 1992. Untersuchungen an Kühen über den Einfluß der Energieaufnahme auf den Pansenstoffwechsellmittles der Allantoinausscheidung in der Milch. *Journal of Veterinary Medicine, Series A* 39:515-524.
- Schauer, N., D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M. G. Forbes, L. Willmitzer, A. R. Fernie, and J. Kopka. 2005. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters* 579:1332-1337.
- Sederevičius, A., A. Kabašinskienė, S. Savickis, V. Švedaitė, and S. Makauskas. 2008. Milk urea nitrogen as an important indicator of dairy cow nutrition. Review. *Veterinarija ir Zootechnika* 44:23-30.
- Shingfield, K. J. and N. W. Offer. 1998a. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactating dairy cows. *Animal Science* 67:371-385.
- Shingfield, K. J. and N. W. Offer. 1998b. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. *Animal Science* 66:557-568.
- Sibanda, S., J. H. Topps, E. Storm, and E. R. Orskov. 1982. The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proceedings of the Nutrition Society* 41:75A.

- Smedman, A. E. M., I.-B. Gustaffson, L. G. T. Berglund, and B. O. H. Vessby. 1999. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk and metabolic risk factors. *American Journal of Clinical Nutrition* 69:22-29.
- Smith, P., D. Martino, Z. Cai, D. Gwary, H. Janzen, P. Kumar, B. McCarl, S. Ogle, F. O'Mara, C. Rice, B. Scholes, and O. Sirotenko. 2007. Agriculture. Pages 497-540 in: *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* B. Metz, O. R. Davidson, P. R. Bosch, R. Dave, and L. A. Meyer (eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Spohr, M. and H. U. Wiesner. 1991. Monitoring herd health and milk production by means of the extended milk production performance. *Milchpraxis* 29.
- Stefanon, B., C. R. Mills, M. Spanghero, and P. Susmel. 1995. An evaluation of purine derivatives as indicators of rumen microbial protein synthesis in dry and lactating cows. Pages 147-152. In: *VII Symposium on Protein Metabolism and Nutrition*, Santarem, Portugal.
- Susmel, P., M. Spanghero, B. Stefanon, and C. R. Mills. 1995. Nitrogen Balance and Partitioning of Some Nitrogen Catabolites in Milk and Urine of Lactating Cows. *Livestock Production Science* 44:207-219.
- Tas, B. M. and A. Susenbeth. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science* 111:181-192.
- Timmermans, S. J., L. M. Johnson, J. H. Harrison, and D. Davidson. 2000. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. *Journal of Dairy Science* 83:1286-1299.
- Timmons, J. S., W. P. Weiss, D. L. Palmquist, and W. J. Harper. 2001. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. *Journal of Dairy Science* 84:2440-2449.
- Toor, G. S., B. J. Cade-Menun, and J. T. Sims. 2005a. Establishing a linkage between phosphorus forms in dairy diets, feces, and manures. *Journal of Environmental Quality* 34:1380-1391.
- Toor, G. S., J. T. Sims, and Z. X. Dou. 2005b. Reducing phosphorus in dairy diets improves farm nutrient balances and decreases the risk of nonpoint pollution of surface and ground waters. *Agriculture Ecosystems & Environment* 105:401-411.
- Vaccari, D. A. 2009. Phosphorus: A Looming Crisis. *Scientific American* 300:54-59.
- Vagnoni, D. B., G. A. Broderick, M. K. Clayton, and R. D. Hatfield. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science* 80:1695-1702.
- van Duinkerken, G., G. Andre, M. C. J. Smits, G. J. Monteny, and L. B. J. Sebek. 2005. Effect of rumen-degradable protein balance and forage type on bulk milk urea concentration and emission of ammonia from dairy cow houses. *Journal of Dairy Science* 88:1099-1112.
- Van Nevel, C. J. and D. I. Demeyer. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring And Assessment* 42:73-97.
- Van Niekerle, B. D. H., A. Bensadoun, O. L. Paladines, and J. T. Reid. 1963. A study of some of the conditions affecting the rate of excretion and stability of creatinine in sheep urine. *Journal of Nutrition* 79:373-380.
- Verbic, J., X. B. Chen, N. A. MacLeod, and E. R. Ørskov. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effects of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science* 114:243-248.
- Vlaeminck, B., R. J. Dewhurst, and V. Fievez. 2006a. Effect of choice of microbial marker and variation in solid- to liquid-associated bacteria proportion in duodenal contents on the

- estimation of duodenal bacterial nitrogen flow. *Journal of Dairy Science* 89 (Suppl. 1):360 (Abstract).
- Vlaeminck, B., C. Dufour, A. M. van Vuuren, A. R. Cabrita, R. J. Dewhurst, D. Demeyer, and V. Fievez. 2005. Use of odd and branched-chain fatty acids in rumen contents and milk as a potential microbial marker. *Journal of Dairy Science* 88:1031-1042.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, D. Demeyer, and R. J. Dewhurst. 2006b. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *Journal of Dairy Science* 89:2668-2678.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, D. Demeyer, and R. J. Dewhurst. 2007. Effect of variation in the proportion of solid- and liquid-associated rumen bacteria in duodenal contents on the estimation of duodenal bacterial nitrogen flow. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16:37-42.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. J. Dewhurst, A. van Vuuren, D. De Brabander, and D. Demeyer. 2006c. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science* 89:3954-3964.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, H. van Laar, and D. Demeyer. 2004. Prediction of rumen volatile fatty acid proportions produced *in vitro* using variations in rumen odd and branched chain fatty acids. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88:401-411.
- Wattiaux, M. A., E. V. Nordheim, and P. Crump. 2005. Statistical Evaluation of Factors and Interactions Affecting Dairy Herd Improvement Milk Urea Nitrogen in Commercial Midwest Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 88:3020-3035.
- Westwood, C. T., I. J. Lean, and R. C. Kellaway. 1998. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: A quantitative review. Part 1. Dietary protein sources and metabolism. *New Zealand Veterinary Journal* 46:87-96.
- Wolk, A., B. Vessby, H. Ljung, and P. Barrefors. 1998. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:291-295.

Læs om forskningen, uddannelserne og andre aktiviteter på Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet på www.agrsci.au.dk, hvorfra du også kan downloade fakultetets publikationer og abonnere på det ugentlige nyhedsbrev