



Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



BREDA JAKOVAC STRAJN, MARJANA GRANDIČ

LABORATORIJSKE ANALIZE KRME

Učbenik za študente veterinarske medicine

LABORATORIJSKE ANALIZE KRME

UČBENIK ZA ŠTUDENTE VETERINARSKE MEDICINE

AVTORICI

doc. dr. Breda Jakovac Strajn, dr. vet. med.
asist. dr. Marjana Grandič, dr. vet. med.

JEZIKOVNI PREGLED

Prof. dr. Jože Jurca

OBLIKOVANJE

Luka Milčinski

RECENZENTA

Prof. dr. Andrej Kirbiš, dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Izr. prof. dr. Petra Zrimšek, univ. dipl. kem., prof. kem., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

IZDAJATELJ

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

LETO IZIDA

2015

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

543:636.086(075.8)
579.64.083.1:636.086(075.8)

JAKOVAC-Strajn, Breda

Laboratorijske analize krme [Elektronski vir] : učbenik za študente veterinarske medicine / Breda Jakovac Strajn, Marjana Grandič. - El. knjiga. - Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2015

ISBN 978-961-6199-74-2 (pdf)

1. Grandič, Marjana
281293056



Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

BREDA JAKOVAC STRAJN, MARJANA GRANDIČ

LABORATORIJSKE ANALIZE KRME

Učbenik za študente veterinarske medicine

KAZALO

KAZALO

Uvod.....	12
Zahvala.....	13
1 VARNOST V LABORATORIJU.....	14
1.1 Glavne nevarnosti v laboratoriju.....	14
1.2 Osebna varovalna oprema.....	17
1.3 Izredni dogodki v laboratoriju.....	18
2 VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORCEV KRME ZA MIKROBIOLOŠKE IN KEMIJSKE ANALIZE.....	20
2.1 Vzorčenje.....	20
2.1.1 Oprema za odvzem vzorcev.....	21
2.1.2 Tehnike vzorčenja.....	23
2.1.2.1 Vzorčenje krme.....	24
2.1.2.2 Vzorčenje tekočih maščob oziroma olj.....	26
2.1.2.3 Odvzem vzorcev vode.....	27
2.2 Priprava končnega vzorca in pošiljanje v laboratorij.....	27
2.3 Priprava vzorca za laboratorijske analize.....	28
3 DOLOČANJE OSNOVNIH SKUPIN HRANILNIH SNOVI.....	30
3.1 Weendska analiza.....	30
3.1.1 Določanje vlage.....	32
3.1.2 Določanje surovih beljakovin (SB).....	37
3.1.3 Določanje surovih maščob (SM).....	42
3.1.4 Določanje surovega pepela (SP).....	47
3.1.5 Določanje surove vlaknine (SV).....	51
3.1.6 Določanje brezdušičnega izvlečka (BDI).....	56
3.2 Analiza ogljikovih hidratov po Van Soestu.....	56
4 OSNOVNE KROMATOGRFSKE TEHNIKE ZA ANALIZO KRME.....	60
4.1 Tankoplastna kromatografija (TLC).....	62
4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	63
4.2.1 Določanje mikotoksinov s tehniko HPLC.....	67
4.2.2 Določanje vitamina A in E s tehniko HPLC.....	71
4.3 Plinska kromatografija (GC).....	74
4.3.1 Določanje nižjih maščobnih kislin s tehniko GC.....	75
4.4 Tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS-MS).....	78
5 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE KRME.....	80
5.1 Razdelitev mikrobov.....	80
5.2 Značilnosti mikrobov, ki kontaminirajo krmo.....	81
5.3 Zakonski predpisi.....	82
5.4 Določanje stopnje kontaminacije s saprofitskimi mikrobi.....	83
6 MIKROSKOPSKE PREISKAVE KRME.....	90
6.1 Preiskave na vsebnost nečistoč in strupenih snovi rastlinskega izvora.....	91
6.2 Preiskave na vsebnost tkiv živalskega izvora.....	92
6.2.1 Mikroskopske preiskave na sestavine živalskega izvora.....	93
6.2.2 Druge metode za določanje tkiv živalskega izvora v krmi.....	96
7 METODE ZA DOLOČANJE ELEMENTOV V KRMI.....	102
7.1 Priprava vzorcev.....	102

7.2 Induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo (ICP-MS).....	104
7.3 Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)	106
7.4 Določanje fosforja (P) s spektrofotometrično metodo	110
8 DOLOČANJE NARAVNIH ŠKODLJIVIH SNOVI V KRMI.....	116
8.1 Določanje cianogenih glikozidov	116
8.2 Določanje nitratov in nitritov	119
8.2.1 Kvalitativno določanje nitratov in nitritov v krmi.....	119
8.2.2 Spektrofotometrična metoda	120
9 ANALIZA SILAŽE IN VAMPOVEGA SOKA	126
9.1 Analiza silaže.....	126
9.1.1 Organoleptična ocena silaže	128
9.1.2 Merjenje pH.....	129
9.1.3 Določanje nižjih maščobnih kislin	129
9.1.4 Delež dušika iz amonijaka v skupnem dušiku	129
9.2 Preiskava vampovega soka.....	130
9.2.1 Organoleptična ocena	130
9.2.2 Razslojenost vampovega soka.....	131
9.2.3 Določanje aktivnosti vampove mikroflore z metilenskim modrilom	131
9.2.4 Merjenje pH	132
9.2.5 Določanje nižjih maščobnih kislin	132
9.2.6 Delež dušika iz amonijaka v skupnem dušiku	132
9.2.7 Pošiljanje vzorcev vampovega soka v laboratorij	132
10 DODATNE ANALIZE KRME.....	134
10.1 Določanje vitamina C s titrimetrično metodo.....	134
10.2 Določanje koncentracije kloridov v krmi	137
11 NADZOR KAKOVOSTI REZULTATOV LABORATORIJSKIH ANALIZ.....	138

SEZNAM KRATIC

BDI	brezdušični izvleček
GC	plinska kromatografija (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	visoko ločljivostna tekočinska kromatografija (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
LC/MS-MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (<i>Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry</i>)
OS	organska snov
SB	surove beljakovine
SM	surove maščobe
SP	surov pepel
SS	suha snov
SV	surova vlaknina
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>Thin Layer Chromatography</i>)

KAZALO SLIK

Slika 1: Simboli za nevarnost	16
Slika 2: Različne lopatice za odvzem vzorcev.....	21
Slika 3: Različne vrste sond	22
Slika 4: Spiralna sonda	22
Slika 5: Sonde za odvzem vzorcev iz vreč	23
Slika 6: Primer odvzema vzorcev iz tovornjakov ali tovornih vagonov.....	25
Slika 7: Primer vzorčenja iz silosa.....	25
Slika 8: Primer sonde za odvzem tekočih maščob	26
Slika 9: Priprava zmanjšane skupnega vzorca s četrtinjenjem.....	28
Slika 10: Kemijska sestava krme po Weendski analizi	31
Slika 11: Tehtiči za določanje vlage v vzorcih krme.....	32
Slika 12: Vzorci krme v koncentrirani žvepleni kislini.....	37
Slika 13: Kuhanje vzorcev do zbistritve tekočine	38
Slika 14: Dodajanje baze in destilacija amonijaka	38
Slika 15: Vzorec v papirnati vrečki	42
Slika 17: Lončka s surovo maščobo.....	43
Slika 16: Soxhletov aparat.....	43
Slika 18: Žarilna lončka s pepelom	47
Slika 19: Kuhanje vzorca v kislem in bazičnem mediju	51
Slika 20: Filtriranje vzorca	52
Slika 21: Skupine hranljivih snovi pri Weendski analizi in pri	
analizi po Van Soestu z dodanimi analizami.....	57
Slika 22: Primer izpisa iz tekočinskega kromatografa (HPLC)	61
Slika 23: Shematski prikaz tankoplastne kromatografije (TLC)	63
Slika 23: Shematski prikaz tankoplastne kromatografije (TLC)	63
Slika 24: Tekočinski kromatograf z visoko ločljivostjo (HPLC).....	64
Slika 26: Shematski prikaz HPLC	65
Slika 25: Kromatografske kolone za HPLC	65
Slika 27: Kromatogram	66
Slika 28: Shematski prikaz imunoafinitetnih kolon.....	68
Slika 29: Plinski kromatograf	74
Slika 30: Shematski prikaz plinske kromatografije.....	75
Slika 31: Tekočinski kromatograf s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS-MS)	78
Slika 32: Gojišča po Schmidtu	83
Slika 33: Nanašanje vzorca na gojišče	84
Slika 35: Štetje zraslih kolonij saprofitskih bakterij, plesni in kvasovk.....	85
Slika 34: Rast plesni in kvasovk v termostatu	85
Slika 36: Ambrozija (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	91
Slika 37: Rastlinska vlakna sončnice (A), krompirjev škrob (B).....	92
Slika 38: Razdelitev tkiv živalskega izvora.....	92
Slika 39: Diagram postopka za določanje tkiv živalskega izvora.....	93
Slika 40: Tkiva živalskega izvora.....	94
Slika 42: Priprava vzorca za določanje elementov.....	103
Slika 43: Vzorec krme pripravljen za razklop (razkroj) v mikrovalovni pečici.....	104
Slika 44: Shematski prikaz ICP-MS sistema	104
Slika 45: ICP-MS aparatura	105
Slika 46: a: Atomski absorpcijski sprektrometer	107
Slika 47: Določanje cianidov v krmi	117
Slika 48: Kvalitativno določanje nitratov in nitritov.....	119

KAZALO PROTOKOLOV

Protokol številka 1: Določanje vlage.....	34
Protokol številka 2: Določanje surovih beljakovin.....	39
Protokol številka 3: Določanje surovih maščob.....	44
Protokol številka 4: Določanje surovega pepela.....	48
Protokol številka 5: Določanje surove vlaknine.....	53
Protokol številka 6: Določanje ohratoksina A v krmi.....	69
Protokol številka 7: Določanje vitamina A in E v krmi.....	72
Protokol številka 8: Določanje nižjih maščobnih kislin.....	77
Protokol številka 9: Mikrobiološka preiskava krme.....	87
Protokol številka 10: Določanje tkiv živalskega izvora.....	98
Protokol številka 11: Določanje elementov v krmi s tehniko ICP-MS.....	108
Protokol številka 12: Določanje fosforja (P) v krmi s spektrofotometrično metodo.....	111
Protokol številka 13: Določanje cianogenih glikozidov v krmi.....	118
Protokol številka 14: Določanje nitratov in nitritov v krmi s spektrofotometrično metodo.....	121
Protokol številka 15: Določanje vitamina C v krmi s titrimetrično metodo.....	135
Protokol številka 16: Določanje kloridov v krmi s titrimetrično metodo.....	137

UVOD

Učbenik Laboratorijske analize krme je namenjen predvsem študentom veterinarske medicine. Široko področje veterinarske medicine zajema tudi skrb za varno in kakovostno krmo, ki je pogoj za zdravje živali in neoporečnost živil živalskega izvora. Sestavni del zagotavljanja varne krme so kemijske analize vzorcev krme, ki jih v našem laboratoriju opravljamo že vrsto let, študenti pa se z njimi seznanijo na vajah pri predmetih Fiziologija prehrane živali in Higiena in patologija prehrane živali. Glavni namen učbenika je, da študente poučimo o načinih določanja osnovnih hranilnih snovi v krmi, vitaminov, mineralov, mikotoksinov, mikrobov in drugih neželenih snovi. Razložimo jim tudi, kako pravilno sporočati in interpretirati rezultate preiskav. Slednje je za veterinarje v praksi velikega pomena.

Učbenik je zasnovan tako, da je v vsakem poglavju opisana tehnika analize krme, ki ji sledi protokol in delovni list. Na koncu vsakega poglavja so navedeni vir in literatura, v kateri lahko bralec lahko najde dodatne informacije.

Snov je razdeljena na deset poglavij. V prvem govorimo o varnosti pri delu v laboratoriju. Z vsebino tega poglavja morajo biti študenti, pa tudi osebje dobro seznanjeni. Drugo poglavje zajema vzorčenje krme, ki je ključnega pomena za reprezentativne rezultate analiz. Sledi poglavje o analizi osnovnih skupin hranilnih snovi v krmi, med katere prištevamo suho snov, surove beljakovine, surove maščobe, surov pepel, surovo vlaknino in brezdušični izvleček. V poglavju o kromatografskih tehnikah prikazujemo osnovna načela tistih kromatografskih metod, ki jih pri analizah krme najpogosteje uporabljamo. Sledijo poglavja o mikrobioloških in mikroskopskih analizah ter o tehnikah določanja elementov v krmi. Vključili smo tudi poglavje o ugotavljanju naravnih škodljivih snovi in poglavje o preiskavah silaže ter vampovega soka. V zadnjem poglavju so opisane dodatne analize krme.

Zaradi omejenega obsega pričujočega dela nismo navedli vseh metod določanja oziroma vseh snovi, ki jih v krmi lahko določamo. Opisali nismo na primer določanja pesticidov, dioksinov, kokcidostatikov in drugih neželenih snovi v krmi ali dodatkov krmi, vendar bodo študentje s poznavanjem prej opisanih metod z lahkoto razumeli tudi vse ostale. Pomembno pa je še omeniti, da morajo tako študenti veterinarstva kot veterinarji slediti priporočilom za varnost krme in zakonodaji s tega področja.

Avtorici

ZAHVALA

Za pomoč in sodelovanje pri pripravi učbenika se zahvaljujemo sodelavcem Inštituta za higieno in patologijo prehrane živali, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani: viš. zn. sod. Gabrijeli Tavčar Kalcher, asist. Katarini Pavšič Vrtač, asist. mag. Igorju Ujčiču Vrhovniku, Karin Šrimpf, Ireni Indihar, Alenki Vošnjak in Robertu Rožiču. Naše razprave, kako bi najbolj razumljivo povezali kemijo in veterinarstvo, so neprecenljive vrednosti.

Hvala recenzentoma, prof. Andreju Kirbišu in prof. Petri Zrimšek za natančen pregled besedila ter vse popravke in predloge.

Prof. Jožetu Jurci se zahvaljujemo za jezikovni pregled besedila, mag. Giti Greccs-Smole pa za pregled literature.

Na koncu se naj še zahvaliva prav vsem, ki so nama kakorkoli pomagali. Ne moreva omeniti vseh, vseeno pa naj še dodava, da je v tem delu tudi delček najinih predhodnikov, ki jim dolgujemo posebno zahvalo: prof. Nestorju Klemencu, prof. Janku Žustu, prof. Urošu Pestevšku in prof. Antonu Venguštu.

1 VARNOST V LABORATORIJU

Usposabljanje študentov za varno delo v laboratoriju ima dva namena. Prvi je preprečevanje poškodb in nesreč, ki bi se lahko zgodile zaradi nepravilnega ravnanja z laboratorijskim materialom, kemikalijami, aparati in podobnim. Drugi namen pa je, da študentom v času študija postopki varnega dela postanejo samoumevni in jih bodo pri svojem vsakdanjem delu tudi uporabljali.

Z delom in varnostnimi predpisi, ki veljajo v laboratoriju, morajo biti študenti seznanjeni še pred začetkom laboratorijskih vaj. Poglavje o varnosti pri delu je sestavni del vsakega standardnega operativnega postopka (SOP), ki se v laboratoriju izvaja.

14

1.1 GLAVNE NEVARNOSTI V LABORATORIJU

V laboratoriju je veliko zdravju nevarnih in škodljivih snovi. Da preprečimo vnos teh snovi v telo, se moramo strogo držati navodil. Po vsakem delu v laboratoriju si temeljito umijemo roke. V laboratoriju je strogo prepovedano piti in jesti, kaditi, hraniti hrano in pijačo v laboratorijskih hladilnikih, hraniti kemikalije v embalažah za živila in pipetirati z usti.

V laboratoriju moramo biti vedno pozorni na razbito ali poškodovano steklo in na ostri pribor. Zavedati se moramo nevarnosti poškodb zaradi jedkih, vnetljivih ali celo radioaktivnih kemikalij in nenadzorovanih kemijskih reakcij. Tudi pri skrbnem delu lahko pride do požara, opeklin ali električnega udara, zato moramo biti vsak trenutek pripravljeni na ukrepanje.

STEKLOVINA

Največ poškodb v laboratorijih se zgodi zaradi nepravilne uporabe steklovine. Pogosto se s počeno in zdrobljeno steklovino porežemo, z vročo steklovino pa opečemo. Paziti moramo, da stekla ne izpostavimo prevelikim in hitrim temperaturnim spremembam. Segrevamo ga počasi in postopoma ter pri tem uporabljamo zaščitne rokavice. Ravno tako steklovino počasi ohlajamo.

Nekaj splošnih pravil za ravnanje s steklovino:

- nikoli ne uporabljamo počene ali opraskane steklovine. Tako steklovino takoj izločimo iz uporabe.
- Nikoli ne segrevamo zaprtih steklenih posod.
- Steklovino segrevamo počasi.
- Za odparevanje pod vakuumom uporabljamo le temu namenjeno steklovino.
- Steklovino (na primer bučke, erlenmajerjeve steklenice...) prenašamo z obema rokama.

ELEKTRIČNI TOK

Električne naprave se v laboratorijih običajno uporabljajo za segrevanje, mešanje, ohlajevanje, črpanje in za fizikalne meritve. Z nepravilno uporabo lahko povzročimo električni udar, ki ima za človeka lahko tudi pogubne posledice. Na splošno velja, da mora biti električna oprema v laboratoriju postavljena tako, da v primeru razlitja vode ali kemikalij ni nevarna. V primeru nevarnosti moramo napravo takoj izklopiti iz električnega omrežja, jo osušiti in očistiti. Električne naprave lahko popravljajo samo strokovno usposobljene osebe.

Nekaj splošnih pravil za ravnanje z električnimi napravami:

- električni podaljšek uporabljamo le, ko je nujno in še to čim krajši čas.
- Pred uporabo električne opreme preverimo, če so električni vodniki in izolacija nepoškodovani in stikala izklopljena. Prav tako morajo biti vsa stikala izklopljena pred čiščenjem in pred menjavo sestavnih delov.
- Vsako pomanjkljivost ali napako takoj sporočimo osebju laboratorija.
- Pred uporabo električnih aparatov se vedno prepričamo, da delovni pult ni moker in da v bližini ni vnetljivih snovi.
- Pri delu z električno opremo ne smemo stati na mokrih tleh ali imeti mokrih rok.
- Po končanem delu preverimo, ali so vse električne naprave izklopljene.

KEMIKALIJE

V laboratoriju delamo z vnetljivimi, eksplozivnimi, strupenimi, jedkimi, radioaktivnimi, oksidativnimi ali z drugimi, za okolje nevarnimi kemikalijami,

ki lahko povzročijo poškodbe, okvare ali celo smrt ljudi in živali ter okvare, poškodbe in uničenje strojev, drugih naprav ali napeljave. Na osnovi Pravilnika o razvrščanju, pakiranju in označevanju nevarnih snovi razvrščamo nevarne snovi glede na njihove fizikalnokemijske lastnosti, glede na njihov vpliv na zdravje ljudi in na okolje. Podatke o lastnostih posamezne kemikalije razberemo iz oznak na embalaži in iz varnostnih listov. To so listine, ki jih proizvajalec priloži kemikaliji in vsebujejo naslednje podatke: identifikacijo snovi, podatke o dobavitelju, podatke o nevarnih sestavinah, ugotovitve o nevarnih lastnostih, navodila o ukrepih za prvo pomoč ob požaru in nezgodnih izpustih, navodila za skladiščenje in ravnanje s snovjo, fizikalne in kemijske lastnosti, obstojnost in reaktivnost snovi, toksikološke in ekotoksikološke podatke, način odstranjevanja, transportne podatke,... Vsaka kemikalija mora imeti tudi ustrezne podatke na svoji originalni embalaži. To so identifikacijski podatki o kemikaliji (ime, trgovsko ime, racionalna molekularna formula, Chemical Abstracts Service ali številka CAS), podatki o proizvajalcu, stavki R in S ter simboli za nevarnost. Stavki R so opozorilne oznake in označujejo nevarnost snovi. Stavki S pa so obvestilni in nas seznanjajo z ukrepi, ki jih moramo izvajati pri ravnanju z nevarno snovjo. Poznamo deset simbolov za nevarnost. To so črni znaki na oranžni podlagi. Poleg znaka je tudi črka, ki pomeni oznako nevarnosti (slika 1).

16



Slika 1: Simboli za nevarnost

Nekaj splošnih pravil za ravnanje s kemikalijami:

- vedno upoštevamo, da je mešanica kemikalij tako nevarna, kot so nevarne njene komponente.
- Neoznačenih kemikalij ne uporabljamo.
- Oznake na kemikalijah pazljivo preberemo in jih upoštevamo.
- Embalažo, v katero smo shranili vzorec, takoj ustrezno označimo.
- Kemikalij nikoli ne pokušamo. Nikoli ne pipetiramo z usti.
- Pri delu s kemikalijami pazimo, da ne pridejo v stik s kožo in očmi.
- Kisline vedno dodajamo v vodo in nikoli vodo v kislino.
- V kemikalije, ki smo jih segreli na 90°C, nikoli ne vlivamo vode.
- Kemikalij nikoli se zlivamo v odtok.
- Steklenic s kemikalijami nikoli ne postavljamo na rob delovne površine ali police, prav tako jih ne izpostavljam virom toplote.
- Kemikalij ne shranjujemo v embalažo, ki je namenjena shranjevanju živil.
- Neuporabljenih reagentov nikoli ne zlivamo nazaj v originalno embalažo, saj tako onesnažimo zalogo kemikalije.

1.2 OSEBNA VAROVALNA OPREMA

Osebna varovalna oprema je oblačilo, naprava ali drugi pripomočki, s katerimi se laboratorijsko osebje zaščiti pred morebitnim nastankom poškodb. V laboratoriju ni dovoljeno opravljanje dela brez zaščitne opreme. Predpisano osebno varovalno opremo moramo namensko uporabljati in je ne smemo nositi iz laboratorija. Med osnovno zaščitno opremo spadajo zaščitna očala, zaščitna halja, zaščitne rokavice in zaščitna obutev.

Zaščitna očala varujejo pred mehanskimi in optičnimi nevarnostmi. Poznamo očala s stransko zaščito in tesno prilegajoča se panoramska očala. Slednja so obvezna za vse, ki nosijo kontaktne leče ali očala. Osebe z daljšimi lasmi si morajo pri delu v laboratoriju lase speti.

Zaščitna halja mora biti iz 100% bombaža. Imeti mora dolge rokave in segati čez kolena. Najbolj priporočljiva barva zaščitne obleke je bela. Za stalno zaposleno laboratorijsko osebje je priporočljivo nošenje zaščitnih hlač in majic, ki morajo biti prav tako bombažne. Zaščitna obleka naj bo ustrezne

velikosti, saj se tako izognemo zatikanju ohlapnih rokavov v laboratorijsko opremo in morebitnim nesrečam pri delu.

Zaščitne rokavice izberemo glede na vrsto dela in nevarnosti. Obstaja veliko različnih vrst rokavic, ki se med seboj razlikujejo po stopnji odpornosti proti različnim kemikalijam. Tudi pri rokavicah pazimo, da nosimo ustrezno velikost. Zaščitna obutev mora biti takšna, da pred poškodbami varuje celo stopalo ter omogoča varen in trden korak. Uporaba sandal ali natikačev v laboratoriju ni dovoljena.

1.3 IZREDNI DOGODKI V LABORATORIJU

V laboratoriju smo stalno izpostavljeni nevarnosti poškodb pri delu. Možnost za pojav nesreč in poškodb, ki jih imenujemo izredni dogodek, pa se še poveča, če pri delu v laboratoriju ne upoštevamo pravil varnega dela. Izredni dogodek je torej vsak pojav, pri katerem pride do poškodbe, poklicne bolezni, požara, eksplozije, okvare na laboratorijski opremi, materialne škode ali nevarnosti za onesnaženje okolja.

V primeru izrednega dogodka moramo nujno obvestiti osebje laboratorija. V primeru večjih nesreč (na primer požarov ali eksplozij) ali poškodovanih oseb je potrebno obvestiti Center za obveščanje (112), kjer povemo kaj, kje in kdaj se je zgodilo, kdo kliče, koliko je ponesrečencev, kakšne so poškodbe in okoliščine nesreče. Ponesrečencem moramo znati nuditi ustrezno prvo pomoč. Delavci v laboratoriju morajo vedeti, kje je v laboratoriju omarica s prvo pomočjo.

Najpogosteje nudimo v laboratoriju prvo pomoč zaradi vreznin, opeklin ali stika s korozivnimi snovmi. Vreznine očistimo in prekrijemo s povojem ali obližem. Opeklino hladimo pod mrzlo vodo. Ne uporabljamo mazil. V primeru stika korozivnih snovi z očmi ali kožo je zelo pomembno hitro ukrepanje. Oko ali kožo spiramo z velikimi količinami vode vsaj 15 minut. Kemijski laboratoriji so opremljeni z varnostno prho, ki jo uporabimo v primeru politja z nevarnimi snovmi.

V primerih požarov je potrebno vedeti, kje v laboratoriju so gasilni aparati. Glede na snov, ki gori (trde snovi, vnetljive tekočine, plin, kovine in maščobe) moramo uporabiti ustrezni gasilni aparat (CO₂, prah...). Gasimo po navodilih za uporabo, ki so napisana na gasilnem aparatu.

LITERATURA

1. Furr AK. CRC handbook of laboratory safety. 5th ed. Boca Raton: CRC Press, 2000.
2. Mahn WJ. Fundamentals of laboratory safety: physical hazards in the academic laboratory. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

3. National Research Council. Prudent practices in the laboratory: handling and management of chemical hazards. Washington : National Academies Press, 2013.
4. Pravilnik o razvrščanju, pakiranju in označevanju nevarnih snovi. Ur List RS 2005; 25(35): 3229
5. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o razvrščanju, pakiranju in označevanju nevarnih snovi. Ur List RS 2008; 28(88): 12077.
6. Zbirka pravil varnega dela za študente FKKT. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2007.

2 VZORČENJE IN PRIPRAVA VZORČEV KRME ZA MIKROBIOLOŠKE IN KEMIJSKE ANALIZE

Pravilno vzorčenje je osnova za zanesljive in točne podatke o kvaliteti, lastnostih ter sestavi različnih vrst krme. Napaka, narejena pri vzorčenju, se ponavlja na vseh korakih še tako natančne laboratorijske analize in nepravilni rezultati so v takšnem primeru neizbežni.

Osnova vzorčenja je pravilo, da morajo lastnosti in sestava odvzetega vzorca natančno ustrezati lastnostim in sestavi celote, od katere je bil vzorec vzet. Pravimo, da mora biti vzorec reprezentativen. Vzorci za monitoring in inšpekcijski nadzor krme, dodatkov in premiksov, odvzeti z namenom preverjanja skladnosti z zahtevami iz predpisov o zdravstveni ustreznosti krme, dodatkov in premiksov in s predpisi o kakovosti krme, dodatkov in premiksov, so reprezentativni takrat, ko jih pooblaščen oseba za vzorčenje krme odvzame v skladu z Uredbo komisije (ES) št. 691/2013 o spremembi uredbe (ES) 152/2009 glede določitve metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. Pravilom vzorčenja krme iz omenjene uredbe je smiselno slediti v vsakem primeru vzorčenja, na primer vzorčenje za namen pridobitve informacije o kvaliteti in varnosti lastnih oziroma uvoženih surovin.

Če odvzeti vzorci (in s tem tudi rezultati) niso reprezentativni, lahko povzročimo nepotrebno ekonomsko škodo ali še hujše, obolenost živali in ljudi.

2.1 VZORČENJE

Pri odvzemu vzorcev upoštevamo nekaj osnovnih pravil. Priporočljivo je, da se povežemo z laboratorijem, ki opravlja določene analize, iz katerega nas bodo opozorili na morebitne posebne zahteve glede odvzema, shranjevanja ali pošiljanja določenih vzorcev. Glede opreme v grobem velja, da je za kemijske analize (na primer Weendska analiza, analiza mikotoksinov in dodatkov krmi) dovolj, če vzorce odvezamo s čisto opremo. Pri odvzemu vzorcev za bakteriološke preiskave mora biti oprema za odzem vzorcev sterilna. Vzorec moramo v vsakem primeru odvzeti tako, da se njegove lastnosti med vzorčenjem in transportiranjem do laboratorija ne spremenijo.

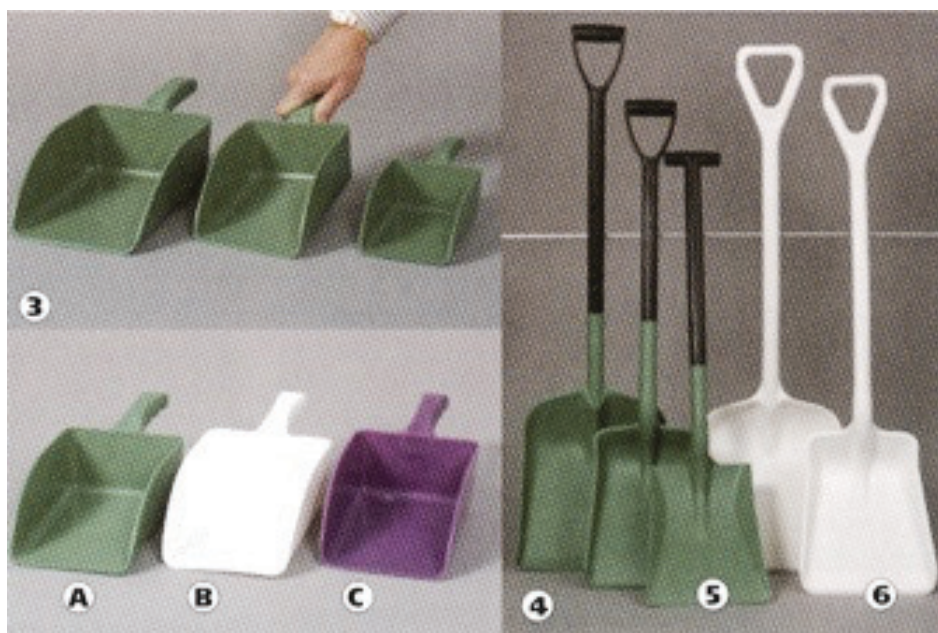
2.1.1 OPREMA ZA ODVZEM VZORCEV

Izbira pravilne opreme za odvzem vzorcev krme je odvisna od lastnosti vzorčenega materiala, načina vzorčenja, mesta, kjer je material shranjen in pogostosti vzorčenja. V vsakem primeru pa mora biti oprema izdelana iz inertnega materiala, ki ne more vplivati na vzorec ali ga kontaminirati. Priporočljiva je oprema, ki je narejena iz nerjavečega jekla in visoko kvalitetnih sintetičnih ali plastičnih materialov. Omenjeni materiali so obstojni, enostavni za čiščenje in primerni za sterilizacijo (pomembno pri odvzemu vzorcev za mikrobiološke preiskave). Uporabljamo lahko tudi takšno opremo, ki jo po odvzemu vzorcev zavržemo. Oprema ne sme imeti nobene praske oziroma ne sme biti poškodovana, ker bi v tem primeru lahko prenašali nečistoče med posameznimi vzorci.

Vzorce jemljemo ročno, le pri jemanju vzorcev s transportnih sredstev lahko uporabimo mehansko opremo. Pri ročnem jemanju uporabljamo:

1. Lopatice (zajemalke) z ravnim dnom in navpičnimi stranicami (slika 2).
2. Sonde z vzdolžno režo ali prekatom. Velikost sonde mora biti prilagojena značilnostim serije (globina kontejnerja, dimenzije vreč, itd.) in velikosti delcev krme, dodatka ali premiksa (slika 3).

Ad 1) Najprimernejše so plastične lopatice iz polipropilena. Narejene so iz enega kosa in nimajo stičnih robov, v katerih bi se lahko zadrževal material. Odporne so proti različnim kemijskim snovem in imajo zaradi različnih dodatkov antistatične ali antimikrobne lastnosti. So preproste za čiščenje in odporne proti visokim temperaturam.



Slika 2: Različne lopatice za odvzem vzorcev

Ad 2) Najpogosteje vzorce odvajamo s sondami, ki so primerne za odvzem velikih količin različnih vrst krme oziroma sipkih surovin.

Poznamo več vrst sond:

- sonda z več zaprtimi celicami, s katerimi zajamemo pri vzorčenju vso globino.
- Sonda za jemanje vzorcev iz ene plasti na določeni globini.
- Sonda z eno zaprto komoro za jemanje vzorcev iz določene globine.

Sonde so različno velike, na primer dolžine od 55 cm (primerne za vzorčenje iz vreč) pa vse do 250 cm za vzorčenje iz silosov ali kamionov, različnih premerov in iz različnih materialov. Največkrat so iz nerjavečega jekla ali anodiziranega aluminija. Zunanja in notranja površina je gladka, kar preprečuje zastajanje materiala in omogoča enostavno čiščenje. Sonde mehansko očistimo s ščetkami za čiščenje.



Slika 3: Različne vrste sond

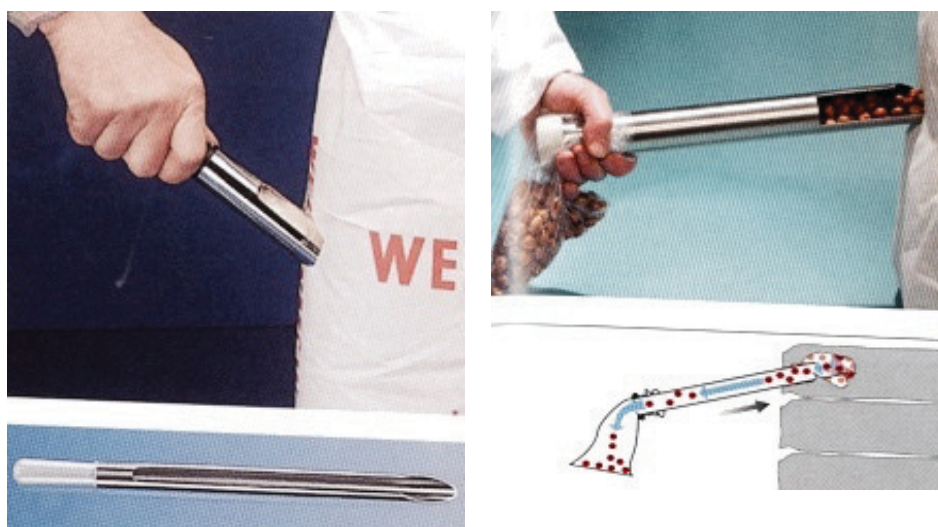
Spiralna sonda (slika 4) je posebno primerna za vzorčenje surovin z večjimi delci, kot so žita, semena in peleti v skladiščih, iz kamionov, iz tovornih vagonov, itn. S takšno sondo lahko natančno vzorčimo iz vseh plasti vzorčenega materiala. Zaradi spiralne razvrstitve se odprtine odpirajo druga za drugo od dna proti vrhu. Najnižja odprtina se tako napolni prva, nato pa po vrsti vse nad njo. Oblika odprtin je takšna, da pri zapiranju dodatno ne poškodujemo vzorca.



Slika 4: Spiralna sonda

Za odvzem vzorcev iz vreč imamo več več različnih vrst sond. Izberemo jih glede na surovine, ki jih vzorčimo (slika 5). Poznamo:

1. Enostavne sonde, ki so primerne za večje količine in sipke materiale nad 1 cm premera kot so na primer briketi ali žita iz velikih vreč. Na sondo natakemo zbiralno vrečko, ki jo držimo z roko, nato zabodemo sondo do zahtevane globine. Ko roko umaknemo, se vzorec vsuje skozi odprtino sonde v zbiralno vrečko (slika 5 levo).
2. Sonde za vzorčenje finejših, prahastih snovi (slika 5 desno).



Slika 5: Sonde za odvzem vzorcev iz vreč (levo: enostavna sonda, primerna za večje količine in sipke materiale; desno: sonda za vzorčenje finejših, prahastih snovi)

2.1.2 TEHNIKE VZORČENJA

Kolikšno število posamičnih vzorcev moramo odvzeti pri določeni količini materiala je navedeno v Uredbi komisije (ES) št. 691/2013 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. Običajno vzorčimo čez vse plasti materiala, da zagotovimo reprezentativen odvzem. V izjemnih primerih pa se za točno determinacijo materiala na prej določenih točkah uporablja tudi t.i. tarčno vzorčenje.

2.1.2.1 VZORČENJE KRME

Primeri lokacij, iz katerih najpogosteje jemljemo vzorce krme:

- mešalec krme;

Posamične vzorce jemljemo pri izhodni odprtini ob praznjenju mešalca. Ne vzorčimo začetnega in končnega materiala, ker so pri takšnem odvzemu rezultati običajno variabilni.

Če ugotovljamo učinkovitost mešanja oz. izenačenost materiala, vzorcev ne združujemo. V preostalih primerih pa vzorce združimo v zbirni vzorec.

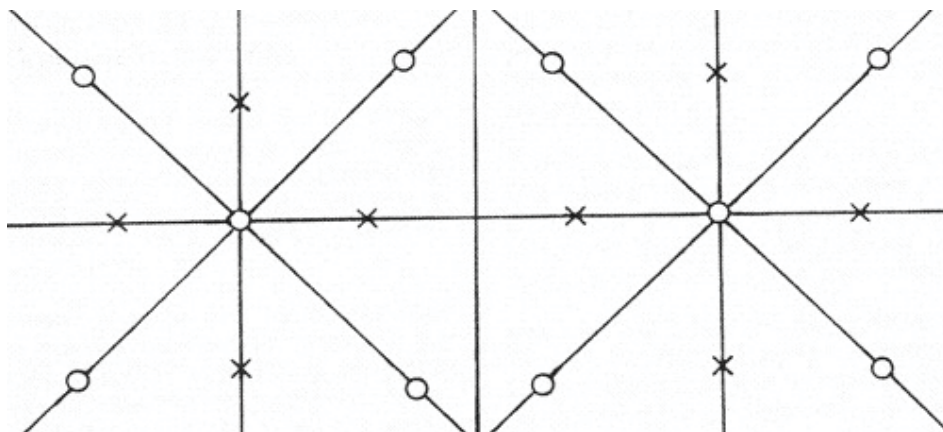
- Večje količine krme in surovin vzorčimo med nakladanjem ali razkladanjem v določenih časovnih intervalih, da zagotovimo reprezentativen vzorec. Uporabljamo avtomatsko ali navadno sondo ter različne lopatke.
- Vzorce krme iz vreč jemljemo s posebnimi sondami (slika 5). V praksi se vzorci iz vreč pogosto odzamejo z zajemalko ali lopatico, vendar na ta način ne zagotovimo reprezentativnosti. Vreče položimo horizontalno, sondo pa zabodemo diagonalno od enega do drugega konca vreče in odzvamemo vzorec.

24

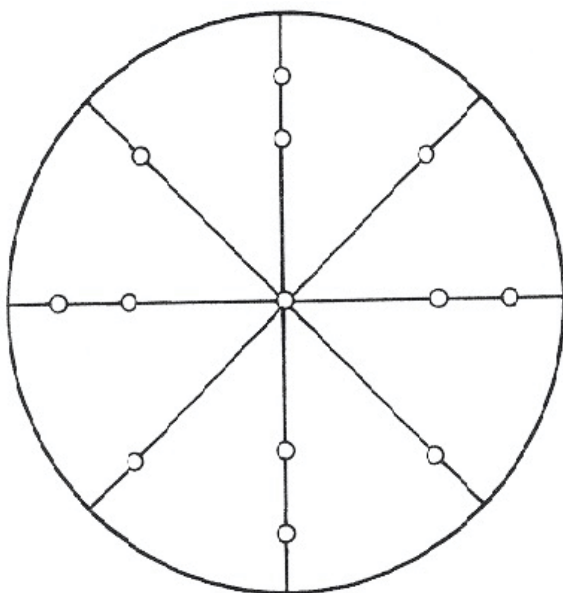
Pri odvzemu vzorcev za nadzor nezaželenih sestavin in škodljivih snovi, ki so v krmi, premiksih in dodatkih neenakomerno porazdeljene (na primer mikotoksini in strupena semena), je v uredbi predpisano večje število posameznih vzorcev. V nasprotnem primeru so dobljeni rezultati lahko nepovnljivi in nepravični do strank, ker:

1. kontaminirana zrna ne vsebujejo enakih količin toksinov,
2. vsa zrna ne vsebujejo toksinov,
3. kontaminirana zrna in strupena semena v surovini niso enakomerno razporejena,
4. razmerje med kontaminiranimi in čistimi zrni ni stalno.

Vzorčenje žit iz tovornih vagonov pomeni tehničen problem, ki se včasih zdi nepremagljiv. V takšnem primeru je najbolje uporabljati avtomatsko vzorčenje v določenih časovnih intervalih med nakladanjem ali razkladanjem surovin. Če vzorce jemljemo ročno s sondo, si serijo navidezno razdelimo na določeno število enakih delov in med njimi naključno izberemo število predpisanih skupnih vzorcev (sliki 6 in 7).



Slika 6: Primer odvzema vzorcev iz tovornjakov ali tovornih vagonov (vzorčimo iz mest, označenih z »o«; če potrebujemo več vzorcev, vzorčimo še iz mest »x«)



Slika 7: Primer vzorčenja iz silosa (zunanji krog mora biti približno 50 cm odmaknjen od sten silosa; notranji krog mora biti približno na dveh tretjinah razdalje od sredine do stene silosa)

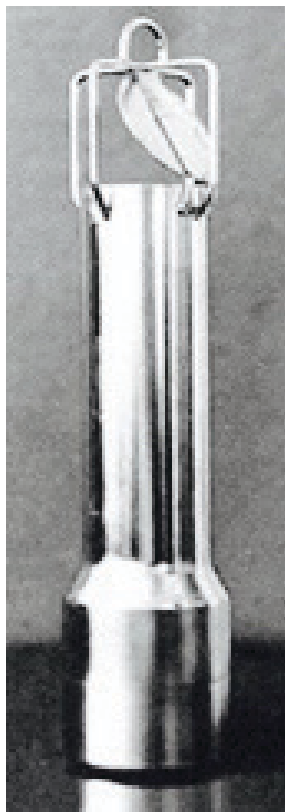
Svežo zeleno krmo na pašnikih vzorčimo tako, da posamezne vzorce odvzamemo vsaj na 30 mestih pašnika. Vzorčimo pred izpustom živali na pašo in travno rušo odrežemo na višini, kjer jo živali popasejo. Izogibamo se rastlinam, ki jih živali nerade jedo. Posamezne vzorce zberemo v plastično posodo, jih premešamo in shranimo v plastične vrečke, pri čemer iz vrečk iztisnemo čim več zraka.

Pri vzorčenju sena oziroma slame na senikih odvzamemo posamezne vzorce na 12 do 15 različnih mestih in pri tem vzorce jemljemo iz globine, sredine in z vrha. Če imamo seno ali slamo v balah, jemljemo vzorce iz naključno izbranih bal. Običajno vzorčimo vsako četrto ali peto balo na polju pred spravilom.

Eno bolj zapletenih vzorčenj je vzorčenje silaže. Pri vzorčenju silaže iz koristnih silosov odvezamo do 20 posameznih vzorcev in jih nato zmešamo skupaj. Pazimo, da ne jemljemo silaže globlje od 10 cm od tal in 10 cm od površine, saj je na teh mestih silaža pogosto pokvarjena in je živalim ne krmijo. Če vzorca ne pošljemo na kemijske analize takoj, ga moramo zamrzniti.

2.1.2.2 VZORČENJE TEKOČIH MAŠČOB OZIROMA OLJ

Pri pripravi kakovostne krme je zelo pomembno, da odvezamo reprezentativni vzorec vseh maščob, ki se zamešajo v krmo. Uporabljamo posebne sonde. Stožčasta sonda je dolga zbiralna cev, ki ima na koncu zbiralno bučko. Lahko je iz aluminija in mora biti dovolj dolga, da doseže dno cisterne ali zbiralne posode. Sondo spustimo počasi v maščobo. Ko dosežemo dno, zaklopke na bučki zapremo in izvlečemo sondo. Posamične vzorce pretočimo in premešamo, preden napolnimo vzorčne posode ali steklenice. Običajno odvezamo vzorce iz vseh plasti. Za odvzem vzorca iz enega nivoja maščobe uporabljamo drugačne sonde (slika 8).



Slika 8: Primer sonde za odvzem tekočih maščob

Poznamo še način kontinuiranega vzorčenja, pri katerem se sonda vgradi v razkladalno linijo med filter in posodo za skladiščenje maščobe. Ves čas razkladanja surovine se sonda odpira in zapira v enakomernih časovnih presledkih.

2.1.2.3 ODVZEM VZORCEV VODE

Preiskave vzorcev pitne vode so mikrobiološke, fizikalne, kemijske, biološke in radiološke (Pravilnik o zdravstveni ustreznosti pitne vode; UI RS 19/04). Odvzem, konzerviranje, transport in hranjenje vzorcev morajo potekati tako, da se ohrani kakovost vzorca do začetka preiskave. Vzorce za analizo je potrebno odvzeti v skladu s predpisanimi standardi.

Tudi vzorci vode morajo biti reprezentativni. Voda naj pred odvzemom nekaj česa teče, nato posodico za odvzem vzorca najprej s to vodo speremo, šele potem jo napolnimo. Vzorce jemljemo v čiste steklene ali plastične posodice.

Za mikrobiološko preiskavo morajo biti posodice sterilne. V kolikor vzorčimo klorirano pitno vodo, moramo dodati natrijev tiosulfat, ki nevtralizira klor. Embalaže ne smemo napolniti do vrha in potem višek vode odliti. Pri odvzemu ne sme priti do stika vratu embalaže z mestom odvzema vode. Posodico odpremo v času vzorčenja in jo potem takoj zapremo. Zamaška ne smemo odlagati in ga držimo obrnjenega navzdol.

2.2 PRIPRAVA KONČNEGA VZORCA IN POŠILJANJE V LABORATORIJ

27

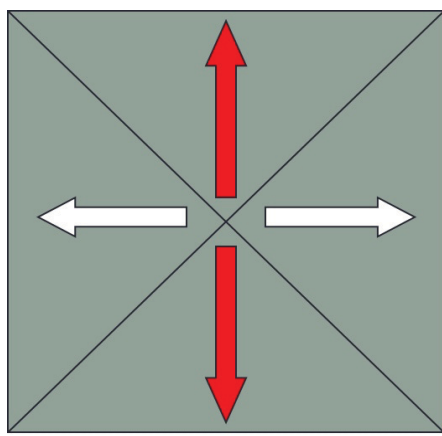
Postopek vzorčenja je za večino vrst krme enak. Na podlagi podatka o količini vzorčene surovine si v skladu z Uredbo komisije (ES) št. 691/2013 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme izračunamo število posameznih vzorcev, ki jih odvezamo po zgoraj opisanem postopku. Velikost posameznega vzorca je najmanj 100 g ali 25 g, če gre za voluminozno krmo. Posamezne vzorce združimo v zbirni vzorec in ga dobro premešamo. Na ta način ga homogeniziramo. Zbirni vzorec mora imeti maso vsaj 4 kg ali 4 L. Z uporabo mehanskega oziroma avtomatskega razdelilnika ali z razdelitvijo na četrtine (slika 9) ga zmanjšamo tako, da dobimo zmanjšan zbirni vzorec, katerega količina znaša najmanj 2 kg ali 2 L. Zmanjšan zbirni vzorec razdelimo in pripravimo najmanj dva končna vzorca, ki tehtata vsaj 0,5 kg ali 0,5 L.

Po vzorčenju je potrebno vzorec pripraviti za transport. Pravilno ravnanje z vzorcem med odvzemom, transportom in samim postopkom v laboratoriju je ključno za doseganje pravih rezultatov. Pri pripravi končnega vzorca pazimo, da iztisnemo zrak. Najpogosteje uporabljamo plastične vrečke, ki so označene s kodo in jih po zaprtju ne moremo več odpreti, ne da bi jih poškodovali. Vzorce hranimo na suhem in hladnem ter jih čim prej dostavimo v laboratorij. Končne vzorce ustrezno označimo in evidentiramo tako, da se lahko vsak končni vzorec nedvoumno prepozna. V laboratorij pošljemo en končni vzorec, drugi pa ostane lastniku krme. Na željo lastnika lahko odvezamo še en končni vzorec za referenčne namene. Ob jemanju uradnih vzorcev mora pooblaščen oseba napisati uradni zapisnik o vzorčenju, na katerem morajo biti naslednji podatki:

- ime in sedež organa, ki je odvil vzorec,
- mesto in datum jemanja vzorca,
- oznaka vzorca,
- serija,
- število posameznih vzorcev,
- ime in podpis vzorčevalca ter navzočih,
- način priprave in količina zbirnega vzorca,
- način priprave in količina zmanjšanega zbirnega vzorca,
- zahtevane analize,
- plačnik analiz,
- prejemnik rezultatov analiz.

Zapisnik se napiše v treh izvodih, od katerih enega zadrži vzorčevalec, enega prejme lastnik krme, tretjega pa pošljemo skupaj z vzorcem v laboratorij.

28



Slika 9: Priprava zmanjšanega skupnega vzorca s četrtinjenjem

2.3 PRIPRAVA VZORCA ZA LABORATORIJSKE ANALIZE

Vzorec krme, ki ga pošljejo ali prinesejo v laboratorij, je običajno zapakiran v plastično vrečko, priložen pa mu je dopis z osnovnimi podatki o vzorcu, lastniku in zahtevanih analizah.

Uradni vzorec za laboratorijsko analizo je zapakiran v uradno vrečko in ustrezno označen, spremlja pa ga pravilno izpolnjen zapisnik.

V laboratoriju embalažo odprejo, vzorec pa vpišejo v evidenco in označijo z interno številko laboratorija. Podatki o lastniku krme osebju v laboratoriju tako niso znani, kar je pomembno zaradi nepristranosti preiskav. Vzorec razdelimo na dva enaka dela, od katerih se en del zmelje, drugi del pa ostane nezmet za potrebe ponovnih ali dodatnih analiz. Vzorce je potrebno do analize hraniti v takih razmerah, da ne pride do spreminjanja lastnosti vzorca, običajno v hladilni komori pri 10°C. Analizo vzorca je potrebno opraviti čimprej po prejetju vzorca.

LITERATURA:

1. Bürkle catalog. Innovative products for laboratory, industry and science. Bad Bellingen : GmbH, 2005.
2. Horne CW, Boleman LL, Coffman CG, et al. Mycotoxins in feed and food-producing crops. College Station, Texas : Texas Agricultural Extension Service, B-1279, 2010.
3. Mašek T. Opća i primjenjena hranidba: priprema za vježbe. Zagreb: Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu, 2009: 5–11.
4. Rutherford SM, Moughan PJ. Principles of chemical analysis. In: Moughan PJ, Verstegen MWA, Visser-Reyneveld MI, eds. Feed evaluation, principles and practise. Wageningen: Wageningen Pers, 2000: 33–45.
5. Pravilnik o zdravstveni ustreznosti pitne vode. Ur List RS 46/97, 52/97, 54/98, 7/00, 19/04.
6. Rouse RH. Feed fats quality and handling characteristics. Presented at the Multi-state Poultry Meeting. Cincinnati, Ohio, 20-22 May, 2003.
7. Schroeder JW, Sedivec K. Sampling feed for analysis. North Dakota State University Extension Service, AS-1064, 2012.
8. ES. Uredba komisije (ES) št. 691/2013 z dne 19. julija 2013 o spremembi uredbe (ES) št. 152/2009 glede določitve metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. Ur List EU 2013; L 197: 1–12. (20. 7. 2013)
9. Uršič S, Petrovič A, Uršič A. Odvzem vzorcev v sanitarni mikrobiologiji. In: Sanitarna mikrobiologija v javnem zdravstvu. Laško: Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD, 2002: 185–94.

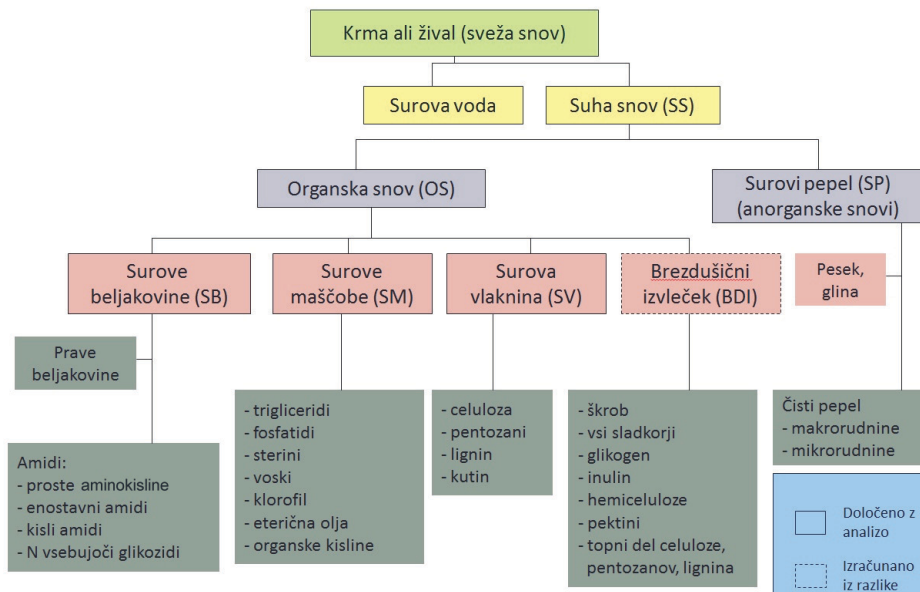
3 DOLOČANJE OSNOVNIH SKUPIN HRANILNIH SNOVI

Vzorec krme pošljemo na laboratorijske analize zaradi različnih razlogov. Eden je zagotovo izvajanje uradnega nadzora z namenom preverjanja skladnosti lastnosti krme z zakonodajo ter s pravili o zdravstvenem varstvu in zaščiti živali. Z analizo krme lahko preverjamo podatke iz deklaracije in tako ugotavljamo, ali je sestava za določeno živalsko vrsto ustrezna. Namen analize krme je lahko tudi ocena kvalitete krme, ki se zaradi različnih dejavnikov (to so na primer vremenski vplivi, gnojenje, zatiranje škodljivcev, skladiščenje) zelo spreminja. Na osnovi rezultatov analize krme lahko sestavimo ustrezen obrok in sestavimo optimalno krmno mešanico, če ob tem poznamo potrebe posamezne živalske vrste. Pri znanstveno-raziskovalnem delu, na primer v zvezi z uvajanjem novih surovin v krmo za živali, so ustrezni analitski rezultati bistvenega pomena.

30

3.1 WEENDSKA ANALIZA

Weendska analiza je že dolgo poznana klasična kvantitativna kemijska analiza, ki še vedno velja za zlati standard. Ime ima po raziskovalni postaji Weende v Göttingenu v Nemčiji, kjer sta jo leta 1865 razvila Henneberg in Stohmann. Sprva je bila Weendska analiza namenjena predvsem ločevanju ogljikovih hidratov na dve glavni skupini in sicer na surova vlakna in na brezdušični izvleček. Število posamičnih hranilnih snovi je v nekem vzorcu hrane oziroma krme lahko zelo veliko (več kot 50), zato je vse praktično nemogoče določiti. Hranilne snovi zato razdelimo na šest osnovnih skupin, ki jih določimo s postopkom Weendske analize: suha snov (SS), surove maščobe (SM), surove beljakovine (SB), surov pepel (SP), surova vlaknina (SV) in brezdušični izvleček (BDI). Prvih pet skupin določimo s kemijskimi analizami, brezdušični izvleček pa izračunamo (slika 10).



Slika 10: Kemijska sestava krme po Weendski analizi (povzeto po Lavrenčič, 2003)

Weendška analiza ima svoje prednosti, ima pa tudi nekaj slabosti, ki jih moramo poznati in pri interpretaciji rezultatov upoštevati. Weendsko analizo učinkovito uporabljamo v praksi, ker je dogovorjena, standardizirana in cenovno ugodna metoda. Potek analize je enostaven, razmeroma hiter (celotno analizo lahko zaključimo v dveh dneh) in ne zahteva predrage opreme. Spada v skupino empiričnih metod, pri katerih so rezultati pogosto odvisni od uporabljene metode določevanja, zato se je pri izvedbi analize potrebno natančno držati predpisanega standardnega postopka. Samo na takšen način dobljeni rezultati so točni, ponovljivi in primerljivi.

Kot že omenjeno, ima Weendška analiza tudi nekaj slabosti. Zavedati se moramo, da določamo le skupine hranilnih snovi oziroma njihovo količino, pri tem pa ne dobimo nobenega podatka o tem, kakšna je njihova sestava in fiziološka vrednost za posamezno vrsto živali. Te podatke dobimo z drugimi analizami kot sta na primer preiskava aminokislinske sestave in maščobnokislinske sestave ali pa iz literature. Nadalje nekaterih skupin hranilnih snovi (na primer BDI) ne določamo analitsko, temveč računsko, zato moramo biti pozorni, saj se vse prej narejene napake pri izračunu BDI seštevajo. Vzorec krme, ki ga analiziramo, običajno vsebuje različne hlapne snovi, kot so hlapne maščobne kisline in arome. Te ob sušenju vzorca izhlapevajo, zato vsebnost SS v vzorcu ni popolnoma točna. Ob sežigu vzorca izhlapevajo tudi nekatere anorganske snovi, zato tudi rezultat glede na SP v nekaterih primerih ni čisto korekten. Dušikove spojine, kot so na primer fosfolipidi, se pojavljajo kot rezultat meritev v dveh skupinah hranilnih snovi in sicer kot SB in SM.

Vse omenjene napake so del rutinske Weendške analize. Pravilno je, da pri vsaki skupini hranilnih snovi vedno uporabljamo pridevnik »surov«, ki nas spomni, da dobljeni rezultat lahko skriva napake.

Največja pomanjkljivost Weendske analize je povezana z določevanjem SV in BDI oziroma skupine ogljikovih hidratov. Da bi o tem dobili natančnejše podatke, moramo narediti analizo po Van Soestu, ki bo opisana kasneje v poglavju 3.2.

3.1.1 DOLOČANJE VLAGE

Vsebnost vlage oziroma suhe snovi (SS) v vzorcu je za kakovost krme zelo pomembna. Od vsebnosti vlage je odvisna obstojnost krme med skladiščenjem, dovzetnost za kvarjenje ter količina, ki jo je žival sposobna zaužiti. Kljub temu, da SS ni hranilna snov v pravem pomenu besede, je njeno določanje bistveno, saj vsebnosti hranilnih snovi v različnih krmilih pogosto podajamo na 100 % SS. Na takšen način lahko krmila med seboj primerjamo.

Vlago oziroma SS v vzorcu določimo s postopkom sušenja v sušilniku. Sušimo toliko časa, da se masa več ne spreminja oziroma da izhlapijo vse snovi. Pravimo, da vzorec sušimo do konstantne mase. Suho snov določimo kot razliko v masi vzorca pred in po sušenju. Ker lastnosti vzorca pri sušenju spremenimo, vzorec ni več uporaben za druge analize. Nekatere vrste krme (predvsem zelo vlažne) običajno vsebujejo snovi, ki pri sušenju lahko izhlapijo. To so kratkoverižne maščobne kisline (ocetna, propionska, maslena...) in olja (na primer mentol, kafa...). Sušenje vzorcev pri 103°C povzroči zato tudi izgubo hlapljivih snovi, kar pomeni večjo vlago oziroma nižjo vrednost suhe snovi. Na sliki 11 prikazujemo tehtiče za sušenje vzorcev.


32



Slika 11: Tehtiči za določanje vlage v vzorcih krme

AKTIVNOST VODE

Obstojnost krme med skladiščenjem in dovzetnost za kvarjenje je v veliki meri odvisna od količine vlage v krmi, zato včasih določamo tudi t.i. termodinamsko aktivnost vode (a_v). Pomeni količino vode v krmi, ki je na voljo za mikrobo in je poleg temperature najpomembnejši dejavnik okolja, ki vpliva na razvoj mikrobov. Aktivnost vode matematično izrazimo kot razmerje med parnim tlakom snovi (P) in parnim tlakom čiste vode (P_0) pri isti temperaturi (glej formulo).



$$a_v = \frac{P}{P_0}$$

Ker je preprečevanje rasti mikroorganizmov v krmi in živilih zelo pomembno, so določili minimalno aktivnost vode, pri kateri mikroorganizmi še rastejo. Bakterije potrebujejo večjo aktivnost vode od kvasovk, te pa potrebujejo večjo aktivnost vode od plesni. Plesni se torej pojavljajo v krmi in živilih z nižjo aktivnostjo vode. To lahko v krmi in živilih zmanjšamo, na primer s sušenjem, dodajanjem vodotopnih snovi (sol, sladkor) ali z zamrzovanjem (voda kristalizira). Npr. mejna vrednost za *L. monocytogenes* v živilih je 0,93.

PROTOKOL ŠTEVILKA 1: DOLOČANJE VLAGE

KRMA IN ŽITA

1. Tehtič s pokrovom stehtamo na 0,001 g natančno.
2. V tehtič natehtamo približno 5 g zmletega vzorca oziroma homogene zmesi, ga pokrijemo s pokrovom in stehtamo na 0,001 g natančno.
3. Tehtič z odprtim pokrovom postavimo v sušilnik, ki ga za sušenje vzorcev žit predhodno ogrejemo na 130°C, za sušenje ostalih vzorcev pa na 103°C (žita).
4. Pri vzorcih žit sušenje zaključimo po 2 urah, v primeru drugih vzorcev pa po 4 urah. Tehtič pokrijemo s pokrovom in ga postavimo v eksikator.
5. Pustimo 30 do 45 minut, da se tehtič z vzorcem ohladi.
6. Ohlajeni tehtič stehtamo na 0,001 g natančno.

KRMA Z VEČJO VSEBNOSTJO VLAGE

Vzorci z večjo vsebnostjo vlage, ki otežuje mletje (silaža, sveža trava, pesni rezanci...), predhodno posušimo.

1. Vzorec razdelimo na dva čim bolj enaka homogena podvzorca mase vsaj 50 g. Optimalno je, če naredimo pri silaži dva podvzorca po 200 g, pri travi pa po 100 g.
2. Podvzorca položimo na pladnja iz papirja ali alufolije, ki smo ju pred tem stehtali na 0,001 g natančno.
3. Vsak pladenj z vzorcem stehtamo na 0,001 g natančno.
4. Pladenj z vzorcem položimo v sušilnik, predhodno ogret na 60°C in sušimo čez noč. Vmes vzorce premešamo.
5. Pladenj z vzorcem vzamemo iz sušilnika, ga ohladimo na zraku (1 uro) in stehtamo na 0,001 g natančno.
6. Podvzorca združimo, ju zmeljemo in naprej sušimo po zgoraj opisanem postopku za krmo in žita.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE VLAGE

Datum:

Analitik:

Številka vzorca	Vrsta vzorca	Temp. sušenja	Oznaka tehtiča	Masa tehtiča (g)	Masa tehtiča+vzorca pred sušenjem (g)	Masa tehtiča+vzorca po sušenju (g)	Masa vzorca pred sušenjem	SS (%)	Povprečni rezultat SS (%)	Povprečni rezultat vlage (%)

Opombe:

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Vsebnost vlage, izraženo v odstotkih, v krmi in žitih izračunamo po enačbi:

$$\text{vsebnost vlage (\%)} = \frac{m \text{ (tehtič z vzorcem pred sušenjem)} - m \text{ (tehtič s posušenim vzorcem)}}{\text{zatehta vzorca}^*} \times 100$$

$$*\text{zatehta vzorca} = m \text{ (tehtič z vzorcem in pokrovom)} - m \text{ (tehtič s pokrovom, brez vzorca)}$$

Rezultat lahko izrazimo tudi kot vsebnost suhe snovi (SS), izraženo v odstotkih:

$$\text{vsebnost SS (\%)} = 100 - \text{vsebnost vlage (\%)}$$

Pri postopku s predhodnim sušenjem izračunamo vlago po zgornji formuli za vsak del postopka ločeno, vendar namesto mase tehtiča uporabimo maso pladnja. Končni rezultat za suho snov in vlago izračunamo pa enačbi:

$$SS_{\text{celotna}} = SS_1 \times SS_2 \times 0,01$$

SS_1 – suha snov, dobljena s predhodnim sušenjem

SS_2 – suha snov, dobljena z nadaljnjim sušenjem

$$\text{vsebnost vlage (\%)} = 100 - SS_{\text{celotna}} (\%)$$

Za vzorce tekoče ali kašaste krme (npr. hrana za pse in mačke v pločevinkah) izračunamo vlago po naslednjih enačbah:

$$\text{vsebnost vlage (\%)} = \frac{m \text{ (tehtič z vzorcem)} - m \text{ (tehtič s posušenim vzorcem)} \times 100}{\text{zatehta vzorca} \times f}$$

f – razmerje med maso vzorca in vsoto mase vzorca in mase brezvodnega, pred analizo posušenega kvarčnega peska

$$f = \frac{m \text{ vzorca}}{m \text{ vzorca} + m \text{ peska}}$$

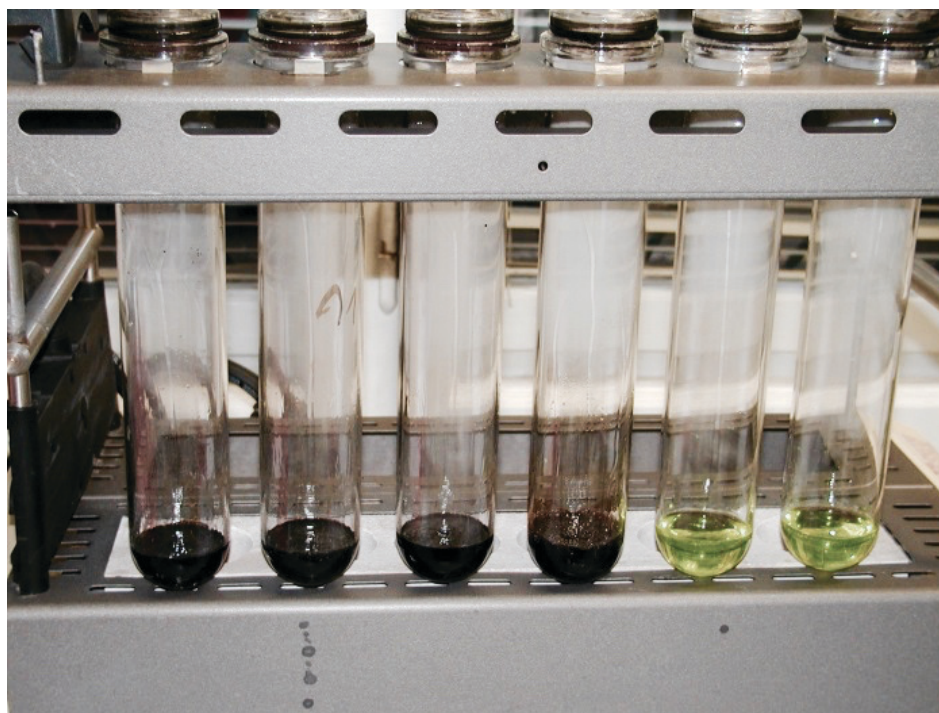
3.1.2 DOLOČANJE SUROVIH BELJAKOVIN (SB)

SB v vzorcih krme določamo z metodo po Kjeldahlu. Kjeldahl je bil danski znanstvenik, ki je metodo za določanje SB razvil leta 1883. Ukvarjal se s postopki varjenja piva in ugotovil, da je vsebnost beljakovin v ječmenu lahko zelo različna in močno vpliva na kakovost končnega izdelka. Metoda se je do danes tehnično precej spremenila, glede zamisli pa je še vedno enaka. S Kjeldahlovo metodo ne določimo količine beljakovin v vzorcu, temveč količino dušika v vzorcu, zato govorimo o surovih beljakovinah oziroma o vseh snoveh, ki vsebujejo dušik. To pomeni, da surove beljakovine poleg pravih beljakovin vsebujejo tudi druge dušične spojine, ki vsebujejo dušik. Beljakovine v povprečju vsebujejo 16 % dušika, zato upoštevamo pri preračunu faktor 6,25 ($100 \div 16$). Ker je količina dušika v različnih beljakovinah različna (soja 17,5 %; mleko 6,37 %; ječmen, pšenica, oves 17,1 %), izračun SB iz vsebnosti dobljenega dušika ni popolnoma natančen, vendar kljub temu ustreza za praktično uporabo.

Metodo po Kjeldahlu sestavlja priprava vzorca z žvepleno kislino in destilacija ter titracija sproščenega amonijaka. Na začetku analize v stekleno Kjeldahlovo epruveto natehtamo vzorec. Dodamo koncentrirano žvepleno kislino in v epruveti kuhamo (mokri sežig; slika 12), dokler se raztopina ne zbistri (slika 13). Dušik iz vzorca v postopku mokrega sežiga reagira z žvepleno kislino in nastane amonijev sulfat. Po končanem razklopu pustimo, da se vsebina v epruvetah ohladi.



Slika 12: Vzorci krme v koncentrirani žvepleni kislini



Slika 13: Kuhanje vzorcev do zbistritve tekočine

Epruveto z ohlajenim vzorcem vstavimo v aparat in dodamo koncentrirano bazo (32 % NaOH) v prebitku, da reagira z amonijevim sulfatom (slika 14). Posledica je izločanje amonijaka, ki ga preko destilacijskega hladilnika lovimo v kislino poznane koncentracije. Destilacija traja dve minuti, amonijak reagira s kislino in zato se pH raztopine večja. Ko je postopek destilacije končan, vnesemo v titracijski aparat podatek o zatehti vzorca in oznako vzorca, nato začne aparat sam dozirati 0,1 M HCl. Titracija je zaključena, ko je ves nastali amonijak nevtraliziran. Dobljeno porabo kisline (mL) pri titriranju množimo s faktorjem, ki upošteva razredčitve in količino N v beljakovinah, rezultat pa nam predstavlja g/kg surovih beljakovin v vzorcu. Rezultat izrazimo v %.

38



Slika 14: Dodajanje baze in destilacija amonijaka

PROTOKOL ŠTEVILKA 2: DOLOČANJE SUROVIH BELJAKOVIN

1. V Kjeldahlovo epruveto natehtamo 1 g (če je pričakovana vsebnost beljakovin v vzorcu pod 40 %) oziroma 0,5 g ali manj (če je pričakovana vsebnost beljakovin v vzorcu nad 40 %) dobro zmletega in homogeniziranega vzorca.
2. Kot katalizator dodamo 2 tableti Kjeldahl (vsebuje npr. mešanico CuSO_4 in K_2SO_4) in 25 mL koncentrirane žveplene kisline (H_2SO_4).
3. Kjeldahlove epruvete vstavimo v Kjeldahlov aparat, kjer vzorce segrejemo do vrenja. Vreti pustimo 1,5 ure, da raztopina vzorca v epruveti postane bistra.
4. Raztopino ohladimo in previdno dodamo deionizirano vodo.
5. Epruveto namestimo v destilacijsko enoto sistema Kjeldahl. Opravimo postopek destilacije, ki traja dve minuti. Ko se postopek zaključi, vnesemo v titracijski aparat podatek o zatehti vzorca in oznako vzorce. Aparat sam dozira 0,1 M HCl. Titracija se zaključi, ko je ves nastali amonijak nevtraliziran.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE SUROVIH BELJAKOVIN

Datum:


Analitik:

Št	Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Rezultat (%)	Povprečni rezultat (%)

Opombe:

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Vsebnost beljakovin v krmi, izraženo v g/kg, izračunamo po enačbi:


$$\text{vsebnost beljakovin } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right) = \frac{V \times C \times M(N) \times 6,25}{m}$$

V – volumen (mL) HCl, porabljene pri titraciji

C – koncentracija HCl izražena v mol/L

M(N) – molska masa dušika (14 g/mol)

m – zatehta vzorca (g)

NE POZABIMO!

- Surove beljakovine vključujejo vse dušične spojine, torej prave beljakovine in nebeljakovinske dušične snovi.

3.1.3 DOLOČANJE SUROVIH MAŠČOB (SM)

Surove maščobe določamo z ekstrakcijo z etrom ali drugim primernim organskim topilom v Soxhletovem aparatu. Izraz ekstrakcija pomeni izločanje trdnih ali tekočih zmesi s topilom tako, da se pri tem snov kemično ne spremeni. Pri tem v ekstrakt ne preidejo le prave masti in olja, ampak tudi veliko drugih, v organskih topilih topnih spojin (klorofil, rastlinski voski, smole, pigmenti...), ki jih živali ne morejo izkoristiti kot vir energije. Zato uporabljamo izraz surove maščobe, ki zajema vse snovi, topne v organskih topilih. Slednje moramo še posebno upoštevati pri dobljenih rezultatih za voluminozno krmo, ki je revna z maščobami in bogata z barvili.

Surove maščobe živalskega izvora so pretežno prave maščobe. Ker se del v etru topnih snovi lahko ekstrahira šele po razbitju strukture vzorca (mlečni proizvodi, kostna moka, pasja/mačja hrana,...), moramo pred ekstrakcijo z etrom narediti razklop vzorca s klorovodikovo kislino (HCl). Ta postopek imenujemo tudi hidroliza maščob. Po tem postopku določen delež maščob imenujemo skupne maščobe.

Vzorec natehtamo v papirnato vrečko in ga damo v Soxhletov aparat (slika 15). Pred pričetkom postopka ekstrakcije lonček, v katerega lovimo ekstrahirano maščobo, stehamo. V lonček nalijemo eter ter ga segrevamo. Ko eter vre, po cevki potuje do hladilnika, kjer se hladi in utekočinja ter kaplja čez vzorec (slika 16). Proces traja dve uri, nato eter odparimo in na dnu lončka ostane maščoba (slika 17). Eter veže tudi vodo, zato lonček sušimo eno uro v sušilniku. Nato ga ohladimo, stehamo in izračunamo odstotek surovih maščob.

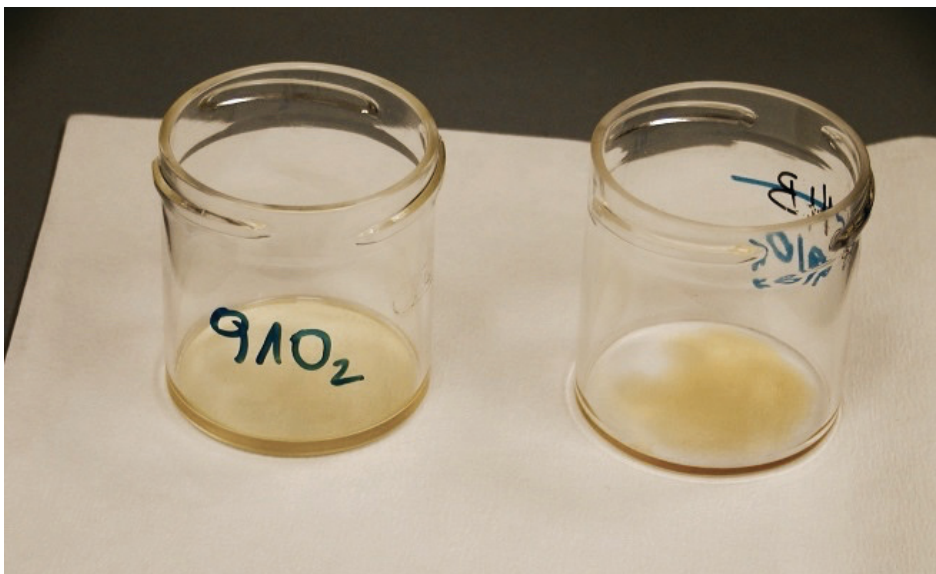
42



Slika 15: Vzorec v papirnati vrečki



Slika 16: Soxhletov aparat



Slika 17: Lončka s surovo maščobo

PROTOKOL ŠTEVILKA 3: DOLOČANJE SUROVIH MAŠČOB

1. Stekleni lonček stehtamo.
2. V vrečko iz papirja natehtamo približno 5 g vzorca na 0,001 g natančno.
3. Vrečko vložimo v stekleni tulec na Soxhletovem aparatu.
4. V stekleni lonček nalijemo 120 mL petroletra in lonček vstavimo v Soxhletov aparat.
5. Vzorec ekstrahiramo 120 minut. Ob koncu ekstrakcijskega postopka mora biti topilo v ekstrakcijskem nastavku.
6. Ekstrakt v lončku sušimo pol ure pri 100 ± 3 °C.
7. Lonček z ekstraktom ohladimo v eksikatorju in ga ohlajenega stehtamo.

DOLOČANJE SUROVIH MAŠČOB S HIDROLIZO

Vzorci, ki vsebujejo maščobo živalskega izvora, pred ekstrakcijo s petroletrom v Soxhletovem aparatu obdelamo s klorovodikovo kislino.

1. V erlenmajerjevo steklenico natehtamo 2,5 do 3 g vzorca na 0,001 g natančno.
2. Dolijemo 80 mL vode in 80 mL 37 % klorovodikove kisline ter erlenmajerjevo steklenico pokrijemo z urnim steklom. Dobljena raztopina je približno 6 M.
3. Raztopino segrejemo do vrenja in pustimo vreti 1 uro.
4. Po končanem kuhanju raztopino razredčimo z nekaj vrele vode in še vroče filtriramo.
5. Vzorec spiramo z vročo vodo do negativne reakcije na klorid z AgNO_3 (srebrov nitrat)*
6. Filtrirni papir s preostankom vzorca sušimo v sušilniku 1,5 ure pri 100 ± 3 °C.
7. Filter vložimo v stekleni tulec in nadaljujemo z ekstrakcijo v Soxhletovem aparatu.

*V epruveto nalijemo nekaj mL srebrovega nitrata in dodamo enako količino filtrirata. Če so v filtratu še kloridi, ki nastanejo ob reakciji s HCl, bo v raztopini nastala oborina oziroma bo mešanica postala motna. Ko kloridov ni več, ostane raztopina po dodatku filtrata bistra.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE SUROVIH MAŠČOB

Datum:


Analitik:

Št.	Datum	Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Masa posodice (g)	Masa posodice+maščobe (g)	Rezultat (%)	Povprečni rezultat (%)

Opombe:

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Vsebnost maščobe v krmi izračunamo tako:


$$\text{vsebnost maščobe (\%)} = \frac{m \text{ (lonček z maščobo)} - m \text{ (prazen lonček)}}{\text{zatehta vzorca}} \times 100$$

m – masa (g)

NE POZABIMO!

- Surove maščobe vključujejo vse spojine, topne v organskih topilih: poleg pravih maščob torej še ostale snovi, ki jih živali ne morejo izkoristiti kot vir energije.

3.1.4 DOLOČANJE SUROVEGA PEPELA (SP)

Surovi pepel določamo s sežigom vzorca krme pri visoki temperaturi. Na ta način v vzorcu sežgemo vse organske snovi, ostanejo pa nam anorganske, ki jih stehamo in imenujemo surovi pepel (slika 18). Tako kot pri določanju suhe snovi oziroma vlage v vzorcu, tudi pri določanju surovega pepela ne dobimo popolnoma natančnega rezultata, saj pri sežigu izhlapevajo nekateri minerali (Se, Pb, Cd). Surovi pepel prav tako ne pomeni čiste anorganske snovi, saj vsebuje tudi organski material (na primer žveplo in fosfor iz beljakovin). Vsebuje lahko tudi primesi kot sta pesek in glina. Te določimo tako, da surovi pepel raztopimo v kislini. Del, ki je v kislini netopen, so primesi.

Določitev surovega pepela nam ne da podatka o vsebnosti posameznih mineralov v vzorcu, temveč o vsebnosti vseh mineralov v vzorcu. Običajno iz pepela nadalje določamo minerale s spektrofotometričnimi ali drugimi metodami (ICP-MS, atomska absorpcija...).



Slika 18: Žarilna lončka s pepelom

PROTOKOL ŠTEVILKA 4: DOLOČANJE SUROVEGA PEPELA

1. Stehtamo žarilni lonček.
2. V žarilni lonček natehtamo približno 5 g vzorca na 0,001 g natančno.
3. Žarilni lonček z vzorcem postavimo v žarilno peč.
4. Vzorec žgemo pri temperaturi $550 \pm 5^{\circ}\text{C}$, dokler ne dobimo belega, svetlo sivega ali rdečkastega pepela brez karboniziranih ostankov, to je približno 6 ur.
5. Žarilni lonček vzamemo iz peči in postavimo v eksikator, da se ohladi.
6. Ohlajeni lonček z vzorcem stehtamo.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE SUROVEGA PEPELA

Datum:


Analitik:

Št.	Datum	Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Oznaka lončka	Masa lončka (g)	Masa lončka+pepela (g)	Rezultat (%) posodice+maščobe (g)	Povprečni rezultat (%)


Opombe:

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Vsebnost surovega pepela (SP) v krmi, izraženo v odstotkih, izračunamo po enačbi:


$$\text{vsebnost SP (\%)} = \frac{m (\text{lonček s pepelom}) - m (\text{prazen lonček})}{m (\text{zatehta vzorca})} \times 100$$

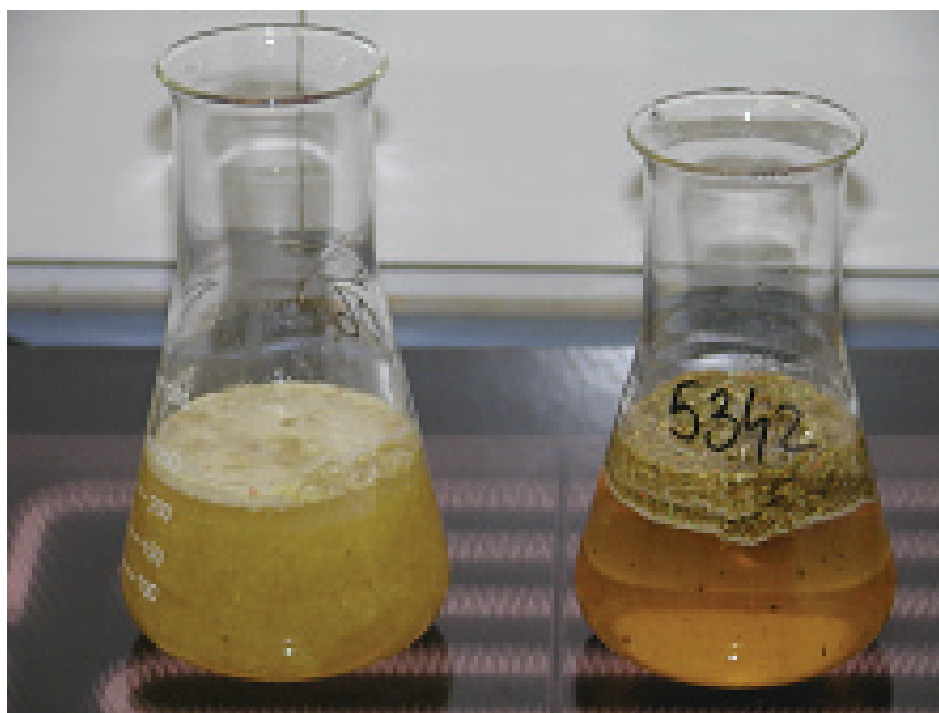
m - masa


$$\text{vsebnost organske snovi (OS) (\%)} = \text{vsebnost SS (\%)} - \text{vsebnost SP (\%)}$$

3.1.5 DOLOČANJE SUROVE VLAKNINE (SV)

Surova vlaknina je splošen izraz, ki ga uporabljamo za snovi, netopne v kislini in bazi. Postopek je podoben procesom prebave v organizmu (najprej kislino, potem bazično okolje; ni pa delovanja encimov). Je tisti del krmila, ki ni prebavljiv in vsebuje netopne ali slabo topne ogljikove hidrate. Mednje prištevamo celulozo, del hemiceluloze, pentozane, heksozane in lignin.

Surovo vlaknino določamo tako, da vzorec najprej kuhamo v kislem mediju in nato še v bazičnem (slika 19). Vsebino nato prefiltriramo in speremo (slika 20). Ostanek, ki je netopna snov v kislinah in bazah, še žgemo, da odstranimo anorganske snovi. Na koncu s tehtanjem izračunamo količino surove vlaknine v vzorcu.



Slika 19: Kuhanje vzorca v kislem in bazičnem mediju



52

Slika 20: Filtriranje vzorca

PROTOKOL ŠTEVILKA 5: DOLOČANJE SUROVE VLAKNINE

1. V erlenmajerjevo steklenico natehtamo 1 g vzorca na 0,001 g natančno.
2. Dolijemo 150 mL 0,13 M žveplene kisline. Mešanica naj zavre v 5 ± 2 minutah. Pustimo, da močno vre točno 30 minut.
3. Vzorec prefiltriramo skozi steklen filtrirni lonček, v katerega damo 1 g diatomejske zemlje.
4. Ostanek 3x speremo s 30 mL vrele vode.
5. Ostanek vzorca skupaj z diatomejsko zemljo stresemo v erlenmajerjevo steklenico in prilijemo 150 mL 0,23 M kalijevega hidroksida (KOH). Mešanica naj zavre v 5 ± 2 minutah. Pustimo, da močno vre točno 30 minut.
6. Vzorec prefiltriramo in spiramo enako kot v točki 4.
7. Ostanek speremo še 3x s 25 mL acetona.
8. Ostanek posušimo v sušilniku pri 130°C do konstantne mase.
9. Ohladimo v eksikatorju in stehtamo.
10. Vzorec zažgemo v peči pri $475\text{--}500^{\circ}\text{C}$ (vsaj 30 minut).
11. Ohlajen vzorec ponovno stehtamo.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE SUROVE VLAKNINE

Datum:

Analitik:

Št.	Datum	Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Oznaka lončka	Masa po sušenju (g)	Masa po žarenju (g)	Rezultat (%) posodice+maščobe (g)	Povprečni rezultat (%)

Opombe:

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Vsebnost surove vlaknine (SV) v vzorcu krme, izražene v odstotkih, izračunamo po naslednji enačbi:



$$\text{vsebnost SV (\%)} = \frac{m \text{ (vzorca+lončka pred žarenjem)} - m \text{ (masa vzorca+lončka po žarenju)}}{\text{zatehta vzorca}} \times 100$$

3.1.6 DOLOČANJE BREZDUŠIČNEGA IZVLEČKA (BDI)

Brezdušični izvleček (BDI) je zelo raznolika skupina snovi, ki jo v glavnem sestavljajo ogljikovi hidrati. Poleg teh pa BDI vsebuje tudi druge organske snovi, kot so organske kisline, del lignina, kutina in podobno. BDI vsebuje topne ogljikove hidrate v krmi, kot so škrob in različni sladkorji, medtem ko surova vlaknina vsebuje netopne ogljikove hidrate.

BDI ne določamo analitsko ampak ga izračunamo s pomočjo rezultatov, ki jih dobimo pri analizi SB, SM, SP, SV in SS. Morebitne napake pri analitiki teh snovi se pri računanju BDI seštejejo, kar je že omenjena slabost Weendske analize.

BDI izračunamo po naslednjih enačbah:

$$BDI (\%) = \text{sveža snov-vlaga} (\%) - SP (\%) - SM (\%) - SB (\%) - SV (\%)$$

$$BDI (\%) = SS (\%) - SP (\%) - SM (\%) - SB (\%) - SV (\%)$$

$$BDI (\%) = OS (\%) - SM (\%) - SB (\%) - SV (\%)$$

$$BDI (\%) = 100 \% - ((SP (\%) + SM (\%) + SB (\%) + SV (\%) + \text{vlaga} (\%)))$$

56

3.2 ANALIZA OGLJIKOVIH HIDRATOV PO VAN SOESTU

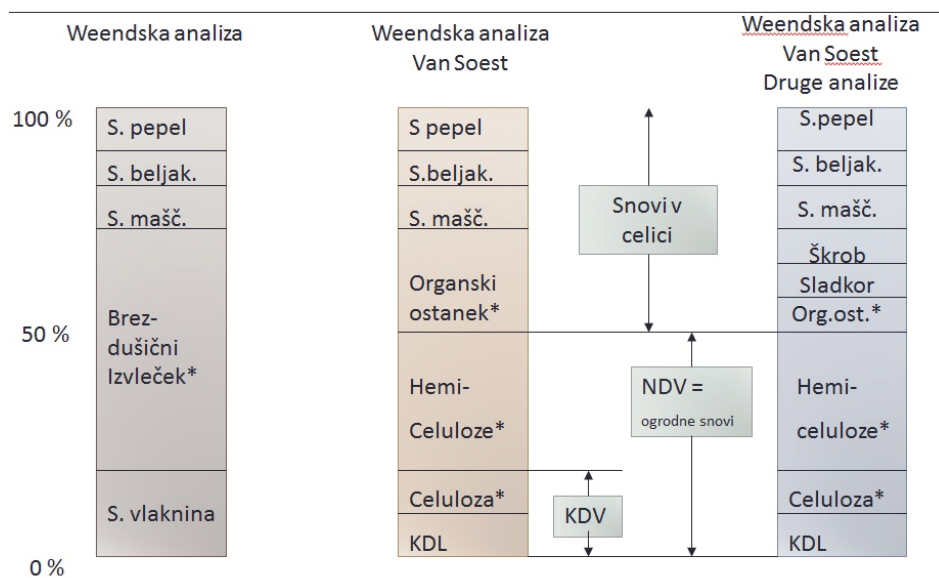
Večkrat smo že omenili, da je največja pomanjkljivost Weendske analize določevanje SV in BDI, ker obe skupini vsebujeta ogljikove hidrate. V skupino SV spadajo manj, v skupino BDI pa bolj prebavljivi ogljikovi hidrati.

V vlaknini so snovi, ki sestavljajo rastlinsko celično steno in se v prebavilih ljudi ali živali pod vplivom encimov ne prebavijo. Kljub temu ima vlaknina v procesu prebave velik pomen. Če vlaknino določamo po postopku Weendske analize, pri tem ne zajamemo vseh sestavin celične stene, kot so na primer hemiceluloza in pektini, ki so popolnoma topni, ali celuloza in lignin, ki sta delno topna. Omenjene težave lahko rešimo z dodatno analizo vzorca po Van Soestu, pri kateri z detergentsko analizo vlaken ogljikove hidrate razvrstimo glede na topnost v različnih topilih. Določamo naslednje skupine (slika 21):

- vlakna, netopna v nevtralnem detergentu (NDV): sem uvrščamo ogrodne celične snovi – celulozo, hemicelulozo in lignin. Te snovi pogosto enačimo z rastlinsko celično steno. Količina NDV se v rastlini s starostjo rastline povečuje. Če je v rastlinah več NDV, bodo živali zaužile manj suhe snovi, zaužito hrano pa bodo bolj prežvečile. NDV je tudi dober pokazatelj kakovosti krme in zrelosti rastlin. Krma slabe kvalitete vsebuje več kot 50% NDV. Leguminoze so dobre kvalitete takrat, ko vsebujejo manj kot 40% NDV. Dobra voluminozna krma vsebuje manj kot 50% NDV, slaba pa več kot 60%.
- Vlakna, netopna v kislem detergentu (KDV): sem uvrščamo celulozo, lignin, kutin in v kislini netopen pepel. To so slabo prebavljive sestavine celične stene. KDV se pogosto uporablja za napovedovanje energetske vrednosti krmil, lahko pa na podlagi KDV ocenjujemo tudi kakovost krme. Večje vrednosti KDV (nad 35%) kažejo na slabšo kakovost krme (leguminoze in voluminozna krma).
- V kislem detergentu netopni lignin (KDL)
- Nevlaknasti ogljikovi hidrati (NVOH): so tisti del vzorca, ki je v celični vsebini poleg SM, SP in SB. Z drugimi analizami jih lahko razdelimo še na škrob in sladkorje.

Skupine hranljivih snovi pri weendski analizi in pri analizi po Van Soestu z dodanimi analizami

57



* - izračunano

Legenda: S-surovo; org. ost. – organski ostanek; NDV- vlakna, netopna v nevtralnem detergentu; KDV - vlakna, netopna v kislem detergentu, KDL - v kislem detergentu netopni lignin

Slika 21: Skupine hranljivih snovi pri Weend'ski analizi in pri analizi po Van Soestu z dodanimi analizami (povzeto po Lavrenčič, 2003)

LITERATURA

1. Galyean ML. Laboratory procedures in animal nutrition research. Lubbock: Texas University, 2010.
2. Givens DI, Owen E, Omed HM. Forage analyses: procedures. In: Undersander D, Mertens DR, Thiex N, eds. Forage evaluation in ruminant nutrition. Omaha: National Forage Testing Association, 1993: 49–51.
3. Lavrenčič A. Vaje pri predmetu Prehrana domačih živali. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2003: 14–22.
4. Mason S. Understand your feed analysis report. Calgary: Alberta Daily Management, 2000.
5. Mueller-Harvey I. Modern techniques for feed analysis. In: FAO. Assessing quality and safety of animal feeds. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2004: 8–14.
6. Rutherford SM, Moughan PJ. Developments in the determination of protein and amino acids. In: Moughan PJ, Verstegen MWA, Visser-Reyneveld MI, eds. Feed evaluation, principles and practise. Wageningen: Wageningen Academic Publisher, 2000: 45–54.
7. Van Saun RJ. Determining forage quality: understanding feed analysis. Lamalink.com 2006; 3(8): 18–26.
8. Vojkovič M. Vpliv okoljskih parametrov na rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A: diplomsko delo. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Univerza v Ljubljani, 2008: 6–7.

4 OSNOVNE KROMATOGRFSKE TEHNIKE ZA ANALIZO KRME

Kromatografija je analizna tehnika, s katero ločujemo posamezne spojine v zmesih. Osnovno vodilo kromatografije je potovanje raztopljene zmesi v mobilni fazi skozi stacionarno fazo, kjer se snovi med seboj ločijo zaradi različnih fizikalnih in kemijskih lastnosti. Stacionarna faza je običajno v kromatografski koloni, mobilna faza je običajno plin ali tekočina (odvisno od tipa kromatografije), ki se pomika skozi kromatografsko kolono. Porazdelitev spojin med stacionarno in mobilno fazo v neki zmesi je odvisna od njihove hlapnosti, polarnosti, funkcionalnih skupin, pri izločitveni kromatografiji pa tudi od velikosti molekul.



Tehniko je v začetku 20. stoletja razvil ruski botanik Mikhail Tsvet (na fotografiji), ki je proučeval pigmente kot so klorofili in ksantofili v listih rastlin. Rastlinski ekstrakt je prelil v steklene kolone, napolnjene s kalcijevim karbonatom. Posamezni pigmenti so se pokazali kot raznobarvni pasovi v stekleni koloni, kar je metodi dalo ime. Kromatografija v grščini pomeni: *chroma* – barva in *graphein* – pisati.

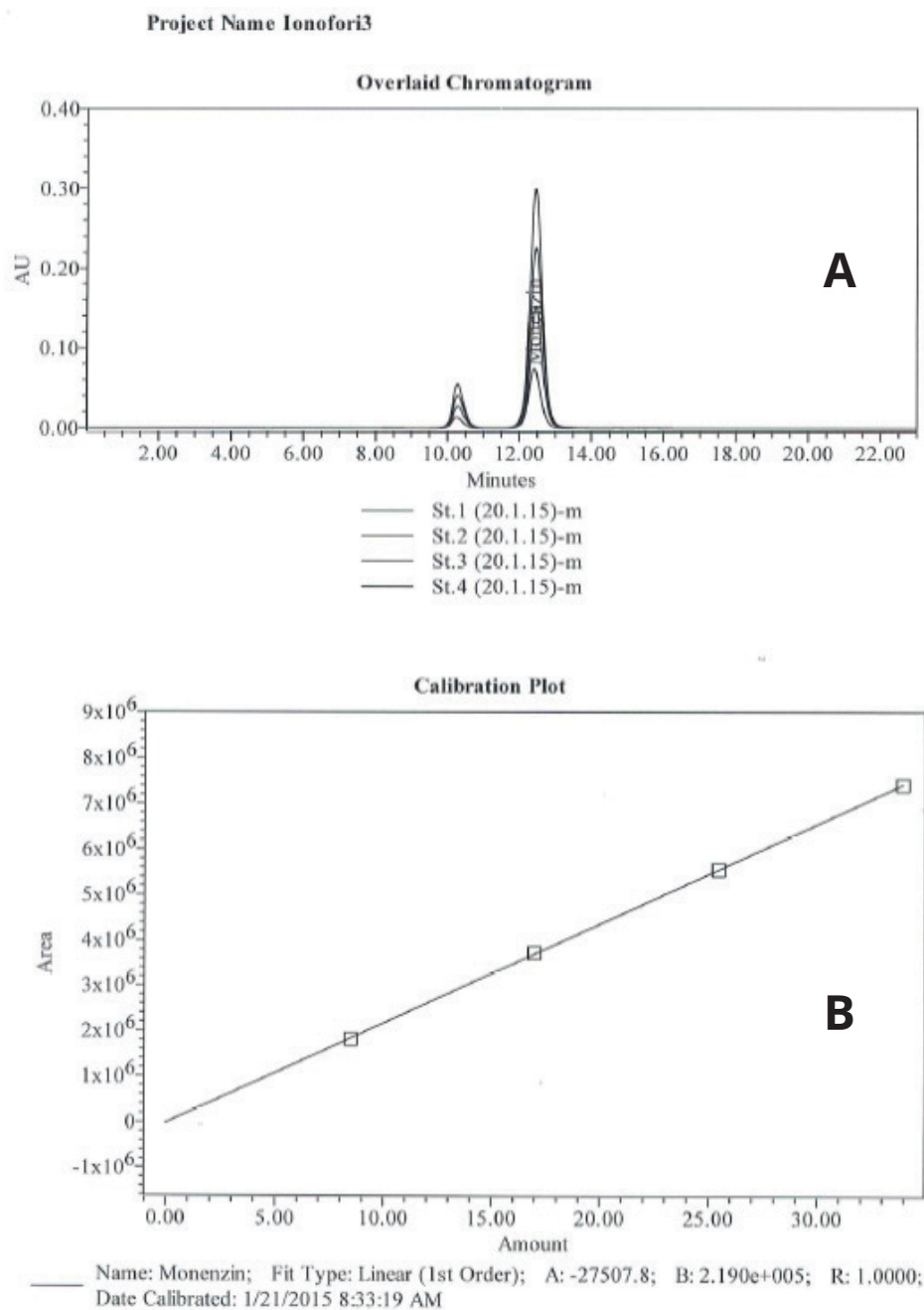
Zanimivost!

Tsvet v ruščini pomeni barva ali cvetenje.

Pri kvantitativnem določanju neke snovi moramo najprej ugotoviti povezavo med velikostjo odziva detektorja in koncentracijo snovi, ki jo določamo. To naredimo tako, da izmerimo odzive raztopin referenčnih standardov z znanimi koncentracijami in narišemo diagram odvisnosti velikosti odziva od koncentracije analita. Na abscisni osi so koncentracije standarda, na ordinatni pa površine kromatografskega vrha. Skozi dobljene točke narišemo krivuljo, ki jo imenujemo umeritvena krivulja. Najbolj uporabna je linearna umeritvena krivulja, ki jo opišemo z enačbo premice $y=b_0+b_1x$, kjer b_0 pomeni presečišče premice z osjo y , b_1 pa naklon premice. Merilo, kako dobro se umeritvena krivulja prilega eksperimentalnim podatkom, imenujemo regresijski koeficient. V primeru idealnega prileganja oziroma, če je umeritvena krivulja popolnoma linearna (odvisnost odziva od koncentracije analita je popolnoma linearna), je njegova vrednost 1. Regresijski koeficient je tem manjši, čim slabše je prileganje umeritvene krivulje eksperimen-

talnim podatkom. V tem primeru točke ne ležijo na premici, temveč na obeh straneh premice. Še sprejemljiva vrednost regresijskega koeficienta je običajno 0,995 (regresijski koeficient $>0,995$).

Če povzamemo: za vsako snov, ki jo določamo, naredimo pred meritvijo vzorcev meritev standardnih raztopin in umeritveno krivuljo. Na sliki 22 je prikazan primer kromatogramov standardnih raztopin in umeritvene krivulje za kokcidiostatik monenzin. V tem primeru je regresijski koeficient 1 (R: 1.000).



Slika 22: Primer izpisa iz tekočinskega kromatografa (HPLC) (A: kromatogrami standardnih raztopin; B: umeritvena krivulja)

Glede na namen delimo kromatografijo na analitsko in preparativno. Pri analitski kromatografiji merimo količino snovi v vzorcu, medtem ko s preparativno kromatografijo ločimo komponente v vzorcu tako, da je uporaben za nadaljnje analize (na primer izolacija učinkovin v farmacevtski industriji...).

Pomembne značilnosti analiznega postopka so meja zaznavanja (angl. *limit of detection, LOD*), meja vrednotenja (angl. *limit of quantification, LOQ*) in izkoristek. Pri analiznem postopku moramo vzorec primerno pripraviti. Priprava običajno obsega ekstrakcijo analizirane snovi iz vzorca s primernim topilom in čiščenje ekstrakta. Pogosto je nemogoče analizirano snov popolnoma ekstrahirati iz vzorca, prav tako jo med čiščenjem nekaj izgubimo. Zaradi tega je količina snovi v končni raztopini manjša, kot je bila v originalnem vzorcu. Razmerje med njima imenujemo izkoristek. Preden začnemo analitični postopek uporabljati, moramo ugotoviti njegov izkoristek, ki ga kasneje pri analizi vzorcev uporabljamo za korekcijo rezultatov. Meja zaznavanja pomeni najmanjšo količino oziroma koncentracijo snovi, ki jo z določenim analitičnim postopkom še zaznamo. Koncentracija je tako nizka, da jo zaznamo, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti. Meja vrednotenja je koncentracija, običajno trikrat višja kot meja zaznavanja, ki jo lahko kvantitativno določimo.

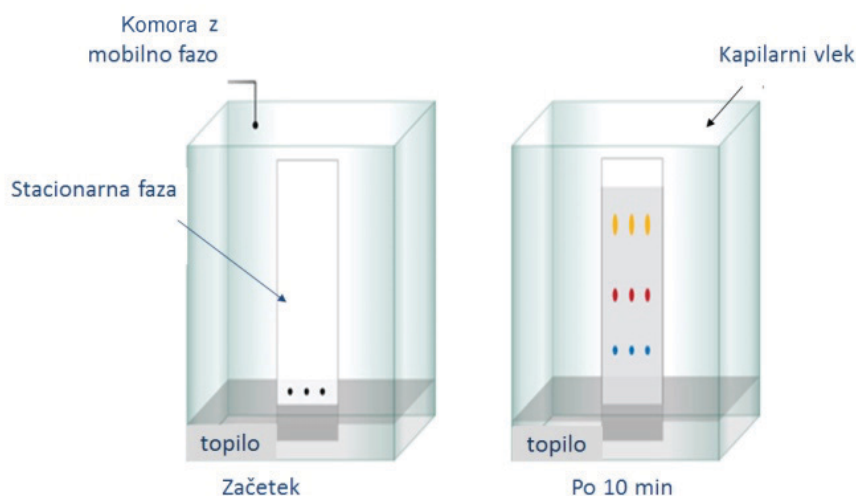
Merilna negotovost je povezana s ponovljivostjo kemijskih meritev. Predstavljamo si lahko, da pri ponavljanju analize istega vzorca nikoli ne bomo dobili popolnoma enakih rezultatov, ampak bodo ti razporejeni v nekem intervalu. Predvidevamo, da je prava vrednost srednja vrednost (povprečje) vseh dobljenih vrednosti, vendar pa so verjetni tudi vsi drugi rezultati oziroma vrednosti v intervalu. Merilna negotovost nam pove, v kakšnem intervalu navzgor in navzdol od srednje vrednosti leži (z določeno zanesljivostjo) prava vrednost. Če uporabimo razširjeno merilno negotovost (U), je ta zanesljivost 95 %. V primerih, ko je rezultat blizu najvišjim dovoljenim koncentracijam, rezultat podamo v obliki $x \pm U$.

Kot smo že omenili, se kromatografske tehnike med seboj razlikujejo glede na agregatno stanje mobilne ali stacionarne faze. Mobilna faza je lahko plin ali tekočina, stacionarna faza pa je lahko v trdnem ali tekočem agregatnem stanju. Stacionarna faza je nanešena v obliki tanke plasti na ploščo ali pa je z njo napolnjena kolona (kot pri Tsvetovem poskusu). V nadaljevanju so opisane osnovne kromatografske tehnike glede na vrsto stacionarne in mobilne faze. Opisani so primeri, ki se najpogosteje uporabljajo pri analizi krme.

4.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

Pri tankoplastni kromatografiji (angl. *Thin Layer Chromatography, TLC*) je stacionarna faza (v trdnem agregatnem stanju) z vezivom nanesena na stekleno, plastično ali aluminijsko ploščo. Vrsta stacionarne faze je odvisna od lastnosti ločevane zmesi. Običajno je stacionarna faza silikagel ali aluminijev oksid, lahko pa je tudi celuloza, poliamid ali podobno. Mobilna faza je pri tankoplastni kromatografiji tekočina. Izbrati moramo ustrezno topilo, v katerem bo ločevana zmes topna. Na kromatografsko ploščo s ka-

pilaro nanesemo preiskovani in primerjalni vzorec (standard). Pri nanašanju vzorcev s kapilaro pazimo, da je premer nastale lise okoli 3–5 mm. Plošče razvijamo v kadičkah oziroma kromatografskih komorah. To so običajno steklene komore, ki se dobro zaprejo. Vanje nalijemo mobilno fazo v višini 3–5 mm. Pri nekaterih analiznih postopkih dve tretjini komore obložimo s filtrirnim papirjem, ki omogoči hitrejše nasičenje komore s parami mobilne faze. Če pare v komori niso nasičene, mobilna faza, ki potuje po kromatografski plošči, odpareva, kar ima za posledico slabšo ločljivost in ponovljivost rezultatov. V komoro postavimo kromatografsko ploščo (naneseni del obrnemo navzdol) in jo pokrijemo. Kromatogram je razvit, ko je topilo nekaj milimetrov pod vrhom plošče. Topilo potuje namreč hitreje od vseh komponent, ki so v njem raztopljene. Primerjamo položaj in intenzivnost dobljenih lis v standardnih raztopinah in vzorcih. Pri obarvanih spojinah so lise vidne s prostim očesom, pri neobarvanih spojinah pa po končani kromatografiji ploščo osvetlimo z UV-svetilko in tako ocenimo položaj lis. Pomagamo si lahko tudi s fluorescenčnim indikatorjem, ki ga primešamo stacionarni fazi. Če detekcija spojin na osnovi njihove fluorescence ni mogoča, lahko ploščo orosimo z ustreznim reagentom, ki reagira s spojinami in nastanejo obarvani produkti. Shematski prikaz tankoplastne kromatografije prikazujemo na sliki 23.



63

Slika 23: Shematski prikaz tankoplastne kromatografije (TLC) (povzeto po www.waters.com).

4.2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je eno izmed najboljših orodij analitske kemije. Je kolonska kromatografija, pri kateri vzorec potuje skozi kolono, ki vsebuje ustrezne delce stacionarne faze. Topilo (mobilna faza) potuje skozi kolono in pri tem s seboj odnaša delce vzorca. Tako kot pri Tsvetovem poskusu, se tudi tukaj spojine med seboj ločijo, saj skozi stacionarno fazo potujejo različno hitro. S HPLC lahko ločimo, določimo in količinsko izmerimo spojine,

ki so v vsakem vzorcu, topnem v tekočini. Ugotavljamo lahko tudi spojine, ki so v vzorcih v izredno nizkih koncentracijah. HPLC uporabljamo za analizo številnih vzorcev zdravil, hrane, kozmetičnih izdelkov, forenzičnih vzorcev, industrijskih kemikalij in podobno. Tekočinski kromatograf je prikazan na sliki 24.



64

Slika 24: Tekočinski kromatograf z visoko ločljivostjo (HPLC)

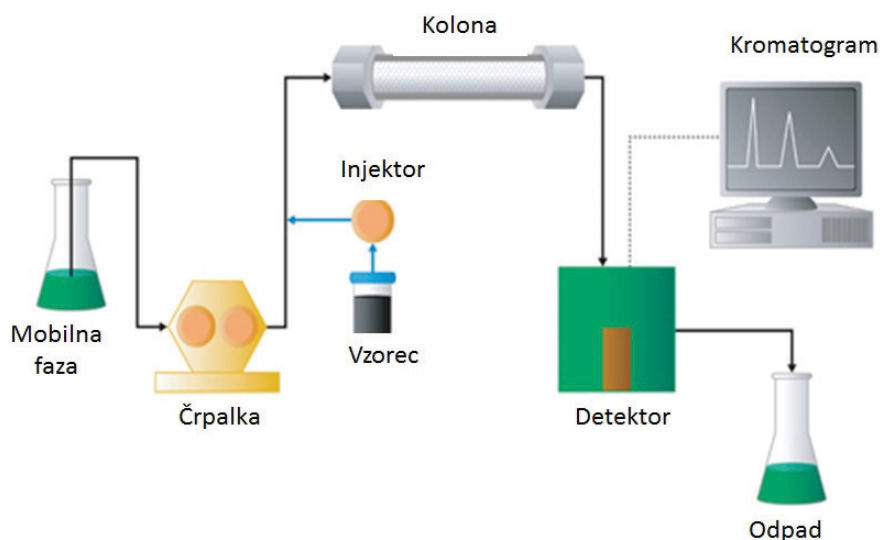
HPLC prištevamo med tekočinsko kromatografijo, saj kot mobilno fazo uporabljamo tekočino (vodo, organska topila, pufre). Stacionarna faza je v kovinskih kromatografskih kolonah. Te so ozke in dolge, premera 2–4 mm in dolžine 10–30 cm (slika 25).



Slika 25: Kromatografske kolone za HPLC

Na sliki 26 je shematsko prikazan princip delovanja HPLC. V rezervoarju je ustrezno topilo (mobilna faza). Visokotlačna črpalka ustvarja ustrezen tlak za pretok topila čez kolono. Hitrost potovanja topila je običajno nekaj mililitrov na minuto. Injektor (imenovan tudi *autosampler*) dodaja točno določeno količino vzorca v mobilno fazo, ki s konstantnim tokom prenese vzorec v HPLC kolono, kjer je stacionarna faza. Zaradi kemijskih ali fizikalnih lastnosti obeh faz pride na HPLC koloni do eluiranja, se pravi ločevanja spojin, kar zazna detektor. Mobilno fazo, ki gre mimo detektorja in čez HPLC kolono, zavržemo. Detektor je povezan z računalniškim programom, ki izriše kromatogram, ga analizira in izmeri količino iskane spojine. Ker so lastnosti iskanih spojin (analitov) lahko zelo različne, uporabljamo več vrst detektorjev (detektor na lomni količnik, UV-VIS spektrofotometrični detektor, detektor s serijo diod – DAD, fluorescenčni, elektrokemični,...).

65



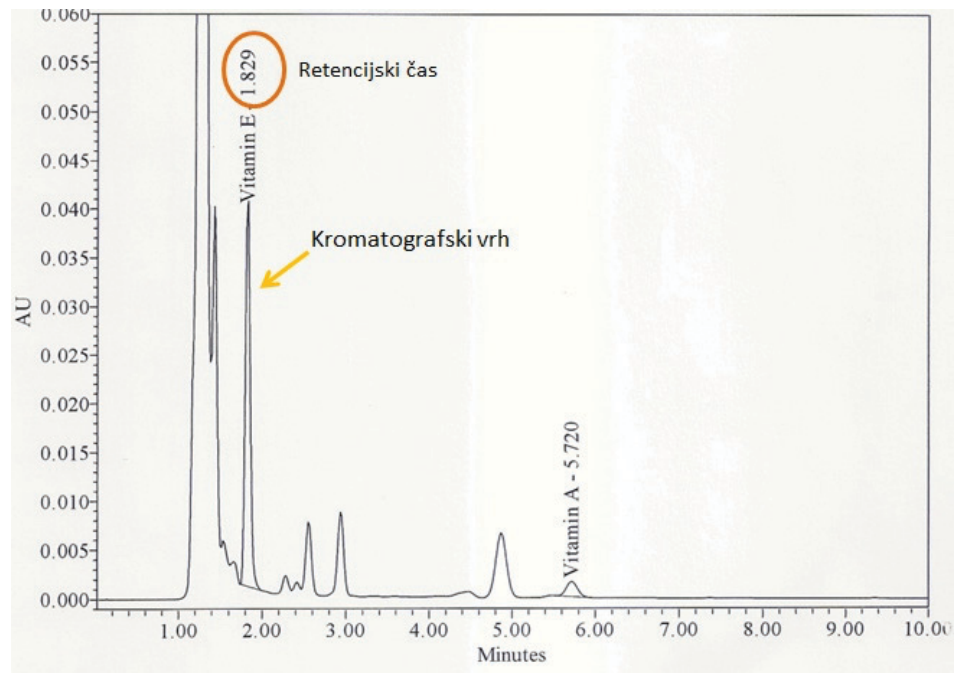
Slika 26: Shematski prikaz HPLC (povzeto po www.waters.com)

Posamezne komponente zmesi, ki se ločijo na kromatografski koloni, zaznamo z detektorjem. Signal iz detektorja potuje do računalnika. Zapis detektorja v odvisnosti od časa imenujemo kromatogram. Na kromatogramu lahko vidimo kromatografske vrhove (angl. *peak*), ki imajo obliko Gaussove krivulje. Vrhovi naj bi bili čim ožji in naj se med seboj ne bi prekrivali, kar

omogoča ločljivost, vrednotenje pa je zato zanesljivejše (slika 27). Vsak kromatografski vrh pomeni določeno spojino. Kako vemo, kateri kromatografski vrh pomeni iskano snov? Vsaka iskana spojina potrebuje za potovanje skozi kromatografsko kolono določen čas. Čas od vnosa vzorca v mobilno fazo do pojava kromatografskega vrha na kromatogramu (zaznava spojine na detektorju) imenujemo retencijski čas (t_R). Vsaka spojina ima svoj retencijski čas. S primerjavo retencijskih časov kromatografskih vrhov z vrhovi standardnih raztopin lahko v vzorcu ugotovimo iskano spojino.

PRIMER

Na kromatogramu je s puščico označen kromatografski vrh standarda vitamina E. Njegov retencijski čas je 1,829. Tako vemo, da je v vzorcu vitamin E vsakič, ko bomo na kromatogramu (pri enakih pogojih analize) dobili vrh pri retencijskem času 1,829.



Slika 27: Kromatogram

Za dodatno preverjanje rezultatov dodamo standardno raztopino tudi v preiskovani vzorec ter kromatogram primerjamo s kromatogramom standardne raztopine in kromatogramom preiskovanega vzorca. Razložimo si to na primeru vitamina E: kromatogram vzorca, ki bi mu dodali standard, bi imel na mestu 1,829 (dovoljena manjša odstopanja) višji vrh. S tem se dodatno prepričamo, da je v našem vzorcu res vitamin E. V nasprotnem primeru bi lahko dobili dve spojini (dva vrhova) zelo blizu skupaj.

KAKO VEMO KOLIKO JE ISKANE SPOJINE V VZORCU?

Detektor v sistemu HPLC zazna količino iskane snovi v vzorcu. Večja kot je koncentracija snovi, močnejši je signal in na kromatogramu se izriše višji kromatografski vrh. Za določanje količine vzorca moramo določiti površino pod krivuljo kromatografskega vrha. Površino, dobljeno z vzorcem primerjamo s površino, dobljeno s standardno raztopino.

HPLC uporabljamo za določanje mikotoksinov, naravnih škodljivih snovi, vitaminov, kokcidiostatikov oziroma krmnih dodatkov, veterinarskih zdravil, itn.

4.2.1 DOLOČANJE MIKOTOKSINOV S TEHNIKO HPLC

Ugotavljanje oziroma dokazovanje mikotoksinov je zahtevno predvsem zaradi razlik v lastnostih posameznih substratov (žita, premiksi, krmne mešanice, silaža...) in zaradi razlik v kemijski zgradbi toksinov. Na splošno laboratorijsko ugotavljanje mikotoksinov obsega:

- vzorčenje,
- ekstrakcijo,
- čiščenje in
- določitev (kvantifikacijo) toksina.

67

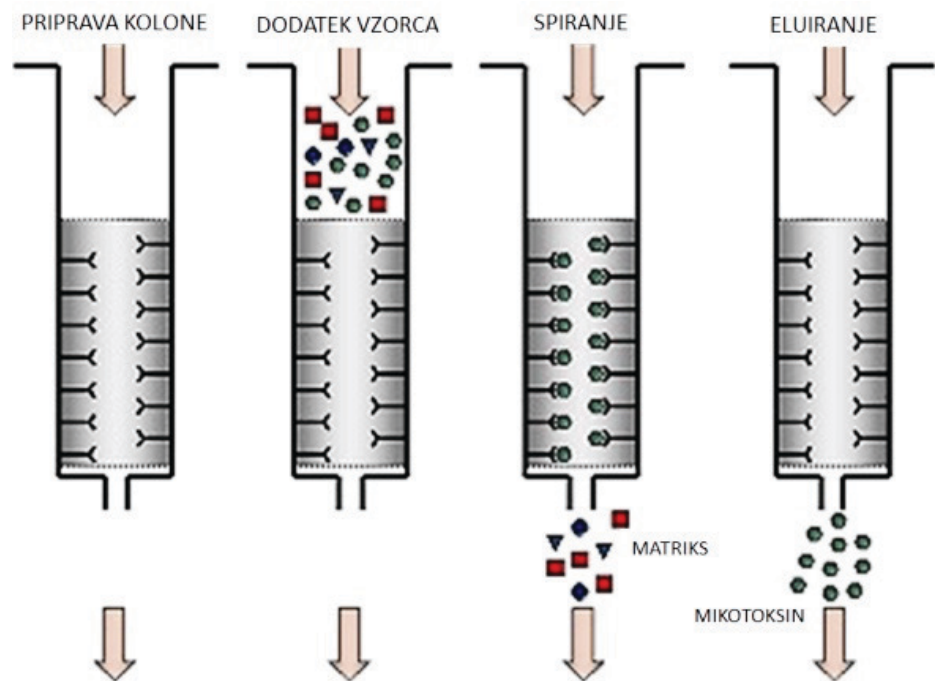
EKSTRAKCIJA IN ČIŠČENJE:

Pri določevanju posameznih toksinov v različnih vzorcih (žita, krmne mešanice, premiksi, mleko, ledvica, jetra) uporabljamo različne ekstrakcije. Ker ekstrakt vsebuje moteče snovi, zlasti maščobe in pigmente, ga je potrebno pred kvantifikacijo očistiti. Uporabljamo lahko reekstrakcijo z drugim topilom, precipitacijo ali kromatografijo, običajno pa si pomagamo z imunoafinitetnimi kolonami (slika 28).

Omenimo naj, da ima vsaka imunoafinitetna kolona oziroma kolona za čiščenje svojo zmogljivost (kapaciteto). V primeru močno kontaminiranega vzorca lahko zato dobimo napačen rezultat.

IMUNOAFINITETNE KOLONE ZA DOLOČANJE MIKOTOKSINOV

Uporabljamo jih za čiščenje vzorcev, v katerih določamo mikotoksine. Njihova prednost je visoka stopnja selektivnosti. Predvsem so uporabne za vzorce, ki vsebujejo več mikotoksinov (močno kontaminirani vzorci), mi pa moramo določiti le enega. Mikotoksini so molekule z nizko molekulsko maso – imunogene so le, če so vezane na proteinski nosilec. V imunoafinitetnih kolonah imamo protitelesa proti določenim mikotoksinom vezana na nosilec (agarozo, sefarozo ali dekstran). Molekule mikotoksina se tako selektivno vežejo na protitelesa s šibkimi, nekovalentnimi vezmi. S spiranjem kolone (z destilirano vodo) odstranimo odvečen matriks (vzorec, brez iskanega mikotoksina). Po spiranju dodamo topilo (eluent), ki denaturira protitelesa. Molekule mikotoksina se tako sprostijo in jih skupaj s topilom ujamemo v HPLC vialo (stekleničko).



Slika 28: Shematski prikaz imunoafinitetnih kolon

KVANTIFIKACIJA:

Identifikacijo in kvantifikacijo mikotoksinov izvedemo s primerjavo kromatogramov vzorcev in standardnih raztopin.

PROTOKOL ŠTEVILKA 6: DOLOČANJE OHRATOKSINA A V KRMI

1. V ekstrakcijsko bučko (250 mL) natehtamo 50 g vzorca. Če analiziramo seno, natehtamo 25 g.
2. Dodamo 100 mL mešanice acetonitrila in vode (60:40).
3. Stresamo 1 uro na sobni temperaturi.
4. Ekstrakt prefiltriramo skozi filtrirni papir.
5. 4 mL ekstrakta (8 mL za seno) zmešamo s 44 mL fosfatnega pufru (PBS).
6. Mešanico počasi spustimo skozi imunoafinitetno kolono, specifično za določevanje ohratoksina A (komercialne imunoafinitetne kolone).
7. Kolono enkrat speremo z 10 mL PBS.
8. Toksin počasi eluiramo z 1 mL mešanice metanola in očetne kisline (98:2) v vialo za HPLC.
9. Kolono speremo še z 1 mL deionizirane vode. V viali za HPLC dobimo tako skupno 2 mL vzorca.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE OHRATOKSINA A

Datum:

Analistik:

Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Volumen ekstrakcijskega topila (mL)	Standardni dodatek (koncentracija)	Volumen standardnega dodatka (μL)	Volumen filtrata na koloni (mL)	Končni volumen (mL)	Rezultat

	Datum priprave	Koncentracija
Standardna raztopina 1		$c_1 =$
Standardna raztopina 2		$c_2 =$
Standardna raztopina 3		$c_3 =$
Standardna raztopina 4		$c_4 =$

Opombe:

4.2.2 DOLOČANJE VITAMINA A IN E S TEHNIKO HPLC

Ugotavljanje vsebnosti vitaminov je pomembno predvsem pri sumih na pomanjkanje ali presežek določenih vitaminov v krmi, pa tudi pri redni kontroli uradnih vzorcev. Vitamin A in E se lahko določata tudi v biološkem materialu (krvni serum ali jetra), ki je pri vseh vrstah živali dober pokazatelj preskrbe z vitamini. Občutljiva sta predvsem za direktno svetlobo, zato analize opravljamo v zaprtem prostoru in z zatemnjeno steklovino.

Analiza vitamina A in E v vzorcu krme je sestavljena iz treh korakov. Vzorec najprej umilimo in s tem vitamina A in E v vzorcu pretvorimo v alkoholno obliko. Nato vitamina ekstrahiramo z organskim topilom. V ekstraktu določimo vitamina s tehniko HPLC. Za detekcijo uporabimo UV detektor pri valovni dolžini 285 nm.

PROTOKOL ŠTEVILKA 7: DOLOČANJE VITAMINA A IN E V KRMI

UMILJANJE:

1. V merilno bučko natehtamo vzorec: 1 g premiksa, 10 g krme ali 0,5 g koncentrata
2. Dodamo:
 - 2 mL raztopine askorbinske kisline
 - 2 mL raztopine BHT (butil hidroksitoluen; 2,6-di-tetra-butyl-4-metilfenol, E321)
 - 40 mL etanola
 - 2 mL natrijevega askorbata
 - 10 mL 2M raztopine KOH

(vsi dodatki pred KOH so stabilizatorji vitaminov, KOH pa omogoča umiljanje)

3. Kuhamo na 90°C v vodni kopeli 10 minut

EKSTRAKCIJA:

1. Bučko ohladimo pod hladno vodo
2. Dodamo 50 mL petroletra
3. Stresamo na stresalniku 10 minut
4. Petroletrsko fazo prenesemo v vialo za HPLC

KVANTIFIKACIJA NA HPLC:

Vzorec injiciramo v tekočinski kromatograf in merimo z UV detektorjem pri valovni dolžini 285 nm. Kvantitativno določanje vsebnosti vitamina v vzorcu izvedemo s pomočjo standardnih raztopin.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE VITAMINA A IN E

Datum:

Analitik:

Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Volumen, razredčitev (mL)	Standardni dodatek Volumen, koncentracija	Vsebnost

Datum priprave osnovne standardne raztopine:

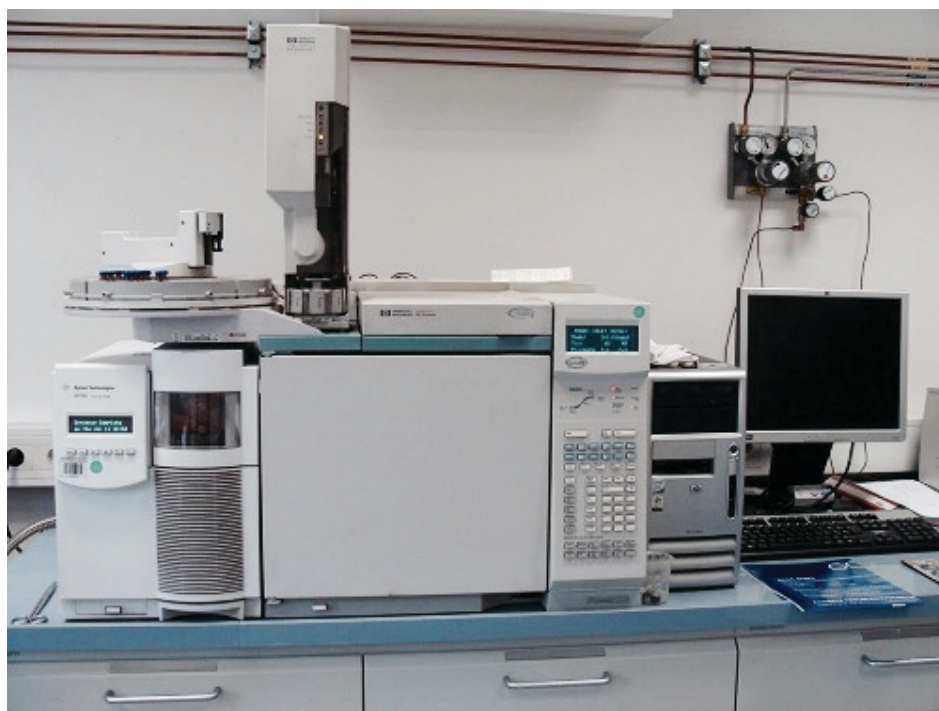
Delovne standardne raztopine:

Opombe:

4.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC)

Potek plinske kromatografije (angl. *Gas Chromatography, GC*) je podobno poteku tekočinske kromatografije, le da kot mobilno fazo uporabljamo plin, ki je kemično inerten. Običajno uporabljamo helij, lahko pa tudi argon, dušik ali vodik. Vrsto plina izberemo glede na vrsto detektorja. Stacionarna faza je tako kot pri sistemu HPLC nanesena na delce polnila v kromatografskih kolonah. Je mikroskopsko tanka plast tekočine ali polimera na inertni trdni podlagi v kromatografskih kolonah, ki so steklene ali kovinske, dolge nekaj metrov in premera do 8 mm. Imenujemo jih polnjene kolone. Danes so v uporabi pretežno kapilarne kromatografske kolone, ki so narejene iz stajljenega kvarca (angl. *fused silica*). V takih kolonah je stacionarna faza nanesena na notranjo steno. Premer kapilarnih kolon je zelo majhen in sicer do 1 mm, dolge pa so od 10 do 50 m. V primerjavi s polnjenimi kolonami so kapilarne veliko bolj učinkovite. Ker so zelo dolge, so običajno zvite v klobčič, da se prilegajo aparatu GC (slika 29). Stacionarne faze pri GC se med seboj razlikujejo po polarnosti. Mobilna faza, plin, pa le prenaša komponente mešanice, ki se termično desorbirajo s stacionarne faze, naprej po koloni. Proces ločevanja spojin pri GC lahko poteka pri konstantni temperaturi (izotermno) ali pa temperaturo med analizo spreminjamo, čemur rečemo temperaturno programiranje. GC je primerna predvsem za določevanje spojin, ki so dovolj hlapne in termično stabilne (na primer nekateri mikotoksini, nižje maščobne kisline,...)

74



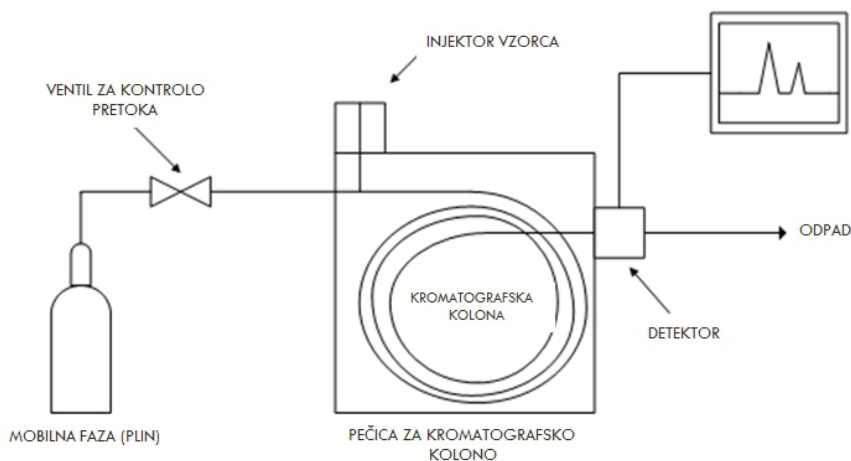
Slika 29: Plinski kromatograf

Pri GC se vzorec v plinastem ali tekočem stanju z injektorjem v izredno majhnih količinah injicira v področje vhoda v kromatografsko kolono. Molekule vzorca se s tokom plina pomikajo po koloni in se v stacionarni fazi adsorbirajo. Hitrost, s katero molekule potujejo po koloni je odvisna od moči ad-

sorpcije, ta pa je odvisna od vrste molekule ter od lastnosti stacionarne faze. Ker ima vsaka vrsta molekul analiziranega vzorca drugačne lastnosti in s tem različno hitrost potovanja po koloni, se različne molekule med seboj ločijo in v različnem času dosežejo konec kolone. Imajo torej različne retencijske čase (glej poglavje 4.1.2). Za kromatografsko kolono je nameščen detektor, ki beleži čas potovanja posamezne komponente skozi kolono in količino posamezne komponente. Detektor pošlje podatke v računalniški program, ki nam izriše kromatogram. Pri tehniki GC se snovi kvalitativno določijo z vrstnim redom elucije iz kolone in z retencijskim časom-seveda v primerjavi s standardnimi vzorci (slika 30).

Za detekcijo spojin se pri GC najpogosteje uporabljata detektorja FID in TCD. Detektor FID je plamensko ionizacijski detektor (angl. *flame ionization detector, FID*), pri katerem so elektrode nameščene na izhodu kromatografske kolone ob plamenu (mešanica vodika in zraka). Plamen pirolizira vse dušik vsebujoče spojine, ki izstopijo iz kolone. Piroliza povzroči razpad molekul na katione in elektrone, ki ustvarijo tok med elektrodama. Signal, ki nastane ob povečanju toka, se prevede do računalnika, kar vidimo kot kromatografski vrh. Detektorji FID imajo nizko mejo detekcije.

Detektor TCD je detektor na toplotno prevodnost (ang. *thermal conductivity detector, TCD*). Deluje na principu prehoda toka skozi tungsten-renijev filament. Ko molekule vzorca skupaj s plinom zapustijo kromatografsko kolono, se toplotna prevodnost zmanjša, kar povzroči povečano temperaturo filameta in spremembo napetosti. To detektor zazna in pošlje signal računalniku.



Slika 30: Shematski prikaz plinske kromatografije (povzeto po Skoog, 1992)

4.3.1 DOLOČANJE NIŽJIH MAŠČOBNIH KISLIN S TEHNIKO GC

Nižje maščobne kisline so organske kisline, ki se tvorijo v krmi pri procesu siliranja. Mednje prištevamo mlečno, ocatno in masleno kislino. Bistvo siliranja krme je v tem, da z nastajanjem nižjih maščobnih kislin, posebno

mlečne kisline, škodljivim mikrobom v sveži krmi preprečimo delovanje in krmo na ta način konzerviramo. V silaži je najbolj zaželena mlečna kislina, ki kaže na pravilen potek siliranja in na dobro uspelo silažo. Najmanj zaželena pa je maslena kislina, ki kaže na slabo uspelo, pokvarjeno silažo. Ta lahko negativno vpliva na zdravstveno stanje govedu, zato je ocenjevanje deleža posameznih nižjih maščobnih kislin v silaži zelo pomembno. Posamezne maščobne kisline v silazah določamo na plinskem kromatografu. Razmerje med kislinaми nam rabi kot osnova za oceno silaže po Fliegu, s katero silažo uvrstimo v enega izmed petih kakovostnih razredov (zelo dobra; dobra; zadovoljiva; komaj zadovoljiva; slaba; tabela 1).

Tabela 1: Ocena silaže po Fliegu

OCENA SILAŽE PO FLIEGU							
% skupnih kislin	Točke	% skupnih kislin	Točke	% skupnih kislin	Točke	% skupnih kislin	Točke
1. Mlečna kislina							
0,0-25,0	0	40,1-42,0	8	56,1-58,0	16	68,1-69,0	23
25,1-27,5	1	42,1-44,0	9	58,1-60,0	17	69,1-70,0	24
27,6-30,0	2	44,1-46,0	10	60,1-62,0	18	70,1-71,2	25
30,1-32,0	3	46,1-48,0	11	62,1-64,0	19	71,3-72,4	26
32,1-34,0	4	48,1-50,0	12	64,1-66,0	20	72,5-73,7	27
34,1-36,0	5	50,1-52,0	13	66,1-67,0	21	73,8-75,0	28
36,1-38,0	6	52,1-54,0	14	67,1-68,0	22	čez 75,0	30
38,1-40,0	7	54,1-56,0	15				
2. Očetna kislina							
0,0-15,0	20	24,1-25,4	15	30,8-32,0	10	37,5-38,7	5
15,1-17,5	19	25,5-26,7	14	32,1-33,4	9	38,8-40,0	4
17,6-20,0	18	26,8-28,0	13	33,5-34,7	8	40,1-42,5	3
20,1-22,0	17	28,1-29,4	12	34,8-36,0	7	42,6-45,0	2
22,1-24,0	16	29,5-30,7	11	36,1-37,4	6	čez 45,0	0
3. Maslena kislina							
0,0-1,5	50	8,1-10,0	9	17,1-18,0	4	32,1-34,0	-2
1,6-3,0	30	10,1-12,0	8	18,1-19,0	3	34,1-36,0	-3
3,1-4,0	20	12,1-14,0	7	19,1-20,0	2	36,1-38,0	-4
4,1-6,0	15	14,1-16,0	6	20,1-30,0	0	38,1-40,0	-5
6,1-8,0	10	16,1-17,0	5	30,1-32,0	-1	čez 40,0	-10
OCENA:							
1: -Točke 81 - 100 - zelo dobra;		3: -Točke 41 - 60 - zadovoljiva;		5: -Točke 0 - 20 - slaba.			
2: -Točke 61 - 80 - dobra;		4: -Točke 21 - 40 - komaj zadovoljiva;					

PROTOKOL ŠTEVILKA 8: DOLOČANJE NIŽJIH MAŠČOBNIH KISLIN

1. V čašo natehtamo 50 g silaže.
2. Dodamo 450 mL vode.
3. Premešamo in pustimo stati preko noči.
4. Zjutraj premešamo (lahko izmerimo pH).
5. Odmerimo 10 mL v erlenmajerjevo steklenico (100 mL).
6. Dodamo kapljico indikatorja fenolftaleina in titriramo z 0,1 M NaOH do preskoka barve (iz brezbarvne do rožnate).
7. Nato dodamo še enak volumen porabljene 0,1 M NaOH (če smo do preskoka porabili na primer 3 mL NaOH, ga dodamo še 3 mL).
8. Erlenmajerjevo steklenico postavimo na kuhalnik (moč 3 do 4) in vsebino počasi odparevamo, da se posuši.
9. Suh ostanek raztopimo v 10 mL 2 M HCl.
10. Prefiltriramo.
11. 0,5 mL filtrata prenesemo v 10 mL bučko in razredčimo z 2 M HCl do oznake.
12. Raztopino prenesemo v vialo za GC in analiziramo na plinskem kromatografu.

4.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA S TANDEMSKO MASNO SPEKTROMETRIJO (LC/MS-MS)

Tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry, LC/MS-MS*) je novejša kromatografska metoda, ki omogoča zelo natančno določanje snovi v vzorcu. Osnovno vodilo tehnike je zelo podobno kot pri že opisani HPLC tehniki. Glavna razlika je v načinu detekcije vzorca (slika 31).

Večina detektorjev ima omejeno selektivnost. Na primer, z uporabo UV detektorja pri tehniki HPLC poleg izbranega analita zaznamo tudi vse ostale snovi, ki absorbirajo svetlobo iste valovne dolžine. Pri tehniki LC/MS-MS poteka detekcija z masnim detektorjem, ki ločuje spojine na osnovi razmerja molskih mas in naboja (m/z), zato doseže veliko selektivnost. Molekule spojin pri vstopu v detektor ioniziramo. Masni detektor lahko zazna tudi fragmente, na katere razpadejo posamezne molekule in fragmente, na katere še dodatno razpadejo izbrani izhodni fragmenti. Identifikacija spojin z veliko stopnjo zanesljivosti je mogoča z izbiro primernega izhodnega fragmenta, ki mu rečemo prekursorjski ion, in nastalih produktnih ionov, ki so značilni za posamezne molekule.

Pri večini detektorjev, ki jih uporabljamo v analizi kemiji, smo pri meritvi omejeni na določanje enega oziroma nekaj kemijsko podobnih analitov. LC/MS-MS pa spada med modernejše tehnike, ki na osnovi zaznavanja molskih mas omogočajo istočasno določanje velikega števila snovi, na primer določanje več mikotoksinov ali pa zdravil hkrati pri eni meritvi vzorca.



Slika 31: Tekočinski kromatograf s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS-MS)

Za ovrednotenje rezultatov pri večini kemijskih tehnik uporabljamo standardne raztopine snovi, ki jo določamo, se pravi raztopine znane koncentracije. Odzive detektorja pri vzorcu primerjamo z odzivi pri standardnih raztopinah različnih koncentracij. Na ta način lahko določamo znane snovi, za katere nas zanima, ali so v vzorcu in v kakšni koncentraciji. V primeru, ko ugotavljamo, katere snovi so v vzorcu (na primer v forenziki, v znanstveno raziskovalnem delu), pa način z uporabo standardnih raztopin ni mogoč. Za ta namen obstajajo podatkovne baze masnih spektrov velikega števila snovi, s katerimi lahko identificiramo neznane snovi v vzorcu.

LITERATURA

1. Galyean ML. Laboratory procedures in animal nutrition research. Lubbock: Texas University, 2010.
2. Givens DI, Owen E, Omed HM. Forage analyses-procedures. In: Undersander D, Mertens DR, Thiex N, eds. Forage evaluation in ruminant nutrition. Omaha: National Forage Testing Association, 1993: 49–51.
3. Mason S. Understand your feed analysis report. Calgary: Alberta Daily Management, 2000.
4. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow: Prentice Hall, 2000.
5. Mueller-Harvey I. Modern techniques for feed analysis. In: FAO. Assessing quality and safety of animal feeds. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2004: 8–14.
6. Nielsen S. Food analysis. 4th ed. London: Springer, 2010.
7. Petrič A, Kočevar M. Organska kemija: praktikum. 5 ponatis. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2004.
8. Rouessac F, Rouessac A. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
9. Rutherford SM, Moughan PJ. Principles of chemical analysis. In: Moughan PJ, Verstegen MWA, Visser-Reyneveld MI, eds. Feed evaluation, principles and practise. Wageningen: Wageningen Academic Publishing, 2000: 33–45.
10. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry. 7th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996: 665–737.
11. Waters. The science of what's possible. Milford: Waters Corporation, 2014. www.waters.com (dostop 2014)

5 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE KRME

Ugotavljanje mikrobov (bakterij, gliv) je pomemben postopek pri ocenjevanju zdravstvene ustreznosti krme. Krmo, ki vsebuje škodljive mikroorganizme ali je zaradi mikrobiološke kontaminacije pokvarjena, ne smemo uporabljati za prehrano živali. Zaradi delovanja mikroorganizmov pride običajno do zmanjšanja količine hranilnih snovi v krmi. Mikroorganizmi lahko sintetizirajo stranske produkte, ki poleg tega, da zmanjšajo konzumacijo pokvarjene krme, tudi škodujejo zdravju živali. Seveda pa se je potrebno zavedati tudi, da ima krmljenje živali z mikrobiološko oporečno krmo lahko škodljive posledice za uporabnike živil živalskega izvora.

Krma je zaradi svoje sestave idealno okolje za rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Ti so lahko saprofitski, patogeni, pogojno patogeni ali toksični. Njihova rast in razmnoževanje sta odvisni od številnih dejavnikov, kot je vlaga, temperatura, pH, sestava krme, aerobne ali anaerobne razmere v okolju, kemične lastnosti krme, načini skladiščenja... Do kontaminacije krme z mikroorganizmi lahko pride že na polju – med rastjo, nadalje med spravilom, med predelavo ali med skladiščenjem. Kot rezultat hranjenja s kontaminirano krmo se v čredi živali hitro pokaže večje število kužnih obolenj ali slabši proizvodni rezultati, zato je mikrobiološka analiza krme zelo pomembna.

Z mikrobiološkimi analizami krme lahko ugotavljamo številne vrste mikroorganizmov. Najpogosteje določamo bakterije iz družine enterobakterij, med katerimi sta najpomembnejša rodova *Escherichia* in *Salmonella*, bakterije iz rodu *Listeria*, plesni iz rodu *Aspergillus*, probiotične bakterije in kvasovke ter sulfit-reducirajoči klostridiji.

V krmi lahko ugotavljamo tudi odrasle ali razvojne oblike parazitov. Najpogosteje opravljamo preiskave na *Toxoplasma gondii*, *Echinococcus* spp. in *Trichinella* spp.

5.1 RAZDELITEV MIKROBOV

Mikroorganizmi so bolj ali manj razširjeni povsod v naravi. Najdemo jih v zraku, v vodi, v zemlji, na ljudeh in živalih ter v krmi. Do kontaminacije krme pride največkrat v okolju, kjer se krma proizvaja, predeluje, skladišči in uporablja. Z vidika patologije prehrane mikroorganizme v krmi razvrščamo v naslednje skupine:

- a.) Ubikvitarno razširjene saprofitske bakterije, plesni in kvasovke (saprofit je organizem, na primer bakterija, ki živi na mrtvi organski snovi in povzroča njen razkroj oziroma gnitje).
- b.) Mikroorganizmi, ki povzročajo specifične bolezni in zastrupitve pri živalih:
- Patogeni mikroorganizmi, ki lahko povzročijo nastanek kužnih bolezni (na primer *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Bacillus anthracis*,...)
 - Mikroorganizmi, ki se razmnožujejo v krmi in povzročijo okužbo živali, ko dosežejo infekcijsko dozo (na primer *Salmonella* spp., *Listeria* spp.,...)
 - Mikroorganizmi, ki proizvajajo toksine v krmi. Za tvorbo toksinov so poleg hranljivih snovi potrebne še posebne razmere. Med bakterijami sta najpomembnejša *Clostridium botulinum* in *Staphylococcus aureus*, med plesnimi pa tiste iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium*.

V nadaljevanju bomo natančneje opisali metodo določanja saprofitskih mikroorganizmov v krmi. Čeprav večina mikroorganizmov iz krme v prebavilih odmrje zaradi delovanja pepsina in solne kisline, lahko huda kontaminacija krme s saprofiti poruši bakterijsko ravnovesje v prebavilih živali. Po odmrtnju saprofitskih mikroorganizmov se v prebavilih tvori veliko škodljivih razkrojnih produktov, sproščajo se encimi in toksini, ki poškodujejo črevesno sluznico in povzročijo nastanek obolenja.

5.2 ZNAČILNOSTI MIKROBOV, KI KONTAMINIRAJO KRMO

BAKTERIJE

Krma je vedno bolj ali manj kontaminirana z različnimi, predvsem saprofitskimi bakterijami, ki se v normalnih razmerah skladiščenja razmnožujejo razmeroma počasi. Če se vlaga in temperatura povečata nad kritično vrednost, se začnejo bakterije intenzivno razmnoževati. Za večino vrst bakterij, ki povzročajo kvarjenje krme, je potrebna razmeroma visoka relativna zračna vlaga in temperatura med 30°C in 45°C.

Pri nepokvarjeni krmi zrastejo na gojišču po Schmidtu bakterije iz rodov *Erwinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas* in *Aeromonas*. Ker so kolonije naštetih bakterij rumeno obarvane, jim s skupno besedo rečemo tudi rumeno pigmentirane bakterije.

Na pokvarjenost krme kaže prevladujoče število kolonij bakterij iz rodov *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* in *Streptomyces*. Pri kvarjenju krme pogosto sodelujejo tudi aktinomicete iz rodu *Actinomyces*.

PLESNI

Spore plesni so praktično povsod v naravi. Med patogene plesni, ki jih lahko izoliramo iz krme, prištevamo zlasti tiste, ki povzročijo aspergilozo. Sicer pa sta med glivičnimi boleznimi pri živalih in ljudeh najpogostejši trihofitoza in mikrosporoza. Nekateri sevi plesni izločajo v krmo ob določenih pogojih mikotoksine, ki lahko povzročijo nastanek proizvodnih, zdravstvenih in reprodukcijskih motenj pri domačih živalih. Kot ostanki ali rezidui v živilih pa lahko ogrozijo tudi zdravje ljudi.

KVASOVKE

Kvasovke se hitro razmnožujejo v krmi z veliko vsebnostjo vlage. Takšna krma spremeni barvo, okus in vonj, oziroma pride do kvarjenja krme. Število kvasovk je v nepokvarjeni krmi običajno majhno.

5.3 ZAKONSKI PREDPISI

V Sloveniji imamo trenutno v veljavi več pravnih aktov (tabela 2), kjer so določeni mikrobiološki kriteriji krme le za salmonele in druge bakterije iz družine enterobakterij. Ker ni nobene omejitve glede števila kolonij saprofitskih mikroorganizmov, si pri ovrednotenju rezultatov pomagamo s priporočili Evropske organizacije za mikrobiologijo krme (European Feed Microbiology Organisation, EFMO). V omenjenih priporočilih se vrste krme glede na številno zraslih kolonij bakterij, plesni in kvasovk razdeli v 4 razrede: od odlične do takšne, za katero odsvetujejo krmljenje.

Tabela 2: Pravni akti z mikrobiološkimi kriteriji

MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI ZA KRMO *	MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI ZA KRMILA ŽIVALSKEGA IZVORA *
Pravilnik o pogojih za zagotavljanje varnosti krme (Uradni list RS, št. 58/11, 35/14)	Uredba (ES) št. 1069/2009 o določitvi zdravstvenih pravil za stranske živalske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter razveljavitvi Uredbe (ES) št. 1774/2002 (UL L št. 300/2009), z vsemi dopolnitvami
	Uredba Komisije (EU) št. 142/2011 o izvajanju Uredbe (ES) št. 1069/2009 o določitvi zdravstvenih pravil za stranske živalske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter o izvajanju Direktive Sveta 97/78/ES glede nekaterih vzorcev in predmetov, ki so izvzeti iz veterinarskih pregledov na meji v skladu z navedeno direktivo (UL L št. 54/2011), z vsemi dopolnitvami.

* Navedeni pravni akti se spreminjajo, zato je potrebno njihovo veljavnost in morebitne dopolnitve preveriti!

5.4 DOLOČANJE STOPNJE KONTAMINACIJE S SAPROFITSKIMI MIKROBI

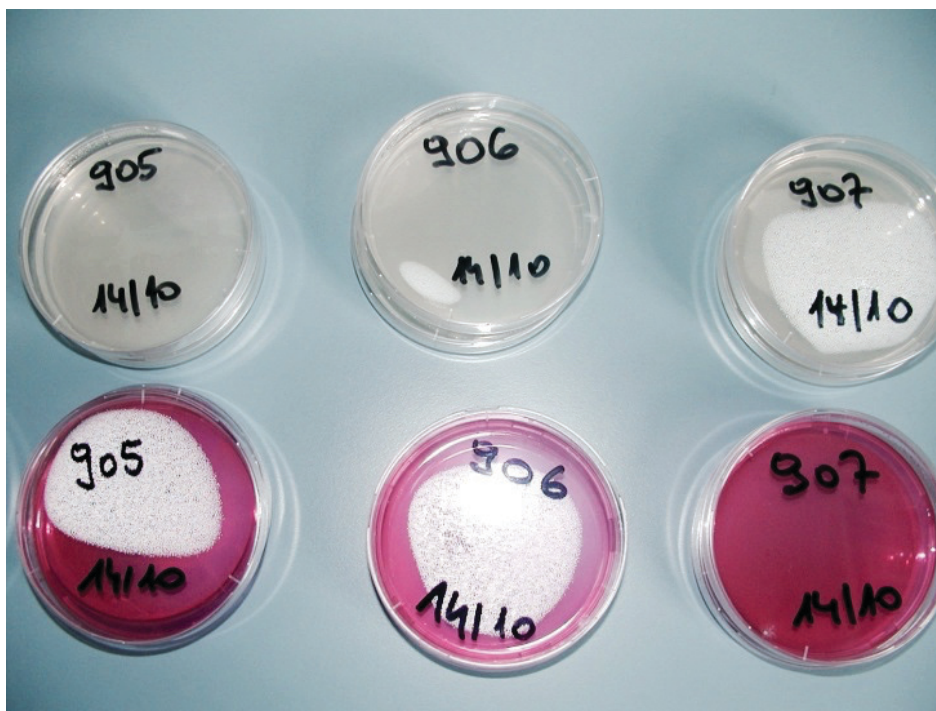
Pri določanju stopnje kontaminacije s saprofitskimi mikroorganizmi uporabljamo metode, ki jih priporoča Evropska organizacija za mikrobiologijo krme. Postopki s prispelimi vzorci morajo potekati tako, da se izognemo dodatni kontaminaciji krme. Suho krmo je potrebno analizirati najkasneje 7 dni po prejemu vzorca. Do analize hranimo krmo v čistih steklenih kozarcih v suhem in hladnem prostoru. Vzorce krme z večjimi trdnimi delci zmeljemo na mlinih, ki so opremljeni s siti z odprtini do 3 mm².

Za ugotavljanje stopnje kontaminacije s saprofitskimi mikroorganizmi uporabljamo razredčitveni (dilucijski) test. V sterilno bučko natehemo 10 g vzorca in mu dodamo 90 ml sterilne 0,5% raztopine peptona v destilirani vodi. Suspenzijo homogeniziramo 10 minut na horizontalnem tresilcu. Nato iz osnovne raztopine, ki jo označimo kot redčitev 10⁻¹, pripravimo razredčitve 10⁻², 10⁻³ in 10⁻⁴ tako, da 1 mL ustrezne raztopine pomešamo z 9 mL sterilne vode z dodatkom peptona.

Postopek je do te točke enak tako za določanje saprofitskih mezofilnih bakterij, kot za določanje saprofitskih plesni in kvasovk. Od tu dalje pa se postopka razlikujeta.

Kot gojišče za mezofilne bakterije uporabljamo petrijevke s triptoznim agarjem po Schmidtu, ki mu dodamo antimikotik (slika 32).

83



Slika 32: Gojišča po Schmidtu. Zgoraj-gojišča za bakterije; spodaj-gojišča za plesni in kvasovke

Na gojišče nanesemo 0,1 mL suspenzije vzorca iz razredčitve 10^{-3} za določitev števila kolonij pri razredčitvi 10^{-4} , oziroma 0,1 mL suspenzije vzorca iz razredčitve 10^{-4} za določitev števila kolonij pri razredčitvi 10^{-5} . Pri močnejši kontaminaciji vzorca je potrebno pripraviti tudi petrijevke z razredčitvijo 10^{-6} . Suspenzije vzorcev enakomerno razmažemo po površini gojišča z bakteriološko zanko (ezo) (slika 33). Gojišča inkubiramo v termostatu 2 do 3 dni pri 30°C (slika 34). Za vsako razredčitev uporabimo dve petrijevki. Pri štetju upoštevamo gojišča, na katerih je zraslo več kot 20 in manj kot 200 bakterijskih kolonij. Bakterije posameznih rodov identificiramo in preštujemo (slika 35). Med kontaminante, značilne za določeno krmo, štejemo rumeno pigmentirane bakterije, enterobakterije, korineformne bakterije in bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Iz pokvarjene krme pogosto izoliramo bakterije iz rodov *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* in *Streptomyces*.

Plesni in kvasovke dobro uspevajo na gojiščih po Schmidtu, ki je sestavljeno iz sladnega ekstrakta, glukoze, kvasnega izvlečka, agarja in vode (slika 32). Dodana ste še Marlofen 810, ki omejuje prehitro rast posameznih kolonij plesni in antibiotik, ki preprečuje rast bakterij. Gojiščem je dodano tudi barvilo Bengalsko rdeče, da jih lažje ločimo od gojišč za bakterije. Na gojišče nanesemo 1 mL suspenzije vzorca razredčitve 10^{-3} (slika 33). Nasajene plošče inkubiramo v termostatu pri temperaturi $25\text{--}27^{\circ}\text{C}$ (slika 34). Prvo štetje kolonij opravimo tretji dan, naslednjega pa čez 5–7 dni. Kot končni rezultat upoštevamo štetje, ki je pokazalo večje število kolonij. Pri štetju upoštevamo plošče, na katerih je več kot 15 in manj kot 150 kolonij plesni ali kvasovk. Če je število kolonij plesni in kvasovk na gojišču manjše od 15 ali večje od 150, potem v rezultatu označimo, da vzorec vsebuje manj oziroma več kot je dejansko ugotovljeno število kolonij. Grobo identifikacijo plesni opravimo z makroskopsko in mikroskopsko preiskavo kolonij plesni na gojišču (slika 35). Če je le mogoče, naj vsebuje poročilo o rezultatih mikološke preiskave poleg skupnega števila kolonij plesni tudi navedbo števila posameznih, najpomembnejših rodov. Med plesni, tipične za določen produkt, razvrščamo zlasti plesni iz družine *Dematiaceae*. Med tiste, ki kažejo na kvarjenje krme pa predvsem plesni iz rodov *Penicillium*, *Aspergillus* in *Mucor*.

84



Slika 33: Nanašanje vzorca na gojišče (levo: plesni in kvasovke (1 mL iz razredčitve vzorca 10^{-3}); desno: bakterije (0,1 mL iz razredčitve vzorca 10^{-4}))



Slika 34: Rast plesni in kvasovk v termostatu



Slika 35: Štetje zraslih kolonij saprofitskih bakterij, plesni in kvasovk (levo: kolonije plesni in kvasovk; desno: kolonije bakterij)

Število zraslih kolonij (angl. *Colony Forming Unit*, CFU) izračunamo tako, da ugotovljeno povprečno število kolonij na petrijevkah pomnožimo z razredčitvijo vzorca. Število saprofitskih bakterij v vzorcu prikažemo v milijonih na gram ali mililiter, število plesni in kvasovk pa v tisočih na gram ali mililiter (tabela 3).

85

NE POZABIMO!

Glavne razlike med dilucijskim testom za določanje kontaminacije krme z bakterijami in plesnimi ter kvasovkami:

Tabela 3: Značilnosti dilucijskega testa

	BAKTERIJE	PLESNI IN KVASOVKE
Gojišče	Gojišče po Schmidtu (svetlo) z dodatkom antimikotika	Gojišče po Schmidtu z dodatkom antibiotika in barvila (rožnato)
Vzorec	0,1 mL iz razredčitve 10^{-4}	1 mL iz razredčitve 10^{-3}
	Razmažemo po površini gojišča s cepilno zanko	Razlijemo po površini gojišča
Temperatura inkubacije	30°C	25–27°C
Čas inkubacije	2 do 3 dni	5 do 7 dni
Rezultati	Plošče z 20 do 200 kolonijami CFU v milijonih/g ali L	Plošče z 15 do 150 kolonijami CFU v tisočih/g ali L

S standardiziranimi mikrobiološkimi metodami lahko torej ugotovimo naslednje:

- krma s primarno mikrofloro. Primarna mikroflora je značilna za tehnološko neobdelane produkte, kot so žita in stranski proizvodi mlevske industrije.
- Krma s spremenjeno mikrofloro (zaradi odstranitve primarne mikroflore ali kontaminacije s sekundarno, za produkt netipično mikrofloro). Ta je značilna za različne vrste krmil (tropine, živalski proteini in peletirane krmne mešanice).
- Krma z mikrofloro, ki povzroča njeno kvarjenje.

Osnovna mikološka in bakteriološka preiskava, s katero ugotovimo skupno število zraslih kolonij bakterij, plesni in kvasovk, nam da torej le vpogled v stopnjo kvarjenja krme. Za ugotovitev škodljivosti oziroma neškodljivosti krme je potrebno osnovne mikrobiološke preiskave še dopolniti z organoleptično preiskavo krme, kemijskimi analizami, mikroskopskimi preiskavami, lahko pa tudi z biološkim poskusom na laboratorijskih živalih.

PROTOKOL ŠTEVILKA 9: MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA KRME

1. V merilno bučko natehtamo 10 g zmletega vzorca.
2. Dodamo 90 mL peptonske suspenzije in dobimo osnovno raztopino 10^{-1} .
3. Stresamo 10 min na stresalniku.
4. Pripravimo 3 epruvete in vsako napolnimo z 9 mL suspenzije.
5. Iz merilne bučke po stresanju odpipetiramo 1 mL vzorca in ga dodamo v prvo epruveto ter dobro pretresemo – razredčitev 10^{-2} .
6. Iz prve epruvete odpipetiramo 1 mL vzorca in ga dodamo v drugo epruveto ter dobro pretresemo – razredčitev 10^{-3} .
7. Iz druge epruvete odpipetiramo 1 mL vzorca in ga dodamo v tretjo epruveto ter dobro pretresemo – razredčitev 10^{-4} .

Od tu dalje delamo različno za:

- a.) Ugotavljanje kontaminacije vzorca s saprofitskimi bakterijami.
- b.) Ugotavljanje kontaminacije vzorca s plesnimi in kvasovkami (mikološka preiskava)

DOLOČANJE ŠTEVILA SAPROFITSKIH BAKTERIJ

1. Iz tretje epruvete (10^{-4}) vzamemo 0,1 mL vzorca in ga naneseemo na pripravljeno gojišče za bakterije (svetlo rumeno) – razredčitev 10^{-5} .
2. Vzorec s cepilno zanko razmažemo po gojišču.
3. Petrijevko z gojiščem prenesemo v termostat na 30°C za 2 do 3 dni.
4. Odčitamo rezultat – preštejemo kolonije.

DOLOČANJE ŠTEVILA PLESNI IN KVASOVK (MIKOLOŠKA PREISKAVA)

1. Iz druge epruvete vzamemo 1 mL vzorca in ga naneseemo na pripravljeno gojišče za plesni in kvasovke (rožnate barve) – razredčitev 10^{-3} .
2. Vzorec narahlo razlijemo po gojišču.
3. Petrijevko prenesemo v termostat na 25 do 27°C za 6 do 7 dni.
4. Odčitamo rezultat – preštejemo kolonije.

PRIMER VREDNOTENJA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE KRME:

Razredčitve na petrijevkah	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Identifikacija:
Gojišče za plesni in kvasovke po Schmidtu	48	7	/	/	Cladosporium: sp. 3000 CFU/g Aureobasidium: sp. 1500 CFU/g
	58	9	/	/	Nediferencirane: 1000 CFU/g Kvasovke: niso bile ugotovljene
Izračun števila* = (48+58+7+9) : ((2+0,2) x 10 ⁻²) = 5545					Število plesni: 5,5 x 10 ⁻³ CFU/g
Triptozni agar, aereobne mezofilne bakterije	/	123	14	/	
	/	129	18	/	
Izračun števila* = (123+129+14+18) : ((2+0,2) x 10 ⁻³) = 129090 (zaokroženo na 130000)					Aerobne mezofilne bakterije: 0,13 x 10 ⁶ CFU/g

*N = $\sum C : ((n_1 + 0,1 \times n_2) \times d)$
N = število CFU; $\sum C$ = vsota vseh kolonij vseh prešteti plošč; n₁ = število petrijev, prešteti pri prvi razredčitvi; n₂ = število petrijev, prešteti pri drugi razredčitvi; d = najmanjša razredčitev, pri kateri je bilo opravljeno štetje (na primer za bakterije 10⁻³)

LITERATURA

1. D' Mello JPF. Microbiology of animal feeds. In: FAO. Assessing quality and safety of animal feeds. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2004: 89–107.
2. Osweiler GD. Mycotoxins. Vet Clin North Am Equine Pract 2001; 17(3): 547–65.
3. VDLUFA. Verfahrensweisung zur mikrobiologischen qualitätsbeurteilung: Verbandsmethode (Standard operating procedure for microbiological quality assessment). In: Methodenbuch III. 7. Erg. Darmstadt: VDLUFA, 2007: pogl. 28.1.4 (1–16).
4. Žust J, Vengušt A, Pestevšek U. Kontaminacija krme z mikroorganizmi in njihovimi toksičnimi presnovki. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2001.
5. Yiannikouris A, Jouany JP. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Anim Res 2002; 51: 81–99.

6 MIKROSKOPSKE PREISKAVE KRME

Proizvodi, namenjeni za živalsko krmo, ne smejo biti nevarni za zdravje živali in posredno tudi za zdravje ljudi, prav tako ne smejo škodljivo vplivati na okolje. Krmo za živali moramo zato redno analizirati. Včasih zadostuje že senzorična ocena, za natančnejše podatke o kakovosti in zdravstveni ustreznosti krme pa moramo narediti še mikrobiološke, kemijske, mikroskopske in druge analize.

Glavni del mikroskopskih analiz je mikroskopiranje. Mikroskop nam omogoča, da strukturo določenega delčka v krmi opazujemo natančneje kot s prostim očesom. Namen mikroskopske preiskave krme je identifikacija njenih sestavin na podlagi morfoloških in histoloških značilnosti, ocenjevanje količine in razmerja sestavin v krmnih mešanicah ter ugotavljanje morebitne onesnaženosti krme.

90

V primerjavi s kemijskimi analizami krme, ki zahtevajo z dragimi aparaturami opremljene laboratorije, nam mikroskopija na hiter in preprost način omogoči dober vpogled v kakovost surovin in sestavo krme. Nobena surovina za krmo ni popolnoma čista, zato se majhen del določenih primesi (slama, semena, plodovi drugih vrst rastlin, luščine, pesek, zemlja,...) večinoma dopušča. Nasprotno pa je na primer pri strupenih semenih ali drugih delih strupenih rastlin, ki imajo škodljiv vpliv na zdravje živali in jih v surovinah ali krmi ne sme biti. Ni jih mogoče povsem odpraviti, zato je pomembno, da krmo oziroma surovine redno preiskujemo. Ob tem moramo upoštevati stopnjo strupenosti teh snovi, sposobnost biološkega kopičenja in razgradljivost v organizmu ter v proizvodih, namenjenih za krmo živali. Z mikroskopsko metodo lahko, poleg naštetega, ugotovimo tudi ponarejanje krme z dodajanjem manj vrednih in slabše prebavljivih snovi. Podatki o deležih teh snovi v krmi so zelo uporabni. Z mikroskopskimi analizami ugotovimo tudi spremenjeno strukturo krme, ki je lahko posledica nepravilnega postopka izdelave. Na primer, previsoka temperatura obdelave lahko negativno učinkuje na kakovost dodanih sestavin, kot so mlečni proizvodi, krmna moka ali sojine tropine. Ugotovimo lahko tudi morebitno kontaminacijo krme z bakterijami, plesnimi, insekti ali drugimi škodljivci.

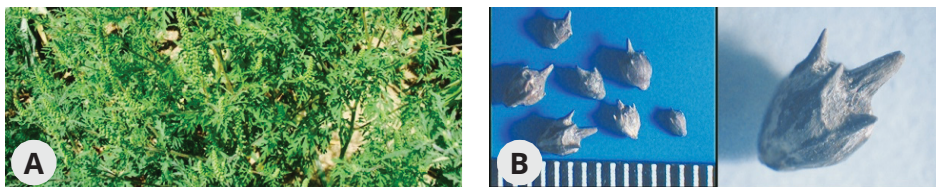
Pri mikroskopski analizi so nam v veliko pomoč dodatni postopki, kot so sejanje in ločevanje različno velikih delcev, flotacija, sedimentacija in koncentracija struktur, ki jih proučujemo ter uporaba specifičnih reagentov za njihovo obarvanje.

Pri mikroskopskih preiskavah krme potrebujemo poleg pomožnih pripomočkov (mlini, mešalci, sita,...) tudi več vrst mikroskopov: streomikroskop, svetlobni mikroskop s polarizacijsko in fluorescenčno svetlobo ter mikroskop s faznim kontrastom. Prvi korak pri mikroskopski oceni krme je lahko optična preiskava s pomočjo stereomikroskopa, s katero dobimo podatke o strukturi krme in vsebnosti neželenih snovi (na primer plesni, nedeklariranih snovi,...). Če pri taki preiskavi krme ne dobimo zadovoljivih odgovorov, je potrebna natančna mikroskopska preiskava, ki jo lahko opravi le izkušen analitik – mikroskopist. Od izkušenosti analitika je odvisno, koliko uporabnih podatkov bomo dobili z mikroskopsko preiskavo krme. Bistvenega pomena je tudi arhivska zbirka posameznih sestavin krme, ki je slike ne morejo nadomestiti.

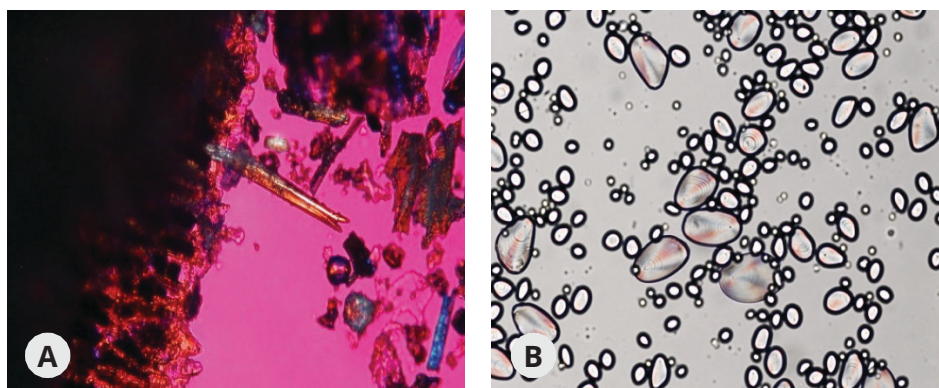
6.1 PREISKAVE NA VSEBNOST NEČISTOČ IN STRUPENIH SNOVI RASTLINSKEGA IZVORA

V krmi lahko z mikroskopsko preiskavo med drugim ugotovljamo tudi delčke strupenih rastlin oziroma njihova semena. Največje dovoljene vsebnosti posameznih strupenih snovi so navedene v Direktivi ES o neželenih snoveh v živalski krmi št. 2002/32/ES, z vsemi dopolnitvami. Članice Evropske skupnosti (ES) lahko ob nevarnosti za zdravje ljudi, živali ali za okolje začasno predpišejo nižje najvišje dovoljene vsebnosti neželenih snovi. Določijo lahko tudi najvišjo dovoljeno vsebnost za druge snovi ali celo prepovedo prisotnost takih snovi v proizvodih, ki so namenjeni za živalsko krmo.

V večini primerov nam pri identifikaciji rastlin pomagajo morfološke značilnosti semen. Opazujemo predvsem njihovo velikost, obliko, barvo, površinska znamenja, teksturo, obliko in lego semenske brazgotine. V pomoč so nam lahko tudi druge značilnosti, kot so lupina, bodice, škrobna zrnca in laski. Te strukture so pri semenih poljščin ali semenih travniških rastlin pogosto uničene že med žetvijo ali pa kasneje med čiščenjem oziroma pri drugih postopkih obdelave, kar nam otežuje prepoznavanje (sliki 36 in 37).



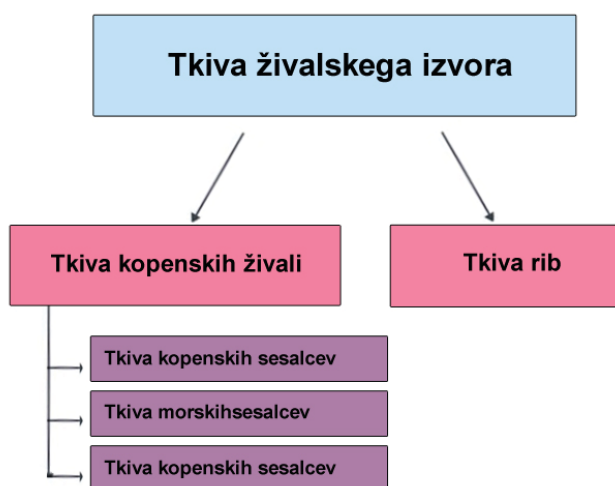
Slika 36: Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*); A: rastlina, B: seme



Slika 37: Rastlinska vlakna sončnice (A), krompirjev škrob (B)

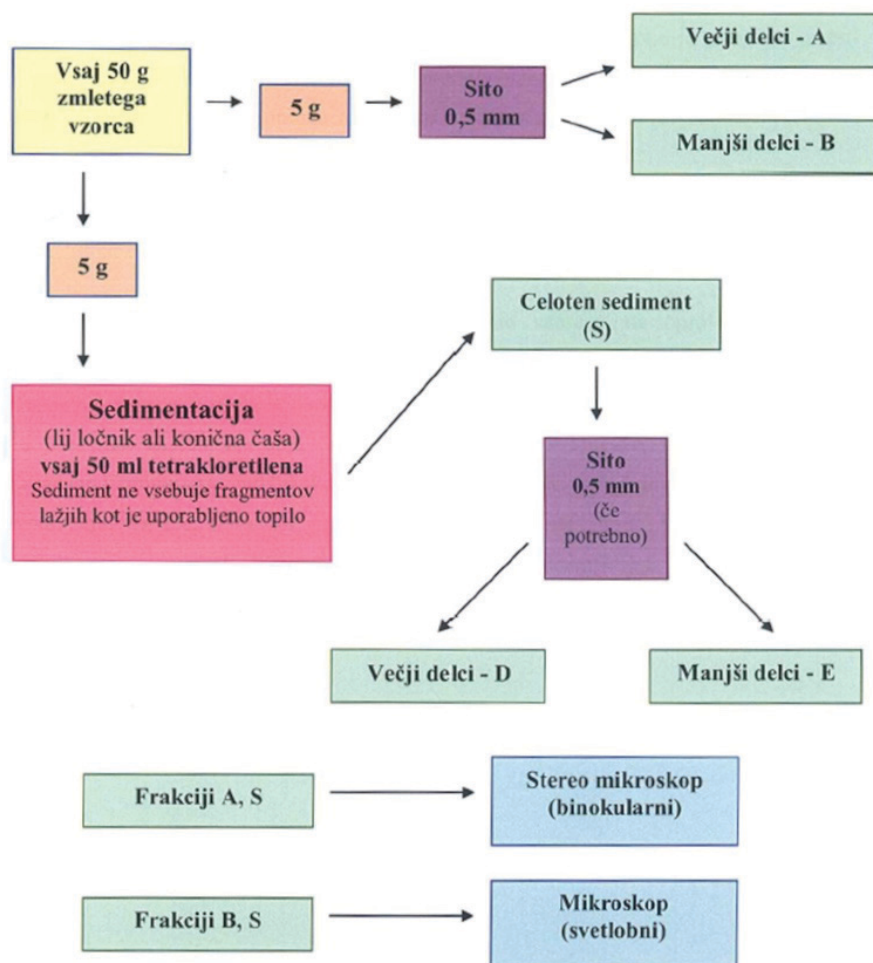
6.2 PREISKAVE NA VSEBNOST TKIV ŽIVALSKEGA IZVORA

Pomemben del mikroskopskih preiskav krme zavzema mikroskopska preiskava krme glede na vsebnost sestavin ali tkiv živalskega izvora. Pred pojavom bovine spongiformne encefalopatije (BSE) je bilo za krmljene živali dovoljeno uporabljati različna krmila živalskega izvora. Po ugotovitvi, da je vzrok za izbruh BSE zelo verjetno nezadostno termično obdelana mesnokatna moka, so uporabo večine krmil živalskega izvora prepovedali oziroma omejili (slika 38).



Slika 38: Razdelitev tkiv živalskega izvora

Pri preprečevanju širjenja BSE je nadzor nad tkivi živalskega izvora v krmi zelo pomemben. Evropska unija je s tem namenom določila mikroskopsko metodo kot uradno metodo za določanje tkiv živalskega izvora v krmi v koncentracijah, ki so višje od 0,1%. Uporabna pa je tudi za ugotavljanje koncentracij, ki so nižje od 0,1% (slika 39).



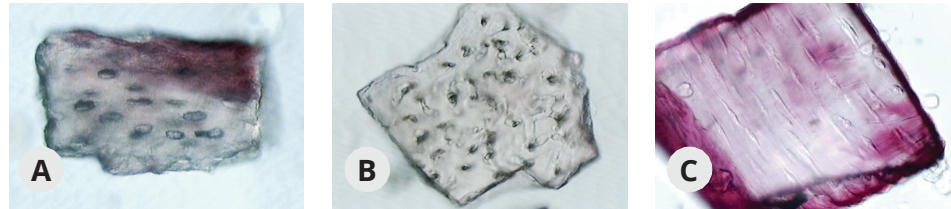
Slika 39: Diagram postopka za določanje tkiv živalskega izvora (po Direktivi Komisije 2003/126/EC)

6.2.1 MIKROSKOPSKE PREISKAVE NA SESTAVINE ŽIVALSKEGA IZVORA

Mikroskopske strukture tkiv sesalcev, perutnine in rib postanejo pod mikroskopom vidne pri različnih povečavah. Najpogosteje najdeni delci živalskega izvora v krmi so kosti in mišična vlakna, poleg njih pa še delci hrustanca, dlake, perja, jajčne lupine, luske, vezi in podobno.

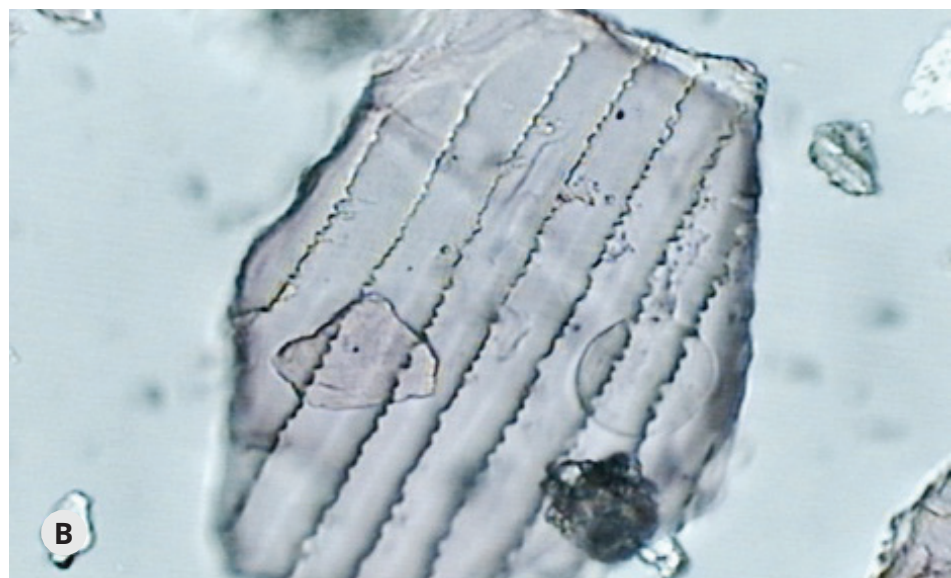
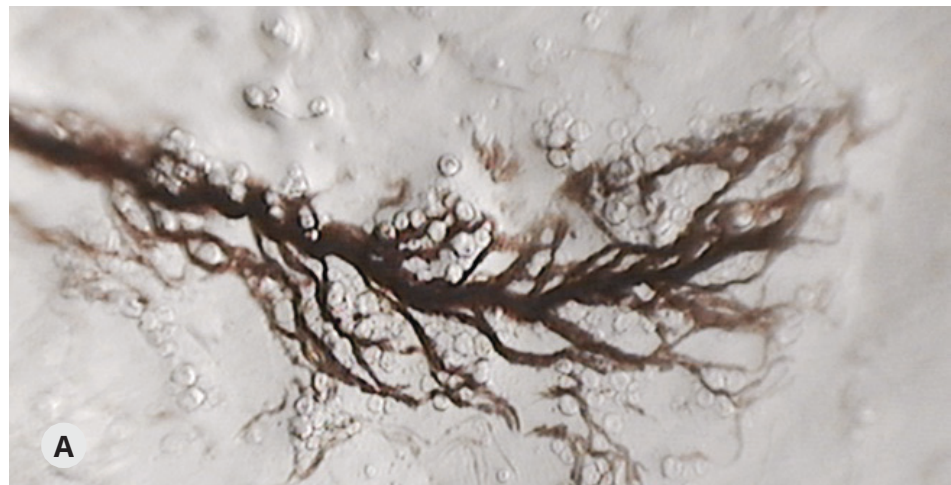
Delci kosti sesalcev so bele ali rumenkaste barve, medtem ko so delci perutninskih kosti temnejši in ostrejših robov. V primerjavi z ribjimi kostmi, ki so prosojne, so kosti sesalcev in perutnine neprosojne. Delce dolgih kosti sesalcev prepoznamo po lakunah, ki so razporejene okrog osrednjega (Haversovega) kanala, med seboj pa so povezane z drobnimi kanalčki (kanalikuli). V hrustancu vidimo votlinice, ki so v primerjavi s tistimi v kosteh bolj okroglaste oblike in med seboj niso povezane s kanalčki. Ribje kosti imajo pogosto romboidno obliko ali obliko cevi, lakune pa so običajno nekoliko podolgovate oblike. Razlikovanje med posamičnimi krmili, v katerih so perutninske sestavine in krmo, v kateri so komponente sesalcev, je zelo zahtevno, poleg tega pa v predpisih EU ni določil za različne vrste kopen-

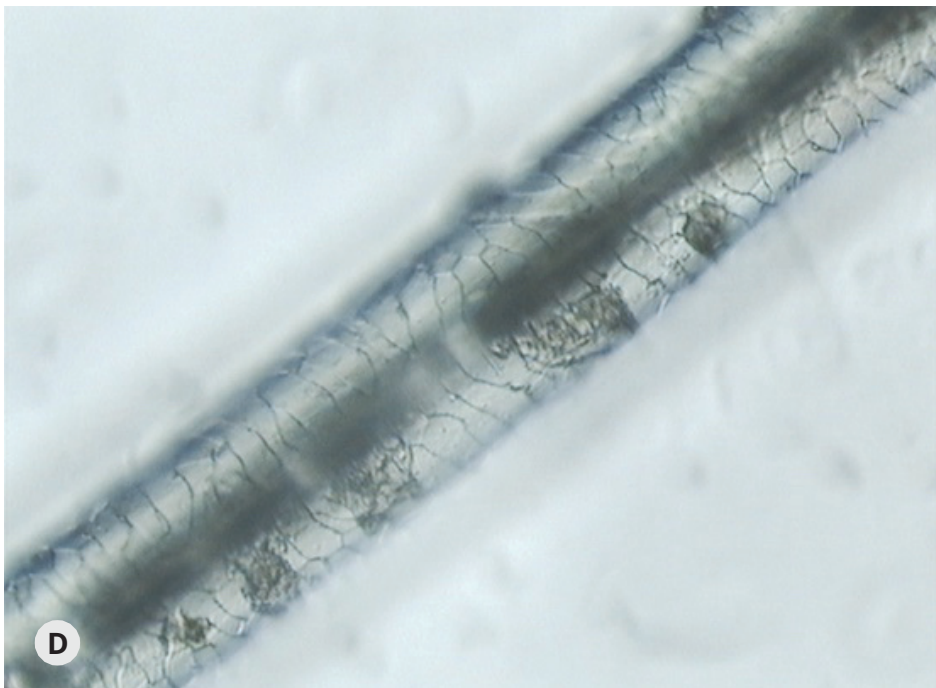
skih živali, ampak samo za kopenske živali. Vsak vzorec, v katerem določimo tkiva sesalcev ali perutnine, zato označimo kot pozitiven na tkiva kopenskih živali. Na spodnjih slikah prikazujemo nekaj primerov sestavin živalskega izvora (sliki 40 in 41).



Slika 40: Tkiva živalskega izvora, A: kost kopenske živali, B: hrustanec, C: ribja kost (povečava 10 x 20)

Delčki kosti v različnih krmah živalskega izvora nam povedo največ o izvoru krme. Kot dodaten dokaz za potrditev tkiv živalskega izvora v krmi nam služijo tudi druga tkiva, kot so dlake, zobje, peresni filamenti, jajčne lupine, ribje luske, ribje škrge,...





Slika 41: Tkiva živalskega izvora, A: del peresa, obdelanega s cistinjskim reagentom (povečava 10 x 10), B: delček ribje luske (povečava 10 x 20), C: delček ribjega zoba (povečava 10 x 40)

Živalske beljakovine v krmi preverimo z določanjem mišičnih vlaken. Krma, ki je sesalskega, perutninskega ali ribjega izvora, vsebuje vlakna prečnoprogastih in gladkih mišic. Mišično tkivo je običajno v obliki vlaken,

ki so razbita na različno dolge delčke, širina posameznih vlaken pa je odvisna od prehranskega stanja živali in od postopkov med klanjem. Določanje posamezne sestavine živalskega izvora v krmi je mogoče z določanjem t.i. mišičnega razmerja. To je razmerje med številom prečnih prog in enoto širine vlakna oziroma kvocient med širino vlakna in dolžino sarkomere.

6.2.2 DRUGE METODE ZA DOLOČANJE TKIV ŽIVALSKEGA IZVORA V KRMI

METODE ZA UGOTAVLJANJE DNK

Mesno-kostna moka in drugi stranski živalski proizvodi vsebujejo beljakovine, maščobe in ogljikove hidrate, ki so sestavni del tkiv in jih lahko uporabimo za določanje živalske vrste. V ta namen uporabljamo metodo s polimerazno verižno reakcijo (angl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*), s katero pomnožimo delčke DNK. Ker so te metode zelo občutljive, jih lahko uporabljamo tudi pri ugotavljanju prepovedane mesno-kostne moke oziroma pri ugotavljanju tkiv živalskega izvora v krmnih mešanicah. Prednost metode PCR je njena visoka specifičnost in možnost uporabe tudi pri vzorcih, ki so industrijsko predelani oziroma obdelani. Metoda PCR je primerna za iskanje in razlikovanje med DNK vretenčarjev, sesalcev, prežvekovalcev, govedi, ovc, koz, prašičev, perutnine in konjev. Metoda je v primerjavi z mikroskopsko preiskavo draga, a zelo obetavna. Uporabimo jo lahko tudi pri analizah tekočih vzorcev.

IMUNOKEMIJSKE METODE

Poleg metod za detekcijo DNK so se po pojavu BSE začele pojavljati tudi druge metode. Osnova imunokemijskih metod je specifično prepoznavanje med protitelesi in antigeni. Uporabljajo se predvsem za ugotavljanje vrste mesa. Najpogosteje uporabljeni metodi sta EIA (angl. *Enzyme Immunoassay*) in ELISA (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Omenjeni metodi temeljita na vezavi vrstno specifičnih antigenov v mesu živali s protitelesi, vezanimi v analitskem kitu. ELISA je metoda, s katero lahko določimo vrstno specifične antigene. V primeru določanja tkiv živalskega izvora je hitra in cenovno ugodna metoda, primerna kot presejalno (angl. *screening*) metoda. Pri pozitivnih rezultatih je potrebna dodatna potrditev.

TEHNIKE NIR

Med tehnike NIR (angl. *Near Infrared*) prištevamo NIRS (angl. *Near Infrared Spectroscopy*) in NIRM (angl. *Near Infrared Microscopy*). Tehnika NIRS temelji na sposobnosti molekul v analiziranem vzorcu, da absorbirajo elektromagnetno valovanje določenih valovnih dolžin. Ta metoda ima širok spekter uporabe. Poleg uporabe na najrazličnejših področjih prehranske, farmacevtske in kemične industrije, se uporablja tudi za določanje kemičnih in bioloških vrednosti v krmi za živali (voda, beljakovina, maščoba, škrob, vlaknine, prebavljivost, energetska vrednost,...). Je hitra metoda, ki zahteva le minimalno pripravo vzorca.

Metoda NIRM združuje analitične prednosti mikroskopske in spektroskopske metode. Omogoča nam, da infrardeči žarek usmerimo na vsak delec v vzorcu in tako dobimo njegov spekter NIR. Rezultat analize je zbirka stotine spektrov, ki so »molekularni odtis« sestavine v krmni mešanici.

Na splošno so tehnike NIR v analitiki krme zanimive, saj so nedestruktivne, natančne, zanesljive, enostavne, hitre in poceni.

Pri obeh metodah je potrebno razviti podatkovno bazo in ju validirati na velikem številu različnih vzorcev. Metode NIR se lahko uporabljajo kot začetne metode za določanje tkiv živalskega izvora, rezultate pa moramo potrditi še z drugo metodo (na primer PCR).

NE POZABIMO!

Mikroskopska metoda je uradna metoda za določanje tkiv živalskega izvora. Poleg mikroskopske metode lahko uporabimo še:

- PCR
- ELISA
- NIRM/NIRS
- HPLC
- Q-TOF-MS (Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry)
- MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)
- Olfaktometrično metodo

PROTOKOL ŠTEVILKA 10: DOLOČANJE TKIV ŽIVALSKEGA IZVORA

- Za mikroskopsko analizo moramo imeti najmanj 50 g vzorca.
- Vzorec moramo pred preiskavo zmleti z ustrezno opremo za mletje
- Iz zmlatega vzorca vzamemo dva dela mase, vsaj pa 5 g.
- Prvi del uporabimo za sejano frakcijo, drugi del pa za koncentrirani sediment.
- 5 g vzorca presejemo tako, da dobimo dve frakciji in sicer z delci v velikosti premera več kot 0,5 mm in manj kot 0,5 mm).
- Frakcijo z večjimi delci pregledamo pod stereomikroskopom pri različnih povečavah.
- Iz frakcije z manjšimi delci naredimo mikroskopski preparat (na predmetno stekelce z vzorcem kanemo kapljico glicerola in ga pokrijemo s krovnim stekelcem) in ga analiziramo s svetlobnim mikroskopom pri različnih povečavah.

PRIPRAVA KONCENTRIRANEGA SEDIMENTA:

- V lij ločnik ali odprto konično čašo prenesemo vsaj 5 g vzorca.
- Dodamo 50 mL tetrakloretilena.
- Mešanico večkrat premešamo ali pretresemo.
- Če uporabljamo zaprt lij ločnik, pustimo sediment stati najmanj tri minute in ga šele nato ločimo od ostale mešanice. Ponovno pretresemo mešanico v liju ločniku in ponovno pustimo tri minute ter ponovno odstranimo sediment.
- Če uporabljamo odprto čašo, sediment pustimo stati vsaj pet minut, preden ga ločimo od ostale mešanice.
- Ves sediment nato posušimo.
- Sediment stehtamo na 0,001 g natančno, če moramo oceniti odstotek vsebnosti sestavin živalskega izvora v krmi.
- Če je v sedimentu veliko večjih delcev, ga lahko s sitom z velikostjo odprtin 0,5 mm presejemo v dve frakciji. Posušen sediment nato preiščemo s stereomikroskopom in svetlobnim mikroskopom ter tako določimo morebitno vsebnost delcev kosti.
- Za mikroskopsko identifikacijo delcev se lahko dodatno uporabijo različna sredstva za pripravo preparatov in reagenti za obarvanje (lugolova raztopina: raztopina kalijevega jodida in joda, alizarin rdeče, cistinski reagent).

DELOVNI LIST: DOLOČANJE TKIV ŽIVALSKEGA IZVORA

Datum:

Analitik:

Št. vzorca	Vrsta vzorca	Ekstrakcija			Sejanje		Sejana frakcija	Koncentrirani sediment	Reagenti za obarvanje	Tkiva živalskega izvora	Tkiva kopenskih živali	Tkiva rib	Vpis
		Tk	Tv	Ts	0,25	0,5							

Opombe:

LITERATURA

1. Direktiva 2002/32/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 7. maja 2002 o nezaželenih snoveh v živalski krmi. Ur List ES 2002; L 140/10(36): 3–14. (30. 5. 2002)
2. Direktiva 2003/126/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 23. decembra 2003 o analitski metodi za določanje sestavin živalskega izvora pri uradnem nadzoru krme. Ur List ES 2003; L 339/78(41): 540–46. (24. 12. 2003).
3. Galyean ML. Laboratory procedures in animal nutrition research. Lubbock: Texas University, 2010.
4. Gizzi G, van Raamsdonk LW, Baeten V, et al. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. Rev Sci Tech 2003; 22(1): 311–31.
5. Gizzi G, von Holst C, Baeten V, Berben G, van Raamsdonk L. Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed. J AOAC Int 2004; 87(6): 1334–41.
6. Margry R, Jong J de. Feed chain: processed animal proteins and their use in animal feed. In: Jørgensen JS, Baeten V, eds. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. SAFEEDPAP. Namur: Presses Universitaires de Namur, 2012: 9–16.
7. Mueller-Harvey I. Modern techniques for feed analysis. In: FAO. Assessing quality and safety of animal feeds. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2004: 8–14.
8. Rutherford SM, Moughan PJ. Principles of chemical analysis. In: Moughan PJ, Verstegen MWA, Visser-Reyneveld MI, eds. Feed evaluation, principles and practise. Wageningen: Wageningen Academic Publishing, 2000: 33–45.
9. Ujčič I. Uspešnost ugotavljanja tkiv živalskega izvora v krmi z uradno EU metodo: magistrsko delo. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2008.
10. Van Raamsdonk LWD, Vancutsem J, Zegers J, et al. The microscopic detection of animal proteins in feeds. Biotechnol Agron Soc Environ 2004; 8(4): 241–7.

7 METODE ZA DOLOČANJE ELEMENTOV V KRMI

Za vse hranilne snovi, torej tudi za elemente oziroma minerale v krmi velja, da jih morajo živali dobivati v ustreznih količinah. Elementi so za živali lahko esencialni ali neesencialni. V organizmu imajo številne pomembne naloge. Sodelujejo pri homeostazi tekočin, pri elektrolitskem in acidobaznem ravnotežju, pri prenosu živčnih dražljajev in krčenju mišic, nekateri pa so sestavni deli encimov ali encimskih kompleksov. Potrebe po mineralih v krmi so odvisne od vrste, spola in starosti živali ter od proizvodne sposobnosti. Ker so interakcije med posameznimi elementi v krmi zelo pogoste, je pravilna količina in ustrezno razmerje med elementi bistvenega pomena. V nasprotnem primeru lahko pride do antagonističnega učinka med posameznimi elementi. Pomanjkanje enega ali več elementov povzroči motnje v celični presnovi, ki se najpogosteje kažejo kot nespecifične, klinično težko zaznavne motnje. Opazimo manjšo proizvodnjo, plodnostne motnje, rojevanje slabo vitalnih mladičev, lizavost živali, anemije, itn. Vsi elementi v krmi pa postanejo za organizem toksični, če jih je preveč. To se zgodi predvsem zaradi napak pri izdelavi krme ali mineralnih dodatkov, lahko pa tudi zaradi prevelike vsebnosti nekaterih elementov v posameznih sestavinah krme. Pogostejše so zastrupitve z elementi, kjer je meja med fiziološko in toksično koncentracijo zelo majhna (na primer pri bakru in selenu).

Za določanje elementov se uporablja več različnih tehnik. V zadnjem času je najpogosteje uporabljena tehnika induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo (angl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS*). Še vedno se uporablja tudi optična emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-OES), atomska absorpcijska spektrometrija (AAS) in elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (ET-AAS). Tehnika ICP-MS omogoča istočasno merjenje želenih elementov v različnih koncentracijah, zato je čas analize enega vzorca kratek in neodvisen od števila elementov, ki jih določamo. Tehnika hkrati omogoča tudi določanje elementov v zelo nizkih koncentracijah ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Tehnika je zahtevna predvsem zaradi narave vzorcev in interferenc pri merjenju, zato si pomagamo z različnimi dodatki, ki jih vgradimo v napravo.

7.1 PRIPRAVA VZORCEV

Pred določanjem vsebnosti elementov v kompleksnih vzorcih kot je krma, moramo vzorce ustrezno pripraviti. Tradicionalne tehnike za pripravo vzorcev so dolgotrajne in zahtevajo uporabo dragih reagentov, ki so škodljivi

za okolje, hkrati pa lahko kontaminirajo preiskovani vzorec. Napredek pri pripravi vzorcev v zadnjih desetletjih temelji na mikrovalovnem kislinsem razklopu. Pri tem postopku za razklop ali razkroj vzorca uporabljamo kislino ali mešanico kislin in mikrovalove. Največkrat uporabimo razklop v zaprtih posodah (angl. *close-vessel digestion*) z dodatkom dušikove kisline (HNO_3) ali kombinacije z vodikovim peroksidom (H_2O_2 ; sliki 42 in 43). Razklop v zaprtih posodah (teflonskih lončkih) ima pred razklopom v odprtih posodah (angl. *open-vessel digestion*) nekaj prednosti:

- zaradi povišane temperature in tlaka v zaprtem sistemu je razklop hitrejši in učinkovitejši tudi pri težko razgradljivih materialih.
- V zaprtem sistemu ne pride do izgub zaradi izhlapevanja hlapnih elementov, kot so arzen, antimon, selen, bor, živo srebro, krom in kositer.
- Ker ni izparevanja, je poraba reagentov manjša.
- Možnost kontaminacije vzorca je manjša.
- Vzorcju ne dodajamo soli za raztapljanje, ki povečajo koncentracijo le teh v raztopini za aspiriranje.
- Na voljo so kisline z visoko čistostjo, kar nam omogoča določanje elementov v nižjih koncentracijah.



Slika 42: Priprava vzorca za določanje elementov (levo: mikrovalovna pečica, desno: teflonski lončki za razklop vzorcev)



Slika 43: Vzorec krme pripravljen za razklop (razkroj) v mikrovalovni pečici

104

7.2 INDUKTIVNO SKLOPLJENA PLAZMA Z MASNO DETEKCIJO (ICP-MS)

ICP-MS je zahtevna in kompleksna tehnika za določanje koncentracije elementov v vzorcih. Aparatura je sestavljena iz naslednjih najpomembnejših delov: sistem za uvajanje vzorca, izvor ionov, analizator, masni detektor, vakuumski sistem in sistem za sprejem in obdelavo podatkov (slika 44).



Slika 44: Shematski prikaz ICP-MS sistema

Induktivno sklopljena plazma nastane v bakli (angl. *torch*), ki je sestavljena iz treh koncentričnih cevi, običajno izdelanih iz kvarčnega stekla. Konec bakle je vstavljen v indukcijsko spiralo, v katero dovajamo radio-frekvenčni električni tok. Po dveh zunanjih ceveh dovajamo plin argon in z uvajanjem električne iskre za kratek čas uvedemo proste elektrone v tok plina. V indukcijski spirali se z dodano radio-frekvenco 27,12 ali 40,68 MHz in-

ducira izmenično elektromagnetno polje, v katerem se prosti elektroni pospešijo. Pospešeni elektroni trčijo z atomi argona in jim izbijejo zunanji elektron. Sproščeni elektroni se v izmeničnem elektromagnetnem polju pospešijo. Tako nastane plazma, ki je sestavljena večinoma iz argonovih atomov in manjšega deleža prostih elektronov ter argonovih ionov in ima temperaturo okrog 10000 K. ICP neprekinjeno vzdržujemo v kvarčni bakli s primernim dotokom argona med obema zunanjima cevema tako, da se plazma ne dotika sten bakle. To dosežemo s pomožnim ali sekundarnim tokom argona, ki ga uvajamo med centralno in vmesno cev. V srednjo cev bakle dovajamo še tretji tok, to je t.i. tok razpršilca, ki potuje skozi center plazme, kjer ustvari kanal, hladnejši od obdajajoče plazme. V kanal uvajamo vzorce v obliki aerosola, ki ga ustvarimo z ustreznim razpršilcem (pnevmatski ali ultrazvočni). Ko kapljica razpršenega vzorca vstopi v osrednji kanal plazme, se upari in atomi elementov se zaradi izredno visoke temperature plazme ionizirajo. Stopnja ionizacije je odvisna od ionizacijskega potenciala elementa in je pri elementih, ki jih je lahko ionizirati (na primer natrij), tudi do 100%. Nastali ioni nato potujejo do masnega spektrometra, s katerim jih lahko določimo kvalitativno in kvantitativno. Plazma nastaja v atmosferskem tlaku, masni spektrometer pa deluje v vakuumu, zato je prostor med ICP in MS zelo pomemben, saj se mora tu ustvariti ustrezen vakuum. Del ionov, nastalih v plazmi, potuje skozi dva konusa, ki omogočata nastanek ustreznega vakuuma v masnem spektrometru. Konusi so običajno iz niklja ali platine. Ionski žarek se nato preko ionske optike usmeri v masni analizator in ustrezni sistem za detekcijo. Za detekcijo ionov se uporabljajo Faradayeve kletke in sekundarni elektronski pomnoževalniki. Vse operacije so pri ICP-MS vodene preko računalnika, ki omogoča sprotno sprejemanje in obdelavo podatkov (slika 45).



Slika 45: ICP-MS aparatura

Za kvantitativno določanje posameznih elementov beležimo c/s (count per second). Izmerjeni c/s v vzorcu primerjamo s c/s izmerjenih standardnih raztopin, ki imajo znane koncentracije elementov. Tako dobimo koncentracijo posameznega elementa v vzorcu (mg/L), z upoštevanjem zatehte in razredčitve vzorca pa tudi vsebnost elementov v mg/kg.

Prednosti ICP-MS tehnike so, da omogoča multi-elementno merjenje in analiziranje velikega števila vzorcev v zelo kratkem času. Glede na visoko temperaturo plazme lahko določamo tudi elemente z visokim ionizacijskim potencialom. Določamo pa lahko tudi različne izotope nekega elementa.

7.3 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMetriJA (AAS)

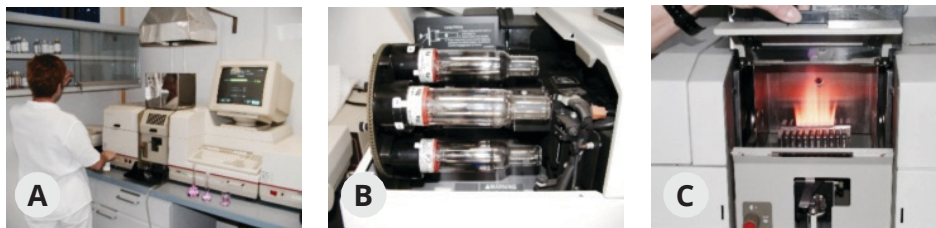
Pri atomskih spektroskopskih metodah merimo bodisi absorpcijo ali pa emisijo elektromagnetnega valovanja atomov nekega elementa. Da dobimo proste atome, moramo vzorec atomizirati (to je proces uparevanja in razgradnje vzorca na atome in ione), kar dosežemo z visoko temperaturo ($T = 1000 - 3150^{\circ}\text{C}$). Za atomizacijo s plamenom uporabljamo različne gorilne pline (butan, acetilen,...), ki dajo v kombinaciji z oksidantom (zrak, kisik ali N_2O), plamen ustrezno visoke temperature. Temperatura vpliva tako na emisijo kot na absorpcijo, zato moramo pri atomizaciji vzdrževati stabilno sestavo plamena in stalno temperaturo. Koncentracijo preiskovanega elementa v vzorcu ugotovimo s primerjanjem s standardi, ki jih izmerimo na začetku analize (slika 46).

ABSORPCIJA

Pri tem načinu potrebujemo za vsak element, ki ga želimo meriti, svojo votlo katodo (»žarnico«). Metoda temelji na pravilu, da prosti, nevzbujeni atomi absorbirajo svetlobo valovnih dolžin, ki so značilne za vsak element. Svetlobni vir pošilja curek svetlobe skozi plamen, v katerega razpršujemo preiskovano raztopino. V plamenu se pojavijo prosti atomi elementa, ki ga določamo. Atomi absorbirajo svetlobo pri značilnih valovnih dolžinah, iz deleža absorbirane svetlobe pa izračunamo količino elementa. Na ta način lahko v krmi določamo večino elementov (Ca, Cu, Zn, F, Mg, Mn..)

EMISIJA

Merimo intenzivnost emitirane svetlobe, ki jo oddajajo atomi ob prehodu elektronov iz vzbujenega stanja v nižje ali osnovno energijsko stanje. Bistvena razlika od absorpcije je v tem, da pri emisiji ne potrebujemo posebnega vira svetlobe, saj valovanje emitira vzorec. Na ta način določamo v krmi natrij in kalij.



Slika 46: A: Atomski absorpcijski spektrometer; B: vsak element ima svojo žarnico, C: vsak element ima svojo barvo plamena

PROTOKOL ŠTEVILKA 11: DOLOČANJE ELEMENTOV V KRMI S TEHNIKO ICP-MS

- V teflonski lonček natehtamo približno 0,5 g vzorca na 1 mg natančno.
- Dodamo 5 mL 65 % dušikove kisline (HNO_3) in 1 mL 30 % vodikovega peroksida (H_2O_2) ter pustimo stati eno uro.
- Lonček zapremo s pokrovčkom XP 1500 Plus in ga vstavimo v visokotlačno posodo.
- Sestavljene lončke (največ 12) postavimo v mikrovalovni sistem.
- Vzorce razklopimo po naslednjem programu:

Stopnja razklopa	Čas (min)	Temperatura (°C)
Segrevanje	15	200
Čakanje	20	200
Hlajenje	20	-

- Ko se tlak v lončkih zniža, jih previdno odpremo.
- Raztopine vzorcev prenesemo v 100 mL merilne bučke in dopolnimo do oznake z 1% raztopino dušikove kisline.
- Raztopine prefiltriramo in shranimo v plastičnih posodicah.
- Pred merjenjem pripravljene raztopine ustrezno razredčimo.

MERJENJE NA ICP-MS:

- Pred merjenjem aparaturo približno dve uri spiramo z 1% raztopino dušikove kisline.
- Po spiranju aparaturo pripravimo s pomočjo avtomatske nastavitve z delovno standardno raztopino VAR-TS-MS koncentracije 5 ppb.
- Izmerimo c/s standardnih raztopin in pripravimo umeritveno krivuljo. Korelacijski koeficient umeritvene krivulje mora biti najmanj 0,995, sicer moramo postopek ponoviti s svežimi standardnimi raztopinami.
- Izmerimo c/s raztopin vzorcev. Po vsakem devetem vzorcu izmerimo eno od delovnih standardnih raztopin.
- Na koncu serije še enkrat zmerimo eno od delovnih standardnih raztopin.
- Po merjenju aparaturo speremo z 1% raztopino dušikove kisline.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE ELEMENTOV S TEHNIKO ICP-MS

Datum:

Analitik:

Številka vzorca	Vrsta vzorca	Element	Zatehta (g)	Osnovna raztopina (mL)	Razredčitev (mL/mL)	Faktor razredčitve	Rezultat (mg/kg)	Povprečni rezultat (mg/kg)

Opombe:

7.4 DOLOČANJE FOSFORJA (P) S SPEKTROFOTOMETRIČNO METODO

Zaradi zahtevnosti mikrovalovnega razklopa vzorcev in določanja elementov s tehniko ICP-MS, na vajah določamo tudi fosfor z UV vidno spektrofotometrično metodo. Vzorce pripravimo kot solno-kisle izvlečke iz pepela.

Spektrofotometrija je tehnika, kjer s spektrofotometrom merimo delež svetlobe določene valovne dolžine, ki preide skozi merjeni vzorec. Pri tem se del svetlobe absorbira, del pa pride do detektorja, kar imenujemo transmittanca. Na vajah uporabljamo enožarkovni spektrofotometer. Meritev je sestavljena iz dveh korakov:

- spektrofotometer moramo najprej umeriti, kar imenujemo »ničelna meritev«. Naredimo jo s t.i. »slepo probo«, ki je raztopina vseh reagentov brez vzorca. Absorbance vseh drugih merjenih vzorcev odčitamo glede na ničelno meritev.
- Naslednji korak je merjenje absorbance vzorcev standardov. To so raztopine z znano koncentracijo iskane snovi, v našem primeru fosforja.

Če je raztopina brezbarvna, ji lahko dodamo reagente, s katerimi bo tvorila obarvan produkt. Le-temu pa lahko spektrofotometrično določimo koncentracijo.

Po koncu meritev dobljene odčitke absorbanc vstavimo v formulo in izračunamo koncentracijo fosforja v vzorcu (glej protokol).

PROTOKOL ŠTEVILKA 12: DOLOČANJE FOSFORJA (P) V KRMI S SPEKTROFOTOMETRIČNO METODO

1. PRIPRAVA SOLNO KISLEGA IZVLEČKA (SKI)

- Pripravljeni, ohlajeni in stehtani pepel prenesemo v 300 mL erlenmajerjevo steklenico, lonček enkrat speremo z destilirano H₂O.
- Dodamo 10 mL HCl (37%) in jo postavimo na grelno ploščo, da vsebina zavre (nekaj minut).
- Erlenmajerjevo steklenico odstavimo z grelne plošče, da se vsebina ohladi.
- Solno kisle izvlečke pepela prefiltriramo preko filtrirnega papirja v merilne bučke (100 mL). To je osnovna raztopina.
- Dopolnimo z destilirano vodo do oznake 100 mL.
- Bučke zamašimo in dobro premešamo.

2. DOLOČITEV P V KRMI – SPEKTROFOTOMETRIČNO


2.1 Raztopina vzorca

- vzamemo 50 mL merilno bučko
- 1,0 mL solno kislega izvlečka (če delamo seno, vzamemo 5 mL)
- 5 mL 65 % raztopine HNO₃ : H₂O v razmerju 1: 2
- 5 mL 5 % amonijevega vanadata
- 5 mL 0,25 % amonijevega molibdata
- dopolnimo do oznake 50 mL z destilirano H₂O.

Bučke zamašimo, vsebino premešamo in pustimo stati 1 uro, da se obarva rumeno.

Raztopino prelijemo do oznake v 1 cm kiveto in merimo absorbanco v 1 cm kiveti na spektrofotometru pri valovni dolžini 430 nm.

Kot rezultat podamo vsebnost fosforja, ki ga izrazimo v g/kg. Vsebnost fosforja izračunamo po formuli:


$$w(P) = \frac{c_{ST} \times E_{VZ} \times 100}{E_{ST} \times m_{VZ} \times V_{AL}}$$

kjer je: $w(P)$ – vsebnost fosforja v g/kg, c_{ST} – koncentracija standarda v mg/mL, A_{VZ} – absorbanca vzorca, A_{ST} – absorbanca standarda, m_{VZ} – zatehta vzorca v g, V_{AL} – volumen (ml), odvzet iz osnovne raztopine 100 ml

2.2 Standard s koncentracijo 1,0 mg P/mL in raztopina za slepi preizkus

Raztopina standarda (50 mL):

- 0,3 mL standarda fosforja s koncentracijo 1,0 mg/mL
- 5 mL raztopine 65 % HNO_3 : H_2O v razmerju 1: 2
- 5 mL 5 % amonijevega vanadata
- 5 mL 0,25 % amonijevega molibdata
- dopolnimo do oznake 50 mL z destilirano H_2O

Raztopina za slepi preizkus (umeritev spektrofotometra), 50 mL:

- vzamemo merilno bučko (50 mL)
- 5 mL 65 % raztopine HNO_3 : H_2O v razmerju 1: 2
- 5 mL 5 % amonijevega vanadata
- 5 mL 0,25 % amonijevega molibdata
- dopolnimo do oznake 50 mL z destilirano H_2O

DELOVNI LIST: DOLOČANJE FOSFORJA S SPEKTROFOTOMETRIČNO METODO

Datum:

Analitik:

Številka vzorca	Datum	Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Osnovna raztopina (ml)	Alikvot (ml)	A vzorca	Rezultat (%)	Povprečni rezultat (%)

Koncentracija standarda (mg/ml)	Absorbanca standarda

Opombe:

LITERATURA

1. Arruda MAZ. Trends in sample preparation. New York: Nova Science Publishers, 2007.
2. Becker JS. Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
3. Caroli S. The determination of chemical elements in food: application for atomic and mass spectrometry. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.
4. Cubadda F, Raggi A, Testoni A, Zanasi F. Multielemental analysis of food and agricultural matrixes by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J AOAC Int* 2002; 85: 113–21.
5. Korn MGA, Morte ESB, Santos DCMB, et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods: a review. *Appl Spectrosc Rev* 2008; 43(2): 67–92.
6. Lahiri S. Advanced trace analysis. New Delhi: Narosa Publishing House, 2010.
7. Pavšič Vrtač K, Jakovac - Strajn B, Ujčič Vrhovnik I, Grandič M, Šrampf K, Tavčar - Kalcher G. Mikro- in ultramikroelementi v silaži na območju Slovenije. In: Proceedings of the 22nd International Scientific Symposium on Nutrition of Farm Animals : Zdravec-Erjavec Days. Radenci ; Murska Sobota: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije ; Kmetijsko gozdarski zavod 2013: 17–21.
8. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry. 7th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996: 635–7.
9. Žust J, Pestevšek U, Vengušt A, Jakovac Strajn B. Patologija prehrane goved, malih prežvekovalcev, prašičev in perutnine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009.
10. Varian 810/820-MS. ICP Mass spectrometers, Pre-installation manual, 8510206700, Issue 3, 2007.

8 DOLOČANJE NARAVNIH ŠKODLJIVIH SNOVI V KRMI

8.1 DOLOČANJE CIANOGENIH GLIKOZIDOV

Zastrupitve s cianovodikovo kislino najpogosteje nastanejo takrat, ko živali zaužijejo rastline, ki vsebujejo toksično količino cianogenih glikozidov. Iz njih se v prebavilih sprošča cianovodikova kislina (cianovodik, HCN), ki povzroči paralizo dihalnega centra in hiter pogin živali zaradi zadužitve. V literaturi je opisanih okoli 1000 rastlin, ki vsebujejo cianide. Najpomembnejše so:

- sudanska trava (nevarna je sveža; med sušenjem cianogeni glikozidi razpadejo),
- tapioka,
- sirek,
- ogrščica, zelje, ohrovt,
- bela detelja.

Do zastrupitev lahko pride tudi, če živali popijejo vodo, onesnaženo s cianidi iz odplak metalurških, galvanometalurških ali fotokemičnih obratov ali pojedo umetno gnojilo, ki vsebuje Ca-cianid.

Zastrupitev s cianidi lahko potrdimo z laboratorijskim preskusom. Cianovodiki so zelo neobstojni, zato je pri sumu na zastrupitev potrebno poslati jetra ali želodčno vsebino poginjenih živali v analizo v 1 % raztopini živosrebrovega klorida (HgCl_2). Reagent za določanje cianidov je pikrinska kislina v alkalnem mediju, ki reagira s cianovodiki, ob tem pa se barva spremeni iz rumene v opečnato (slika 47).

Dovoljena količina cianovodikove kisline v posamičnih krmilih in popolnih krmnih mešanica je navedena v Direktivi 2002/32/ES o nezaželenih snoveh v živalski krmi.



Slika 47: Določanje cianidov v krmi

PROTOKOL ŠTEVILKA 13: DOLOČANJE CIANOGENIH GLIKOZIDOV V KRMI

PRIPRAVA LISTIČEV

- Filter papir narežemo na ozke trakove, velikosti približno 1 cm x 5 cm.
- Položimo jih v petrijevko in prelijemo z reagentom. Posušimo.

PRIPRAVA REAGENTA

- 0,5% pikrinska kislina
- 2,5% Na₂CO₃

PRIPRAVA VZORCEV

- V bučko natehtamo 25 g vzorca.
- Dodamo 100 mL destilirane vode in dobro zapremo.
- Dobro premešamo.
- Dodamo 5 kapljic kloroforma, pripravljeni filter papir pa zatakujemo skupaj s pokrovčkom. Pazimo, da se papir ne zmoči.
- Bučko prestavimo v vodno kopel na 37°C za eno uro.

V primeru, da so v krmi cianidi, se predhodno rumeni lističi obarvajo opečnato rdeče.

Pozitivna kontrola (glede na Direktivo 2002/32/ES o nezaželenih snoveh v živalski krmi) je pripravljena za oceno 50 mg HCN/kg krme.

- V bučko odpipetiramo 25 µl pripravljene raztopine 5 % KCN.
- Dodamo 100 mL destilirane vode.
- Dobro premešamo.
- Dodamo 5 kapljic kloroforma, pripravljeni filter papir pa zatakujemo skupaj s pokrovčkom. Pazimo, da se papir ne zmoči.
- Bučko prestavimo v vodno kopel na 37°C za eno uro.

8.2 DOLOČANJE NITRATOV IN NITRITOV

Najpomembnejši viri pri zastrupitvah živali z nitrati in nitriti so voluminozna krma, mineralna gnojila in voda. Prežvekovalci so za takšne zastrupitve zelo občutljivi, ker se v vampu prosti nitrati hitro reducirajo do nitritov, ti pa se resorbirajo.

Zastrupitev z nitrati in nitriti ugotovimo na osnovi pregleda krme, preiskave vampovega soka, krvne plazme, seruma ali očesne tekočine. Mikrobi v vampovem soku razgradijo nitrate, zato moramo ob sumu na zastrupitev preiskave opraviti takoj ali pa sok zamrzniti. Lahko ga tudi konzerviramo s koncentrirano (37 %) HCl. Vampovemu soku (približno 100 mL soka) dodamo 2 mL HCl, da oborimo mikrobo. Omenjeni način uporabljamo predvsem pri načrtnih preiskavah krme glede na nitrate in nitrite v določenem hlevu. Opravimo lahko tudi preiskave krvi, kjer ugotavljamo koncentracijo methemoglobina (MHb). Pri milejših zastrupitvah je v krvi 20 % MHb, pri hujših pa do 57 % MHb.

Zastrupljene živali zdravimo z metilenskim modrilom (*i.v.*), ki reducira MHb, da ponovno odda kisik. Uporabljamo tudi sredstva za krepitev srca in zaščito jeter ter omejimo pokladanje krme, ki vsebuje preveliko količino nitratov in nitritov.

Rezultati naših preiskav so pokazali, da je okoli 5 % vzorcev trave in 9 % vzorcev silaže vsebovalo preveč nitratov. Realna nevarnost za zastrupitev z nitrati je zlasti v času krmljenja konzervirane voluminozne krme.

Dovoljene količine nitritov v ribji moki in popolnih krmnih mešanicah so navedene v Direktivi 2002/32/ES o nezaželenih snoveh v živalski krmi.

8.2.1 KVALITATIVNO DOLOČANJE NITRATOV IN NITRITOV V KRMI

Za kvalitativno ugotavljanje nitratov in nitritov uporabljamo poseben reagent, ki je sestavljen iz 0,5 g difenil amina; raztopimo ga v 20 mL vode in dodamo 80 mL koncentrirane H_2SO_4 . Nastanek izrazito modre barve je znamenje večje količine nitratov in nitritov v vzorcu (slika 48).



Slika 48: Kvalitativno določanje nitratov in nitritov (levo: negativna reakcija, desno: pozitivna reakcija)

Če je v krmi za prežvekovalce več kot 1,5% nitratov, obstaja možnost za zastrupitev. Pri konzervirani krmi so nevarne vrednosti > 1%, jetra pa so obremenjena že pri 0,5-0,75%.

8.2.2 SPEKTROFOTOMETRIČNA METODA

Vsebnost nitratov in nitritov v krmi lahko določamo tudi spektrofotometrično. Osnovni princip spektrofotometrije je opisan v poglavju 7.4.

Vzorec krme ekstrahiramo z raztopino kadmijevega in barijevega klorida. Nitrate reduciramo na kadmijevi koloni do nitritov in vsebnosti določimo spektrofotometrično.

PROTOKOL ŠTEVILKA 14: DOLOČANJE NITRATOV IN NITRITOV V KRMI S SPEKTROFOTOMETRIČNO METODO

PRIPRAVA VZORCA KRME

- V merilno bučko natehtamo 10 g vzorca, dodamo 100 mL 5 % raztopine kadmijevega in barijevega klorida (CdCl_2 in BaCl_2) in 100 mL destilirane H_2O ter pustimo stati 1 uro. Zmes občasno premešamo.
- Dodamo 20 mL raztopine NaOH (2,5 M) in dopolnimo z destilirano H_2O do oznake.
- Raztopino prefiltriramo skozi filtrirni papir. Če je filtrat moten, ga centrifugiramo.
- V merilno bučko (100 mL) odpipetiramo 10 mL pufrske raztopine amonijevega klorida (NH_4Cl) in dopolnimo s filtratom do oznake.
- Za določitev nitritov v merilno bučko (50 mL) odpipetiramo 25 mL pripravljene raztopine in 15 mL destilirane H_2O ter nadaljujemo s postopkom za obarvanje raztopine. To je vzorec za prvo meritev.
- Za določitev nitritov in nitratov odpipetiramo 25 mL pripravljene raztopine ter nadaljujemo s postopkom redukcije na koloni. To je vzorec za drugo meritev.


REDUKCIJA NA KOLONI

- Na pripravljeno kadmijevo (Cd) kolono zaporedoma zlijemo posamezne delovne standardne raztopine oziroma ustrezno količino vzorca in jih pustimo teči skozi kolono s konstantnim pretokom 3–5 mL/min. Eluat lovimo v merilno bučko (50 mL).
- Kolono prelijemo s 15 mL raztopine NaCl in eluat lovimo v isto merilno bučko.
- Kolono med posameznimi standardnimi raztopinami in vzorci speremo s 25 mL 0,1 M HCl , z dvakrat po 25 mL destilirane H_2O in s 25 mL razredčene pufrske raztopine NH_4Cl .

RAZVIJANJE BARVE

- V 50 mL merilne bučke z eluati odpipetiramo po 5 mL raztopine sulfanilamida (0,5 %), dobro premešamo in pustimo stati 3 minute.
- Nato v bučke dodamo po 2 mL 0,5 % raztopine N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorida in dopolnimo z destilirano H_2O do oznake. Bučke dobro pretresemo in jih pustimo stati 20 minut.
- Absorbanco raztopine merimo v kiveti (1 cm) na spektrofotometru pri valovni dolžini 540 nm.

Koncentracijo analita v končni raztopini vzorca razberemo iz umeritvene krivulje. Vsebnosti nitratov in nitritov, ki jih izrazimo v mg NaNO₃/kg in mg NaNO₂/kg, izračunamo po naslednji enačbi:


$$x = \frac{c \cdot x \cdot f}{m}$$

kjer je m zatehta vzorca, izražena v g, c koncentracija dušika v končni raztopini vzorca, izražena v µg/mL in f faktor, v katerem je zajet volumen ekstrakcijskih reagentov, vse razredčitve do končne raztopine in pretvorniki med enotami. Iz prve meritve izračunamo vsebnost nitritov, iz druge pa vsoto nitritov in nitratov. Vsebnost nitratov izračunamo iz razlike med drugo in prvo meritvijo.

DELOVNI LIST: DOLOČANJE NITRATOV IN NITRITOV

Datum:

Analitik:

Številka vzorca	Vrsta vzorca	Zatehta vzorca (g)	Absorbanca (nitriti)	Absorbanca (nitriti+nitrati)	Rezultat (mg NaNO ₂ /kg)	Rezultat (mg NaNO ₃ /kg)

Datum priprave osnovne standardne raztopine:

Delovne standardne raztopine:

Koncentracija (µg N/mL)	Absorbanca

Opombe:

LITERATURA

1. Lange CEM, Nyachotti CM, Verstegen MWA. The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animals. In: Moughan PJ, Verstegen MWA, Visser-Reyneveld MI, eds. Feed evaluation, principles and practise. Wageningen: Wageningen Pers, 2000: 169-89.
2. Žust J, Pestevšek U, Vengušt A, Jakovac Strajn B. Patologija prehrane goved, malih prežvekovalcev, prašičev in perutnine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009.

9 ANALIZA SILAŽE IN VAMPOVEGA SOKA

V tem poglavju so opisane analize silaže in vampovega soka, ki se v praksi izvajajo redko. Kljub temu so podatki, ki jih dobimo na podlagi opisanih analiz, pomembni za oceno ustreznosti prehrane prežvekovalcev in prav je, da jih študenti veterinarstva poznajo.

9.1 ANALIZA SILAŽE

Bistvo siliranja (okisanja) krme je v tem, da z nastajanjem organskih kislin, posebno mlečne, preprečimo delovanje škodljivim mikroorganizmom v sveži krmi in krmo na ta način konzerviramo. Procesi v silosu so delno rastlinsko fiziološkega, v večji meri pa mikrobiološkega značaja. Pri aerobnih pogojih, ki so značilno za prvo dobo po polnjenju silosa, se silirna masa segreva, porabljajo se ogljikovi hidrati, nastaja pa tudi CO_2 , ki pomaga pri ustvarjanju anaerobnih razmer. Več kot je kisika, bolj se masa segreva in večje so izgube, zato moramo silos po končanem polnjenju čim bolj neprodušno zapreti. Na materialu, ki ga vnašamo v silos, je veliko mikrobov, zato nastajajo v silaži na začetku različna vrenja: alkoholno, kislinsko pa tudi gnilobni razkroj. V največji meri nastaja očetna kislina, vendar v dobro pripravljene silaži kmalu prevlada mlečnokislinsko vrenje. Mlečnokislinske bakterije potrebujejo za svoje delovanje zadostne količine ogljikovih hidratov (OH), predvsem mono- in disaharidov. Mlečna kislina ovira razvoj drugih, za silažo škodljivih mikroorganizmov. Ko se pH v silaži zniža pod 4,2 začnejo odmirati tudi mlečnokislinske bakterije, silaža postane primerna za krmljenje (17 do 21 dni). Če v prvih treh dneh ne prevlada mlečnokislinsko vrenje, se silaža začne kvariti. Predvsem se to dogaja, če smo z rastlinami vnesli v silos tudi zemljo ali pesek, ki spreminjata reakcijo substrata v alkalno smer.

Pri ustreznem poteku fermentacije spremembe v silirani krmi, v primerjavi s travo, ne vplivajo bistveno na proizvodnjo in zdravstveno stanje živali. Pri slabo narejenih silažah pa lahko opazimo motnje v proizvodnji, reprodukciji in zdravstvenem stanju.

Povprečna travna silaža naj bi vsebovala < 26% surove vlaknine in > 70 g prebavljivih beljakovin (PB) v 1 kg SS.

Povprečna koruzna silaža pa naj bi vsebovala < 22% surove vlaknine in > 40g PB v 1 kg SS.

MLEČNOKISLINSKA FERMENTACIJA

Pri tej fermentaciji prevladuje mlečna kislina. Proizvajajo jo bakterije mlečnokislinskega vrenja, pri 25 do 35°C. Energijo dobijo iz sladkorjev, lahko tudi iz raznih organskih spojin, kisika ne potrebujejo. Nastala mlečna kislina se s produkti razgradnje beljakovin in tudi na druge načine deloma spet nevtralizira, zato moramo skrbeti, da je med siliranjem na voljo dovolj sladkorjev. Iz mlečne kisline v vampu nastaja propionska kislina, ki je prekursor za tvorbo glukoze (glukogena kislina).

OCETNOKISLINSKA FERMENTACIJA

V takšni silaži prevladuje očetna kislina. Bakterije očetnokislinskega vrenja so nevarne škodljivke silaže, ker sodelujejo pri proteolizi. Silažo lahko na ta način popolnoma pokvarijo, ker s svojimi produkti alkalizirajo substrat, višajo temperaturo in pripravljajo pogoje za gnilobni razkroj. Očetnokislinska fermentacija vpliva tudi na okusnost silaže in je v večjih količinah škodljiva za živali.

MASLENOKISLINSKA FERMENTACIJA

Kadar v silaži nastaja malo kislin, lahko prevladajo bakterije, ki proizvajajo masleno kislino (koliformne bakterije, klostridiji). Maslenokislinske bakterije razkrajajo različne organske snovi (sladkor, beljakovine), prav tako pa že nastalo mlečno kislino. Na ta način višajo pH v silaži. Posebno škodujejo z razgradnjo beljakovin, kar lahko ocenjujemo kot pravo gnitje. Za človeka ima takšna silaža značilen in neprijeten vonj, živali pa ne moti preveč.

127

KAJ PA PROPIONSKA KISLINA?

Tudi ta kislina nastaja normalno v silaži, pri oceni silaž pa jo prištevamo k mlečni kislini.

Opis vonja posameznih kislin:

- mlečna: aromatičen vonj,
- očetna: oster, pekoč vonj,
- maslena: vonj po žarkem maslu.

Pri oceni vpliva nižjih maščobnih kislin iz silaž na presnovne procese pri prežvekovalcih je treba upoštevati, da pri siliranju nastajajo iz ogljikovih hidratov iste maščobne kisline (očetna, maslena, mlečna) kot pri fermentaciji v vampu (mlečna kislina iz silaže se v vampu pretvori v propionsko kislino). V presnovi nastane iz propionske kisline predvsem glukoza, očetna in maslena kislina pa se uporabita za potrebe organizma po energiji, za sintezo

maščob ter tvorbo mlečne tolšče. Če upoštevamo, da je propionska kislina glukogena, maslena kislina pa ketogena, ni težko opredeliti posledic krmljenja z dobrimi mlečnokislinskimi silažami in silažami, v katerih prevladuje maslena kislina.

Silaže imajo lahko pomemben delež pri patologiji prehrane, zato mora veterinar vrste fermentacij in njihovo ustreznost prepoznati.

Metode, ki jih uporabljamo za analizo silaže so:

- organoleptična ocena,
- merjenje pH vrednosti,
- določanje nižjih maščobnih kislin oziroma njihovega razmerja (ocena po Fliegu – glej poglavje 4.3.1),
- ugotavljanje deleža dušika iz amonijaka (NH₃) v skupnem dušiku.

9.1.1 ORGANOLEPTIČNA OCENA SILAŽE

1. VONJ

Vonj	Točke
Aromatičen, blago kisel	14
Blag vonj po masleni kislini ali močan kisel vonj, blag vonj po praženem	8
Zmeren vonj po masleni kislini, močan vonj po praženem in zatohlem	4
Močan vonj po masleni kislini in amoniaku	2
Vonj po gnilem ali močno plesnivem	0

2. STRUKTURA STEBEL IN LISTOV

Struktura	Točke
Struktura listov in stebel ohranjena	4
Struktura listov načeta	2
Struktura močno načeta	1
Stebela in listi gnili in plesnivi	0

3. BARVA

Barva	Točke
Barva nespremenjena	2
Spremenjena barva	1
Močno spremenjena barva	0

KONČNA OCENA SILAŽ

Skupno število točk	Ocena
18 do 20	Zelo dobra
14 do 17	Dobra
7 do 13	Še zadovoljiva
Manj kot 7	Slaba

9.1.2 MERJENJE PH

Izmerjeni pH silaže ni osnovno merilo za oceno kakovosti silaže, ampak orientacijski podatek.

Postopek:

- Vzamemo en del silaže in 9 delov destilirane vode (na primer 100 g silaže in 900 mL destilirane vode).
- Pustimo stati en dan.
- Večkrat premešamo, nato zmerimo pH s pH metrom ali lističi za merjenje pH.

9.1.3 DOLOČANJE NIŽJIH MAŠČOBNIH KISLIN

Postopek določanja nižjih maščobnih kislin je opisan v poglavju 4.3.1.

9.1.4 DELEŽ DUŠIKA IZ AMONIJAKA V SKUPNEM DUŠIKU

S to analizo ugotavljamo, kolikšen del beljakovin se je razkrojil do amonijaka.

Postopek:

- Najprej po Kjeldahlu določimo skupni dušik v silaži (poglavje 3.1.2)
- Nato v stekleno bučko natehtamo 50 g silaže, dodamo 10 g MgO in 450 mL vode.
- Destiliramo amonijak in ga lovimo v kislino (HCl) znane molarnosti z dodatkom indikatorja (metiloranž). Titriramo s kislino in iz porabe izračunamo vsebnost amonijaka, iz vsebnosti amonijaka pa delež dušika iz amonijaka.
- Na osnovi deleža dušika iz amonijaka v skupnem dušiku nato ocenimo silažo (< 5 % odlična silaža; > 20 % slaba silaža)

9.2 PREISKAVA VAMPOVEGA SOKA

Osnova prebave v vampu je razgradnja ogljikovih hidratov do nižjih maščobnih kislin. Dnevno nastane približno 4 L očetne, 2 do 2,5 L propionske in 1,5 L maslene kisline. Pomembna je količina kislin (pri pomanjkanju ni dovolj energije) in pravo razmerje med njimi, na primer: če je preveč glukogenih kislin na račun lipogenih, ni dovolj mlečne tolšče. Vrsta krme vpliva na razmerja med posameznimi nižjimi maščobnimi kislinami:

- starejša voluminozna krma (veliko celuloze) – več očetne kisline,
- mlada voluminozna krma – več propionske kisline,
- več OH koncentratov – več propionske kisline.

Predvsem je kritična velika količina maslene kisline, ker je ketogena. Neobičajno je, če se tvori mlečna kislina. Mikrobi OH razgradijo do enostavnih sladkorjev, ki jih uporabijo v svojem metabolizmu. Iz enostavnih sladkorjev proizvajajo pirogrodno kislino, iz nje pa po različnih poteh nastajajo nižje maščobne kisline. Pri krmljenju živali s krmo, ki vsebuje veliko škroba, se kot vmesni produkt tvori mlečna kislina. Ker se ne more vsa tako hitro porabiti za tvorbo propionske kisline, se v vampu kopiči in zaradi svoje kislosti znižuje pH. Lahko povzroči zakisanje vampove vsebine, se pravi acidozo.

Druga skupina hranilnih snovi – beljakovine se v vampu pod vplivom proteolitičnih encimov, ki jih izločajo mikrobi, razgradijo do peptidov in do prostih aminokislin (AK). Razgradnja dela AK poteka še naprej do amonijaka, ki ga mikroorganizmi uporabijo za sintezo svojih beljakovin. Določena količina amonijaka je fiziološka. Pri preveliki količini lahko pride do zastrupitve, pri pomanjkanju pa se bo zmanjšala proizvodnja.

V primerih nepravilne fermentacije v vampu lastnik živali veterinarju običajno pove, da imajo težave s proizvodnjo, z beljakovinami in mlečno tolščo (morda tudi s količino mleka, vendar manj). Veterinar lahko odvzame vampov sok in opravi nekaj osnovnih preiskav. Na dodatne preiskave lahko vampov sok pošlje v laboratorij.

9.2.1 ORGANOLEPTIČNA OCENA

Barva vampovega soka je odvisna predvsem od krme. Pri krmljenju s senom je barva svetlo zelena (rjavozelena), pri pokladanju zelenega obroka ali pri živalih na paši je sok bolj zelene barve. Mlečno sivo barvo vampovega soka opazimo pri pokladanju velikih količin lahko prebavljivih ogljikovih hidratov. Rjav, temen vampov sok dobimo pri živalih, ki jih krmijo s pokvarjeno ali gnilo krmo nasploh. Na osnovi barve torej dobimo oceno o obroku.

Od vrste krme je odvisen tudi vonj vampovega soka. Pri pokladanju dobrega sena in kakovostne silaže ima vampov sok aromatičen vonj, pri pre-

komernem krmljenju z ogljikovimi hidrati pa kisel. Plesniv in gniloben vonj vampovega soka (po amonijaku) je zaradi obroka s preveliko količino beljakovin, nebeljakovinskih dušičnih snovi in zaradi pokvarjene ali gnile krme. Vonj vampovega soka moramo oceniti takoj po odvzemu. Če je sok temen in ima neprijeten vonj po amonijaku, lahko gre za zastrupitev z ureo (alkaloza). Vampov sok, ki ima vonj po kislem, je običajno svetle barve in ima zrnat sediment, kar je pogosto znamenje akutne ali kronične latentne acidoze.

Z organoleptično oceno vampovega soka lahko postavimo samo sum na določeno stanje v vampu (normalno, acidoza ali alkalozna).

9.2.2 RAZSLOJENOST VAMPOVEGA SOKA

Če se vampov sok razsloji v 4 do 5 minutah pomeni, da so mikrobi aktivni in razslojijo sok. Spodaj, na dnu opazimo belo meglico – to so protozoi. Po velikosti jih razdelimo na velike, srednje in majhne. Najbolj občutljivi so veliki, potem srednji in majhni. Ko se mikrobná flora obnavlja, gre v obratnem vrstnem redu – najprej se pojavijo majhni, nato srednji in na koncu veliki protozoi. Kapljico vampovega soka kanemo na predmetno stekelce in pod mikroskopom ocenimo velikost in gibljivost protozojev.

9.2.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI VAMPOVE MIKROFLORE Z METILENSKIM MODRILOM

To je enostaven in hiter test za določanje aktivnosti vampove mikroflore. Mikroorganizmi, ki so v vampovem soku namreč razgradijo metilensko modrilo in tako razbarvajo vampov sok.

Postopek:

- V dve epruveti nalijemo po 20 mL vampovega soka.
- V eno dodamo 1 mL 0,003 % metilenskega modrila (vsebina se obarva modro), druga nam služi kot kontrola.
- Pomešamo, damo v vodno kopel ali na sobno temperaturo ter merimo čas redukcije metilenskega modrila, se pravi čas razbarvanja.
- Razbarvanje vsebine v 1 do 6 minutah pomeni, da je aktivnost vampovih mikrobov dobra.
- Podaljšan čas razbarvanja pomeni slabšo aktivnost vampovih mikrobov.

9.2.4 MERJENJE PH

Vampov sok mora biti pravilno odvzet. Če mu je na primer primešana slina, je pH višji, razmerje kislina pa ostane isto. V primeru, da jemljemo sok pri poginulih živalih, je pomembna starost kadavra.

Normalen pH vampovega soka je blizu nevtralnega do rahlo kislega (6,5 do 7). Če je v krmi več OH koncentratov, bo bolj kisel (tvori se več kislina); bolj alkalen pa bo takrat, ko je v obroku preveč beljakovin, nebeljakovinskih dušičnih snovi ali ko je krma pokvarjena. pH zmerimo s pH metrom ali lističi za merjenje pH.

9.2.5 DOLOČANJE NIŽJIH MAŠČOBNIH KISLIN

Je enako kot pri silažah in sicer na plinskem kromatografu (poglavje 4.3.1). Vzorca vampovega soka ni potrebno posebej pripravljati, dovolj je, da ga prefiltriramo in injiciramo v kromatograf. Seveda moramo imeti standard, s katerim primerjamo dobljene rezultate analize vampovega soka. Rezultate prikazujemo v enoti mmol/L.

9.2.6 DELEŽ DUŠIKA IZ AMONIJAKA V SKUPNEM DUŠIKU

Postopek je enak kot pri določanju amonijaka v silaži (glej poglavje 9.1.4), le da kot vzorec vzamemo 50 mL vampovega soka.

- normalna vrednost NH_3 v vampovem soku je 8 do 50 mmol/L
- prevelika vsebnost NH_3 v vampovem soku (zastrupitev z ureo) je > 50 mmol/L

9.2.7 POŠILJANJE VZORCEV VAMPOVEGA SOKA V LABORATORIJ

Vzorci svežega vampovega soka je potrebno preiskati čim hitreje po odvzemu. Za določanje nižjih maščobnih kislin ga lahko tudi zamrznemo ali pa konzerviramo s koncentrirano solno kislino (HCl) v razmerju 20:1 – na primer, v stekleničko damo 95 mL vampovega soka in 5 mL 37 % HCl. Tako konzerviran vampov sok lahko stoji na sobni temperaturi vsaj en mesec.

LITERATURA

Žust J, Klemenc N, Vospernik P. Nova metoda za per os odvzem vzorcev vampove vsebine pri govedu. Zb Bioteh Fak Vet, 1972; 9: 169-75.

10 DODATNE ANALIZE KRME

10

10.1 DOLOČANJE VITAMINA C S TITRIMETRIČNO METODO

Večina živali (z izjemo primatov, buder in nekaterih vrst netopirjev) ima sposobnost, da same tvorijo vitamin C, kljub temu pa jim ga je priporočljivo dodajati v hrano v obdobju rasti in brejosti ter ob stresnih situacijah. Vitamin C je topen v vodi, nalaga se v jetrih, kjer ga je dovolj približno za 3 mesece. Vitamin C povečuje odpornost organizma, je močan antioksidant in tako varuje celice pred škodljivimi vplivi prostih radikalov, ki kemijsko uničujejo celične komponente. Prosti radikali so nestabilne snovi, ki so proizvod metabolizma, njihovo število pa povečujejo stresne situacije in strupi iz okolja. Vitamin C je pomemben tudi pri izgradnji kolagena. Kljub navedenemu pa se ne priporoča uživanje prevelikih količin vitamina C. Dokazano je, da pri psih velike količine vitamina C vplivajo na retencijo Ca. Pri ljudeh se pri prekomernem in dalj časa trajajočem zauživanju pojavijo driske, sečni kamni in preobremenitve z železom. Vitamin C lahko poškoduje tudi DNK.

Vitamin C določamo s titrimetrično metodo. Kot indikator uporabimo škrobovico. Titriramo z raztopino jodovice. Jod je močan oksidant. Dokler je v vzorcu askorbinska kislina (vitamin C), jo oksidira in se pri tem reducira. Ko se askorbinska kislina porabi, jod reagira s škrobom in raztopino obarva modro. Glede na porabo jodovice po formuli izračunamo koncentracijo vitamina C v vzorcu.

PROTOKOL ŠTEVILKA 15: DOLOČANJE VITAMINA C V KRMI S TITRIMETRIČNO METODO

REAGENTI:

1 M H₂SO₄

- Odpipetiramo 27,7 mL 96% H₂SO₄ v merilno bučko (500 mL) in dopolnimo do oznake z destilirano H₂O.

škrobovica

- Natehtamo 1,0 g škroba v 100 mL merilno bučko, ga raztopimo v manjši količini vroče destilirane H₂O in dopolnimo do oznake z destilirano H₂O.

0,1 N jodovica

- Natehtamo 12,7 g joda (I₂) v merilno bučo (1000 mL), dodamo 20 g kalijevega jodida (KI), raztopimo v destilirani H₂O in dopolnimo do oznake z destilirano H₂O.


STANDARD:

- natehtamo 100 mg vitamina C (askorbinska kislina) v erlenmajerjevo steklenico (300 mL)
- dodamo: 100 mL destilirane H₂O, 25 mL pripravljene H₂SO₄, 1 mL škrobovice
- titriramo z 0,1 N jodovico do preskoka barve iz brezbarvne raztopine v moder odtenek.

VZORCI:

- natehtamo primerno količino vzorca
- dodamo: 100 mL destilirane H₂O, 25 mL pripravljene H₂SO₄, 1 mL škrobovice
- titriramo z 0,1 N jodovico do preskoka barve iz brezbarvne raztopine v moder odtenek.

Izračun koncentracije vitamina C v vzorcu:


$$\text{vitamin C (mg/kg)} = \frac{V \text{ jodovice (ml)} \times f}{\text{zatehta vzorca (g)}}$$

f = 8,806 (v faktorju je upoštevana zatehta vzorca, molska masa in pretvorniki med enotami)


10.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE KLORIDOV V KRMI


Ko govorimo o kloridih, mislimo predvsem na natrijev klorid ali kuhinjsko sol, ki je nepogrešljiv dodatek krmi. Pogosto jo izdelkom dodajajo za izboljšanje okusa in povečanje ješčnosti živali. Prevelike količine soli v hrani lahko povzročijo povečan krvni tlak in poslabšajo stanje v zvezi s srčnimi boleznimi predvsem pri starejših živalih. Poznamo tudi zastrupitve s soljo.

Kloride določimo titrimetrično. Kot indikator dodamo kalijev kromat (K_2CrO_4), ki raztopino obarva rumeno. Pri titraciji s srebrovim nitratom ($AgNO_3$) nastane v vzorcu oranžna oborina. Glede na količino porabljenega srebrovega nitrata po formuli izračunamo koncentracijo kloridov in natrijevega klorida v vzorcu.

PROTOKOL ŠTEVILKA 16: DOLOČANJE KLORIDOV V KRMI S TITRIMETRIČNO METODO

- V merilno bučko (250 mL) natehtamo 5,0 g vzorca.
- Dodamo do polovice destilirane vode.
- Premešamo, pustimo stati 30 do 60 minut.
- Dopolnimo z destilirano vodo do oznake.
- Filtriramo v bučko (100 mL).
- Odpipetiramo 50 mL filtrata v erlenmajerjevo steklenico.
- Dodamo 5 kapljic K_2CrO_4 (raztopina se obarva rumeno).
- Titriramo z 0,1 M $AgNO_3$.


$$\mathbf{Kloridi (\%) = AgNO_3 (ml) \times f_1}$$


$$\mathbf{NaCl (\%) = AgNO_3 (ml) \times f_2}$$

$f_1 = 0,355$ (v faktorju so upoštevane zatehta vzorca, molske mase, razredčitve, koncentracija $AgNO_3$ in pretvorniki med enotami)

$f_2 = 0,585$ (v faktorju so upoštevane zatehta vzorca, molske mase, razredčitve, koncentracija $AgNO_3$ in pretvorniki med enotami)

11 NADZOR KAKOVOSTI REZULTATOV LABORATORIJSKIH ANALIZ

Za opravljanje preiskav za uradni nadzor mora biti laboratorij akreditiran v skladu s standardom ISO/IEC 17025 (Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev), s čimer zagotavlja kakovostne in primerljive rezultate analiz. V skladu z zahtevami standarda morajo biti vsi postopki v laboratoriju (na primer sprejem in priprava vzorcev, analizni postopki, prikaz rezultatov analiz, kalibracije in preverjanje aparatur, usposabljanje izvajalcev analiz ...) opisani in dokumentirani. Analizni postopki morajo biti pred uporabo validirani. Z validacijo dokažemo, da je postopek glede na svoje značilnosti (merilno območje merjenja, pravilnost, natančnost, meja zaznavnosti, meja vrednotenja) primeren za predvideno uporabo (za določeno vrsto vzorca). Pri validaciji preverjamo parametre kot so linearnost, izkoristek, ponovljivost in znotraj laboratorijska obnovljivost postopka, meja zaznavnosti in meja vrednotenja oziroma meja odločitve (decision limit, CC α), sposobnost zaznavanja (detection capability, CC β) ter robustnost analiznega postopka.

Za nadzor analiznega postopka uporabljamo:

- analizo t.i. slepih vzorcev (vzorci brez iskanega analita),
- ponavljajoča testiranja,
- analizo kontrolnega vzorca (vzorec z znano koncentracijo iskanega analita),
- analizo certificiranih referenčnih materialov (materiali z znano sestavo),
- kontrolne karte ter
- sodelovanje v medlaboratorijskih primerjavah (analiza enakega vzorca v dveh ali več različnih laboratorijih. Na ta način preverjamo usposobljenost laboratorijev).

LITERATURA

Slovenski standard PSIST EN ISO/IEC 17025. Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev. Ljubljana: Urad Republike Slovenije za standardizacijo in meroslovje, 2002.

