



Forord

Denne masteroppgaven avslutter vårt 2 års masterprogram innen matvitenskap ved instituttet for kjemi- og biovitenskap (IKBM) og ble gjort i samarbeid med instituttet for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA).

Vår interesse innen mat og matforskning gjorde at valget av oppgaven falt på en parallellgruppestudie med broiler kyllinger der påvirkningen av syrebelastning på beinstyrke skulle studeres. Siden vi var to som skulle samarbeide med oppgaven så innebar dette å planlegge både det praktiske og det teoretiske arbeidet godt. Vi er to gode venner som har studert sammen i 5 år, så vi så den potensielle utfordringen med å dele på samme oppgave. Dette problemet ble enkelt løst ved å planlegge utførelsen nøye slik at det ikke oppstod konflikter. Igjennom hele oppgaven så har denne utførelsen fungert meget godt. Men det er ikke bare vi to som har utført denne oppgaven alene.

Vi vil rette en spesiell stor takk til vår hovedveileder Anna Haug ved IHA for bistand til denne oppgaven. Anna har fra starten av forsøket jobbet tett med oss, både når det gjaldt den praktiske delen og under den teoretiske. Hun har hele tiden fulgt oss opp ved å avtale møter ofte og bedt oss om å sende fremdriften på oppgaven fortløpende.

Vi vil også få takke Marianne B. Skarra og Frank Sundby og de resterende som jobbet i kyllinghuset. De sørget alle for at kyllingene hadde det trygt og godt igjennom hele forsøket.

Eirik Johan Kildal Hansen og Jonas Kosberg

Ås 2014

Sammendrag

Alle former for mat har en pH som forteller hvor surt eller basisk produktet er. Matens pH har oftest liten betydning for syre-base balansen i kroppen. Maten kan klassifiseres som syredannende eller basedannende etter hvordan maten påvirker urin-pH. Det er velkjent at uorganiske syrer slik som fosforsyre vil gi økt syrebelastning og sur urin, mens organiske syrer i maten, slik som finnes i sitroner vil gi basisk urin. Grunnen er at organiske syrer ofte er bundet til ioner slik som kalium, magnesium, natrium og kalsium, og når de organiske saltene forbrennes vil deres negative ladning måtte erstattes av OH-ioner for at elektronøytraliteten skal opprettholdes. Ved for mye syre/base inntak vil både lungene og nyrene kompensere denne pH-forandringen ved å skille ut stoffer som motvirker ubalansen. En økende syrebelastning i kroppen fører til at skjelettet frigjør kalsium for å kompensere for den økte syrligheten. Dette kan føre til en høyere kalsiumutskillelse i urinen som kan over tid føre til en redusert beinstyrke. Over tid har det vist seg at den økte syrebelastningen kan være en årsak til økt beinskjørhet (osteoporose). Dagens inntak av mat med tilsetning av uorganisk syre, som for eksempel coladrikker, har økt betraktelig de siste femti årene og kan være en medvirkende årsak til økt syrebelastning i kroppen.

Det ble utført et preliminært forsøk på broilerkyllinger for å avdekke hvordan tilsetning av ulike syrer i drikkevannet vil påvirke beinhelsen. 100 kyllinger ble bestilt fra Samvirkekylling, Nortura AS som skulle bli brukt i et forsøk der syrene fosforsyre, sitronsyre og ammoniumklorid skulle testes igjennom oppdrettskyllingens levetid. Kyllingene ble delt opp i fire grupper der en gruppe fikk sitronsyreløsning og den andre gruppen fikk fosforsyreløsning mens den siste gruppen fikk ammoniumkloridløsning. En kontrollgruppe fikk vann og var referansen for forsøket. Igjennom kyllingens levetid som var på 25 dager fikk kyllingene normalt kraftfôr, men ulik vannløsning igjennom hele forsøket. Beinstyrken ble bestemt med en knekktest av kyllingens lårben. Dyrenes vekt og levervekt ble bestemt. Blodprøvene skulle påvise om leveren fungerte normalt hos kyllingene. Det ble ikke påvist noen signifikante forskjell og resultater mellom gruppene på at økt syrebelastning reduserer beintettheten på lårbenet til kylling. Det ble i midlertidig avdekket at økt inntak av sitronsyre ga en signifikant redusert vekt av kyllingene.

Det er flere studier som konkluderer med at en økning av syrebelastning har en signifikant negativ effekt på beinhelse. Videre arbeid med ulike doser av syretilsetning og ved ulike alder på dyrene er nødvendig for å avdekke om en økt syrebelastning har en negativ effekt på beinhelse hos kyllinger.

Summary

All forms of food has a pH indicates how acidic or basic product is. The food's pH usually have little impact on acid - base balance in the body. The food can be classified as acid-forming or base-forming for how food affects the urinary pH. It is well known that inorganic acids such as phosphoric acid will increase the acid load and urinary acid and organic acids in the food, such as that found in lemons will provide alkaline urine. The reason is that organic acids are often bound to ions such as potassium, magnesium, sodium and calcium, and when the organic salt is combusted will their negative charge be replaced by OH⁻ ions so that the electric neutrality can be maintained. When too much acid / base is consumed both lungs and kidneys will compensate this pH change by separating substances that counteract the imbalance. An increasing acid load in the body causes the bones to release calcium to compensate for the increased acidic accuracy. This may cause a higher excretion of calcium in the urine as it may over time lead to a decrease in bone strength. Over time it has been shown that the increased acid load may be a cause of increased osteoporosis. Today's food intake with the addition of inorganic acid, such as cola drinks, have increased significantly over the last fifty years and can be a contributing factor to increased acid load in the body.

An experiment was conducted preliminary on chickens to reveal how the addition of various acids in the drinking water will affect bone health. 100 chickens were ordered from Samvirkekylling, Nortura AS that would be used in an experiment where the acids phosphoric acid, citric acid and ammonium chloride would be tested throughout the chicken's lifetime. The chicks were divided into four groups where one group received citric acid solution and the other group received phosphoric acid solution while the last group received ammonium chloride. A control group received water and was the reference for the experiment. Through the chicken's life which was at 25 days were given normal feed, but different water solution throughout the experiment. Bone strength was determined with a kink test of the chicken femur. The animals' weight and liver weight was determined. Blood samples were to determine whether the liver functioned normally in chickens.

The study revealed no significant difference between the groups and results in increased acid load reduces bone density of the femur to the chicken. It was in temporary revealed that increased consumption of citric acid resulted in a significant reduction in weight of the chickens.

There are several studies that conclude that an increase in acid load has a significant negative effect on bone health. Further work with different doses of acid additive and at different ages of the animals is necessary to determine whether an increased acid load has a negative effect on bone health in chickens.

Innhold

Forord	
Sammendrag	
Summary	
Innledning.....	1
1. Beinets fysiologi	2
1.1. Beindannelse.....	3
1.1.1. Endokondral beindannelse	3
1.1.2. Intramembrøs beindannelse.....	4
1.2. Osteoblaster	4
1.3. Osteocytter.....	5
1.4. Osteoklaster	5
1.5. Skjelettet som et bufferlager	6
2. Beinhelse.....	7
2.1. Hvordan syrebelastning påvirker beinstyrke	8
2.1.1. Fosforsyre.....	8
2.1.2. Ammoniumklorid	9
2.1.3. Sitronsyre	10
2.1.4. Hvordan kroppen regulerer syrebelastning	11
2.2. Økt syrebelastning ved kostholdet.....	12
2.2.1. Andre risikovirkninger ved inntak av sukkerholdige drikkevarer.....	13
2.3. Bruskonsum i Norge	13
3. Utstyr og metode.....	15
3.1. Kjemikalier	15
3.2. Fôr.....	15
3.3. Analytisk innhold:	15
3.4. Ingredienser	15
3.5. Tilsetningsstoffer (per kg)	16
3.6. Laboratorieutstyr	16
4. Metode og utførelse	17
4.1. Del I – Teoretisk arbeid av oppgaven.....	17
4.2. Del II – Praktisk utførelse av oppgaven	18
4.3. Tillaging av drikkevann.....	18
4.4. Mottak av kyllingene	20

4.5.	Fôring.....	20
4.6.	Temperatur og lysprogram	21
4.7.	Videre gjennomføring av prosjektperioden.....	21
4.8.	Avlivning	22
4.9.	Dissekering	23
4.10.	Analysering av blodprøver.....	23
4.11.	Knekktest	24
4.12.	Statistiske analyser	25
5.	Resultater	26
5.1.	Væskeforbruk	38
6.	Diskusjon	39
6.1.	Syreløsningenes påvirkning av vekt.....	39
6.2.	Påvirkning av syre på beinstyrke.....	41
7.	Videre arbeid.....	44
8.	Konklusjon.....	44
	Vedlegg 1	47
	Vedlegg 2	48
	Vedlegg 3	49
	Vedlegg 4	50
	Vedlegg 5	59
	Vedlegg 6	60

Innledning

Oppgavens hovedmål er å se på risikoen for økt syrebelastning ved inntak av bruholdige drikkevarer og hvilken effekt dette har på beinhelsen til kyllinger.

Brus er en av årsakene til at 310 millioner mennesker verden over lider av diabetes type to og i Norge har brusøkningen nesten tidoblet siden 1950 årene, men bak kulissene av denne folkesykdommen så ligger det andre negative effekter ved for mye inntak av brusholdige drikkevarer. Tidligere forskning er tvetydige på spørsmålet om økt inntak av brus gir en økt risiko for syrebelastning, men det er enighet om at for mye inntak av syre kan gi økt syrebelastning som igjen kan føre til redusert beinohelse og kan også være årsaken til det økte antallet av påvist osteoporose. Dagens kosthold bærer for mye preg av syredannende mat og forskere er enige om at mengden basisk mat er nødt til å økes for å kompensere for det økte syreinnholdet i kroppen.

Oppgaven vil først og fremst være en teoretisk oppgave som setter fokus på ulike forskningsrapporter som er gjort om syrebelastning og hvordan denne belastningen påvirker beinmetabolismen. Det vil i tillegg bli utført en praktisk oppgave der 100 kyllinger blir fordelt i 4 grupper der de får tilsatt to ulike syrer, en organisk og en uorganisk syre, samt en base. Sitronsyre er en organisk syre som finnes i flere sitrusfrukter, men det er også et tilsetningsstoff som finnes i brus med syrlig smak, eksempelvis sitronbrus. Fosforsyre er en uorganisk syre som også er et ofte brukt tilsetningsstoff blant annet til coladrikker. Gruppen som får base vil få tilsatt ammoniumklorid. Den siste gruppen er en større kontrollgruppe som får servert vanlig vann. Disse stoffene blir tilsatt i drikkevannet til kyllingene under hele vekstperioden. Etter slakting vil blodprøver og måling av beinstyrke gi resultater som kan støtte opp mot teorien som sier at syrebelastende mat eller drikke kan gi nedsatt beinohelse. Det vil i tillegg til beinohelse også sett på andre effekter som kan ha en virkning ved økt syrebelastning, som leverskader og vektøkning.

Oppgaven vil til slutt bli diskutert med bakgrunn av teori og den praktiske utførelsen.

1. Beinets fysiologi

Bein består av en organisk del og en uorganisk del som i stor grad består av kalsiumfosfat krystaller. Den organiske delen er bygd opp av kollagenfibre som er deponert ekstracellulært av de beinformerende cellene som blir kaldt osteoblaster. Kollagenet i beinvevet er likedan som i sener, leddbånd, muskelkjeder og hud. En anslår at det er ca. 90 % av kollagenet av denne typen i kroppen. Fibrene i kollagenet støtter beinet for å motstå spenninger og krefter, mens mineraler har den egenskapen at de styrker beinet. I tillegg til kalsium og fosfat inneholder bein ulike mineraler som natrium, magnesium og kalium. Skjelettet utgjør 9 % av kroppen, og ca. 17 % av vekten hos et menneske. Beindannelse blir gjort på to måter intramembrøs bendannelse og endokondral bendannelse, og inneholder de spesielle cellene osteoblaster, osteocytter og osteoklaster (Sjaastad et al. 2010). Kalsium er et av de viktigste stoffene i bein, og uten et tilstrekkelig inntak er det ikke mulig å bygge eller opprettholde en helt normal skjelettmasse. Kalsium blir ofte relatert til beinmasse og beinoppbygging, men det er også et viktig stoff for motvirkning av osteoporotisk fraktur/brudd (Heaney 2013). I mennesker og andre pattedyr øker kronisk metabolsk acidose kalsiumutskillelse via urinen og for det andre direkte reduksjon av kronisk nyresvikt kalsiumresorpsjon som resulterer i en negativ kalsiumbalanse. En negativ kalsiumbalanse i beinet kan føre til svakere bentetthet (Bushinsky et al. 2003).

Lavt kalsiuminntak forårsaker alltid en økning av paratyroidehormon (PTH) som har sin oppgave å regulere kalsiumbalansen i kroppen. PTH-utskillelse skjer når kalsiumnivået er blitt for lavt som fører til at det frigjør kalsium fra skjelettet og senker kalsiumutskillelsen i nyrene. PTH stimulerer også syntesen av vitamin D i nyrene og vil være med på å øke opptak av kalsium fra tarmen (Gerdes & Kjeldsen 2010). Vitamin D er essensiell for beinmineraliseringen som bidrar til gjenoppbygging ved brudd samt dannelse av nytt bein (Gorter et al. 2014). I flere år har det vært kjent at Vitamin D er viktig for kalsium og fosfor metabolismen. Den best forståtte funksjonen av Vitamin D er at det hever kalsium og fosforkonsentrasjonen til et nivå som er nødvendig for å støtte om den normale beinmineraliseringen (Jongbloed 1987).

Når PTH-utskillelsen skjer så vil det gå ut over oppbyggingen av de tynne beinbjelkene (trabekler) som fungerer som grunnpilarer i skjelettet. Ved å redusere denne hormonutskillelsen av PTH så vil også faren for brudd avta. Kalsium fungerer som en beskyttelse mot beintap, men det virker som at det ikke er i stand til å gjenopprette tapt bein. Det ble gjort en studie av friske eldre mennesker som ble gitt tilskudd av kalsium og vitamin

D (Heaney 2013). Her ble det observert at i placebogruppen som ikke fikk tilskudd ble beintap direkte relatert til proteininntak. Dvs. jo høyere proteininntak, jo større var beintapet. Dette kan ha vært en refleksjon av effekten av proteiner på kalsiumutskillelse i urinen. Det ble derimot observert at de som hadde et høyere kalsiumtilskudd og proteintilskudd fikk motsatt virkning som gjorde beintettheten større. En mulig forklaring kan være den positive interaksjonen mellom kalsium og protein. Bein inneholder mineraler samt proteiner, og proteiner utgjør ca. 50 % av beinets totale volum. Beinproteiner går igjennom en omfattende modifikasjon der ny matrise blir syntetisert og deponert. Når beinet senere blir ombygget og dets komponenter er demontert så kan kalsium og fosfor bli brukt om igjen til mineraler til andre steder på beinet. Derfor vil en optimal ny beindannelse ikke bare være avhengig av mineraler, men også av et godt proteininntak. Melkeprodukter er en god kilde for kalsium, men det er også en god kilde for proteiner med god kvalitet for å opprettholde en sterk beinstyrke. Det er derimot gjort for lite forskning om denne samhandlingen mellom proteiner og kalsium kan ha en effekt på å reversere beintap i forhold til osteoporose (Heaney 2013).

1.1. Beindannelse

Bein kan bli formert av en konvertering fra brusk til beinvev som blir kaldt endokondral beindannelse, og ved beindannelse av fibrøse bindevevsmembraner som blir kaldt intramembrøs beindannelse (Sjaastad et al. 2010).

1.1.1. Endokondral beindannelse

I starten når dyret er et foster er skjelettet bygd opp av brusk. Fosteret er omringet av fostervann og er ikke eksponert for mekaniske påkjenninger. Beindannelsen begynner å utvikle seg i større grad etter en tredel av graviditeten er unnagjort. Ved fødsel vil skjelettet inneholde større mengder av brusk som enda ikke er omdannet til bein og dette medfører at styrken på skjelettet så tidlig ikke er like sterkt som ved senere i livet. Beindannelse av brusk, og den påfølgende veksten i lengde av beinene fortsetter en stund etter puberteten. Veksten i lengderetningen skjer ved ujevne plater av brusk som går gjennom beinet. Disse platene blir ofte omtalt som epifyseal-brusk eller groende plater. Endokondral beindannelse starter i bruskbeinet som kalles det primære beindannelsessenteret. Først blir en krage av beinvev dannet i bindevevet som ligger rundt brusken. Det ytterste laget av dette bindevevet blir senere til beinmembran (periosteum), og brusken i beindannelsessenteret blir gradvis erstattet av bindevev. Dannelsen av beinvevet vil deretter gå imot enden av beinet og omdanne brusk til beinvev. Kort tid både før og etter fødselen vil beindannelsen starte i en eller flere sekundære beindannelsessentre ved enden av bruskbeinet og jobbe seg mot midten. I de ytre

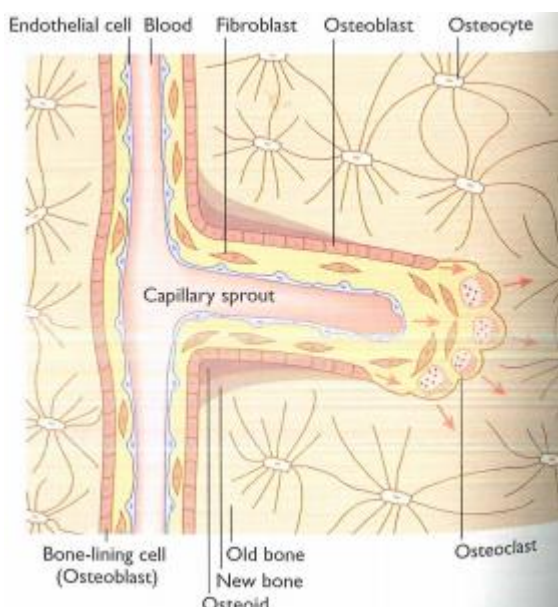
delene av beinet vil beindannelsen stoppe opp før all brusken blir erstattet, og det gjenværende vevet blir omdannet til leddbrusk. Under dyrets vekst vil cellene i epifyseal (leddbrusken) dele seg hurtig og produsere bruskvev i samme takt som brusk blir omdannet til bein. Den kontinuerlige dannelsen av beinvev medfører en forlengelse av beinet, og celledelingen i leddbrusken blir stimulert av veksthormoner (Sjaastad et al. 2010).

1.1.2. Intramembrøs beindannelse

I flate bein vil membraner bygget opp av fibrøse bindevev som formes av mesenkymale celler, og de vil være den første støttende strukturen i det nye beinvevet. De mesenkymale cellene omgjøres til osteoblaster noe som former osteoid som blir mineralisert. På samme måte som i endokondral beindannelse er osteoblaster innebygget i det nye beinvevet og blir dannet til osteocytter. Bein som blir formet ved intramembrøs beindannelse har den samme mineraltetthet og styrke som ved endokondral beindannelse (Sjaastad et al. 2010).

1.2. Osteoblaster

Osteoblaster er spesialiserte celler som produserer nytt beinvev som er en del av både det interne og eksterne overflaten i beinet. Osteoblaster syntetiseres og skiller ut kollagen og proteoglykaner (som er store molekyler bestående av ett eller flere lineære polysakkarider festet til et protein), og former den organiske delen i beinet. Det ekstracellulære materialet som former osteoblaster kan ofte omtales som osteoid. Under formasjonen av beinet blir krystaller av kalsium fosfat deponert inn i osteoidet. Proteiner og proteoglykaner som blir



Figur 1: Osteoblaster er celler som produserer nytt beinvev. Figuren illustrerer hvordan ombygning av bein foregår. Bilde: (Sjaastad et al. 2010)

skilt ut av osteoblastene er nødvendig for krystalliseringsprosessen i beinet.

Krystallformasjonen oppstår momentant når kalsium fosfat blir løst opp. Osteoblastene frigjør enzymer, alkalisk fosfat i den ekstracellulære vesken. Enzymene øker konsentrasjonen av fosfationer ved å spalte esterbindingen som binder sammen fosfatgruppen til ulike organiske molekyler.

Osteoblaster bidrar også til formasjonen av kalsiumfosfat ved å samle kalsiumioner (Ca^{2+}) i intracellulære vesiklene (en sekk i cellen). Ca^{2+} fra vesiklene blir frigitt til den intracellulære fluidet under formasjonen av beinet, samt øker

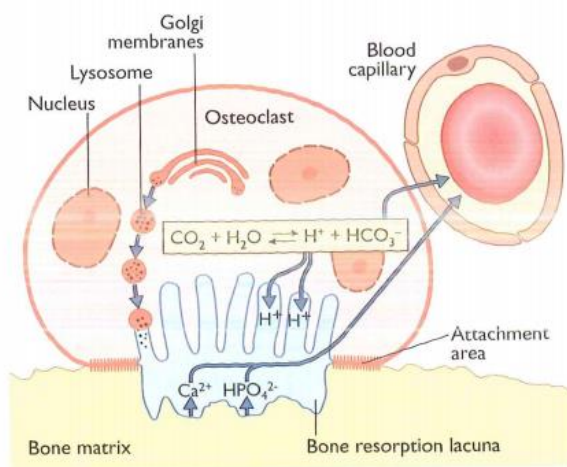
konsentrasjonen av Ca^{2+} (Sjaastad et al. 2010). Osteoblaster som omtales som de beinformerende celler som jobber i grupper for å skille ut og mineralisere ny beinmatrise (figur 1). Aktive osteoblaster utgjør en stor del av alkalisk fosfatase, noe som etter all sannsynlighet hjelper mineraliseringen ved å frigjøre uorganisk fosfat (Arnett 2007).

1.3. Osteocytter

I områder med aktiv beinformasjon blir osteoplastene blir integrert i det mineraliserte beinvevet. Cellene mister sin evne til å formere matrisematerialet, og osteocytterne som er stengt inne vil opprettholdes som levende vev. Osteoplastene som blir værende igjen på overflaten av beinet når mineraliseringen er ferdig blir omtalt som beinførende celler. Disse cellene bytter på å erstatte osteoblaster. Osteocytterne har en lang tynn cytoplasmisk forlengelse som sprer seg i et stjerneformet mønster fra cellens kropp. Forlengelsene er koblet sammen med naboceller, og oppholder seg i et nettverk av tynne intracellulære kanaler gjennom beinvevet. Kanalene er viktige fordi de transporterer næringsstoffer, metabolitter og hormoner mellom overflaten og på innsiden av beinvevet. Den store overflaten på osteocytterne bidrar til stor kontakt mellom beinmineral krystallene og gjenskerer viktigheten av osteocytterne for transporten av kalsium og fosfor fra beinet til det ekstracellulære fluidet (Sjaastad et al. 2010).

1.4. Osteoklaster

Osteoklastene har en viktig funksjon ved å tilpasse beinet til den mekaniske belastningen, endring av formen og krumningen av beinet under vekst. Denne prosessen kalles remodellering og er til stede under hele livet. Remodelleringen er viktig ved tanke på



Figur 2: Osteoklasten fester seg på beinets overflate der kalsium og fosfat løsnes fra mineralkrystallene og transportert ut i blodet. Bilde: (Sjaastad et al. 2010)

helbredelsen av brudd når de to endene av beinet har sluttet seg sammen og en stabil sone i beinet har blitt dannet. Osteoklastene er store celler som inneholder omkring 5-50 cellekjerne. Cellene blir formert på beinets overflate, (figur 2) ved en blanding av celler som er en del av kroppens celledsystem. Osteoklastene bryter ned og absorberer beinvev ved kjemisk og enzymatiske angrep, og de er koblet til beinet via proteinmolekyler i cellemembranen.

Et reaksjonskammer blir formet på et festested og osteoklastene lager et resorpsjonshulrom under cellen. Osteoklastiske membran proteiner som transporterer protoner eller H^+ -ioner ut av cellen blir satt inn i cellens membran i tilknytning til reaksjonskammeret. Frigjøringen av protoner reduserer pH i reaksjonskammeret til ca. pH 4 noe som medfører at beinkrystallene løser seg opp. Osteoklastene frigjør også enzymer som fungerer i syrlig miljø og forandrer kollagenet på overflaten av beinet hvor mineralkrystallene har løst seg opp. Mineralene, peptider og aminosyrer blir tatt opp av osteoklastene og deretter transportert ut i blodet. Kollagenet inneholder en høy andel av aminosyren hydroksyprolin som ikke kan bli gjenbrukt i kollagensyntesen og blir skilt ut gjennom nyrene. Utskillelsen av hydroksyprolin via urinen kan derfor benyttes til å overvåke hastigheten av beinresorpsjon (Sjaastad et al. 2010).

1.5. Skjelettet som et bufferlager

Kalsiumkarbonat og fosfatsaltene i skjelettet fungerer som et bufferlager for kroppen, spesielt ved en forlenget metabolsk acidose. Bein består av en matrise spredt innenfor spesialiserte celler. Matrisen består av organiske (kollagen og andre proteiner) og uorganiske (hydroksyapatitt-krystaller) komponenter. Hydroksyapatitt-krystallene utgjør to tredjedeler av det totale beinvolumet, men de er meget små og vil derfor ha et stort overflateareal. Krystallene inneholder store mengder med karbonat (CO_3^{-2}) som kan erstatte både fosfat og hydroksyl i apatitt-krystallene. Bein er det største CO_2 reservoaret i kroppen og inneholder karbonat og bikarbonat. CO_2 i bein finnes i to former: karbonat og bikarbonat (HCO_3^-). Bikarbonatet er lett utskiftbart siden det oppholder seg i beinvannet som utgjør «hydreringsskallet» rundt hver av hydroksyapatitt-krystallene. Karbonatet oppholder seg i krystallene og utløsningen av dette er avhengig av at krystallene oppløser seg. Dette er en mye tregere prosess, men mengden av buffer som er involvert er mye større. Bufferen er avhengig av to prosesser for at det skal skje: ionebytting og oppløsning av beinkrystallene (Bushinsky 1994).

Bein kan ta opp H^+ ved bytte av Ca^{++} , Na^+ og K^+ (ionebytte), eller utløsning av HCO_3^- , CO_3^{-2} eller HPO_4^{-2} . Ved en akutt metabolsk acidose så kan opptaket av H^+ av bein til bytte for Na^+ og K^+ involveres i bufferen der dette kan skje raskt uten noe nedbryting av bein. Ved kronisk metabolsk acidose så vil mesteparten av buffermekanismen slippe ut kalsiumkarbonat fra bein. De mekanismene der denne oppløsningen av beinkrystaller skjer, involverer to prosesser: direkte fysiokjemisk nedbrytning av krystaller i respons til H^+ og osteoklastisk reabsorpsjon av bein. Det antas at bein bidrar som buffer til de fleste syre-base forstyrrelsene, men det er gjort lite forsøk som kan bevise dette konkret (Bushinsky 1994). Forskningen til nå

har fokusert på den kroniske metabolske acidosen, siden det er dette som utgjør den største risikoen for beintap (osteomalasi og osteoporose). Når det gjelder varighet så er det kun to typer metabolsk acidose som er langvarig nok til å kunne assosiere med beintap, og det er *renal tubular acidosis* (RTA) og uremisk acidose. Bein er en viktig buffer for disse tilstandene (Bushinsky 1994). Metabolsk acidose er en tilstand hvor for mye syre har blitt med i kroppens væsker. Metabolsk acidose kan forekomme når kroppen produserer for mye syre eller når nyrene ikke fjerner nok syre fra kroppen. Det finnes flere typer metabolsk acidose.

- Diabetisk acidose (diabetisk ketoacidose) utvikler seg når ketonlegemer øker.
- Hyperchloremic acidose som resulterer i tap av natrium bikarbonat som skjer ved alvorlig diarrè.
- Melkesyreacidose som er en opphoping av melkesyre og kan være forårsaket av alkohol, kreft, for mye trening, leverskader, lavt blodsukker og for lite oksygen over en lengre tid. (Seifter 2011)

2. Beinhelse

Etter hvert som kroppen eldes så vil det hele tiden skilles ut kalsium fra skjelettet vårt. Når det blir fjernet mer kalsium enn det som kommer inn, vil det skje en svekkelse av skjelettet. Denne svekkelsen kalles beinskjørhet som også er kalt osteoporose (helseinformatikk 2013).

Osteoporose er en vanlig folkesykdom og er spesielt relevant i forhold til alderdom som utvikler seg over tid og som medfører at bein i kroppen blir tynne noe som videre kan medføre brudd (Cano-Marquina et al. 2014). De mest hyppige plassene det kan oppstå brudd ved osteoporose hos mennesker er femur, ryggvirvlene og underarmen, men bruddene kan også oppstå mange andre plasser i kroppen. Når utbruddene starter kan osteoporose bli diagnostisert ved beinmineralmålinger. Sykdommen kan være forårsaket av både lav beinmasse (osteoporose) samt hvor mange faktiske brudd som er forekommet (oppdaget osteoporose) (Melton et al. 1992). Det skilles mellom to årsaker til osteoporose, primær og sekundær osteoporose. Primær osteoporose er den vanligste formen som skyldes en østrogenreduksjon for kvinner i overgangsalderen. Sekundær osteoporose skyldes underliggende sykdom, bruk av medikamenter eller tilstander som påvirker kalsiumbalansen som økt syrebelastning (helseinformatikk 2013).

2.1. Hvordan syrebelastning påvirker beinstyrke

Lenge har det vært kjent at syrebelastning medfører en nedbrytning av skjelettet (Arnett 2007). Bein er sensitiv til endringer av pH og konsekvensene av dette er at reduksjonen av pH kan stimulere den osteoklastiske aktiviteten og inhibere de osteoblastiske cellene som vil medføre et tap av beinmineraler (Susan E. Brown 2000).

2.1.1. Fosforsyre

Et høyere inntak av fosforsyre som overskrider næringsbehovet for voksne mennesker antas å forstyrre den hormonelle reguleringen av fosfor, kalsium og vitamin D. Det mistenkes at inntaket av mat med fosforsyre som tilsetningsstoff bidrar til å øke forholdet mellom fosfor og kalsium. Anbefalt inntak er (1,5:1 mg:mg) og et høyere forhold kan være medvirkende til å svekke beinmasse, beinrespirasjon og øke risikoen for brudd (Calvo, Mona S. & Tucker, Katherine L. 2013).

Fosforsyre (H_3PO_4) som også kalles ortofosforsyre er en av flere syrer som inngår under fellesbegrepet fosforsyre. Fellesbetegnelsen fosforsyre kan deles opp i to rekker: monofosforsyrer og oksofosforsyrer. Ortofosforsyre er i ren tilstand et klart, krystallinsk og meget hygroskopisk fast stoff som har et smeltepunkt på ca. 42,35 C. I en vannløsning så vil fosforsyre oppføre seg som en triprotisk syre som betyr at den har tre ioniserbare hydrogenatomer. Fosforsyre er en middelsterk syre og er svakere enn svovelsyre, men sterkere enn eddiksyre. Den er ikke oksiderende og regnes ikke for å være giftig. I næringsmiddelindustrien brukes fosforsyre og saltene av fosforsyre, fosfater blant annet som surhetsregulerende middel og som hevemiddel. Det forskes mye på om det er noen helsemessige problemer som er forbundet med fosforsyre som blir brukt i næringsmiddelindustrien, og det er funnet til nå at om inntaket av kalsium er tilstrekkelig så vil det ikke fremstå som ernæringsmessig uegnet. Dersom kalsiuminntaket er lavt så vil fosforsyren lage ubalanse mellom kalsium og fosfor som kan medføre til svekkelse av beinmasse (Fjellvåg & Haraldsen 2009). En kombinasjon av store mengder fosforsyre og lite kalsium har vist seg å påvirke beinresorpsjon, svekket beinmasse og økning av beinbrudd. En dansk forskning på kvinner etter overgangsalderen observerte når forholdet mellom kalsium og fosforsyre var for lavt ville det resultere i en høyere beinfornyning og et lavere beinmineral tetthet (BMT). Ca:P inntaksforholdet ≤ 0.5 har blitt assosiert med lavere BMT og beinstyrke i både animalske og menneskelige studier (Calvo, M. S. & Tucker, K. L. 2013).

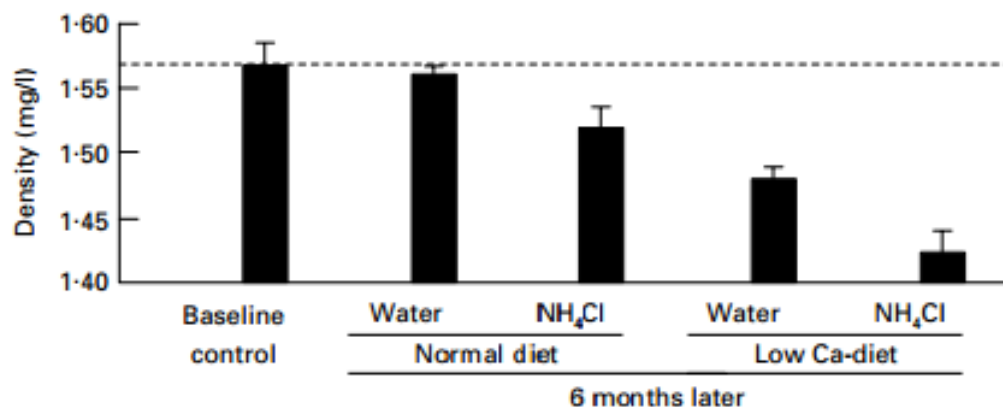
Det er i flere studier funnet at fosforsyre kan ha en negativ assosiasjon ved redusering av beintetthet (Calvo, Mona S. & Tucker, Katherine L. 2013), (Libuda et al. 2008), men en

annen studie fant derimot ingen assosiasjoner med at fosforsyre har en negativ effekt på beintetthet (Fenton et al. 2009). Studie baserte forskningen på om en økt syrebelastning av fosforsyre fører til at skjelettets bufferlager, demineraliserer (avkalkning) benet og øker kalsiumutskillelse i urinen. Det ble funnet ut at det økte inntaket av fosforsyre ikke økte kalsiumutskillelse i urinen, og ga heller ikke noen økt fare for redusering av beintetthet. Studie var en teoretisk forskningsrapport som samlet inn analyser fra flere studier og analyserte dataen statistisk (Fenton et al. 2009).

2.1.2. Ammoniumklorid

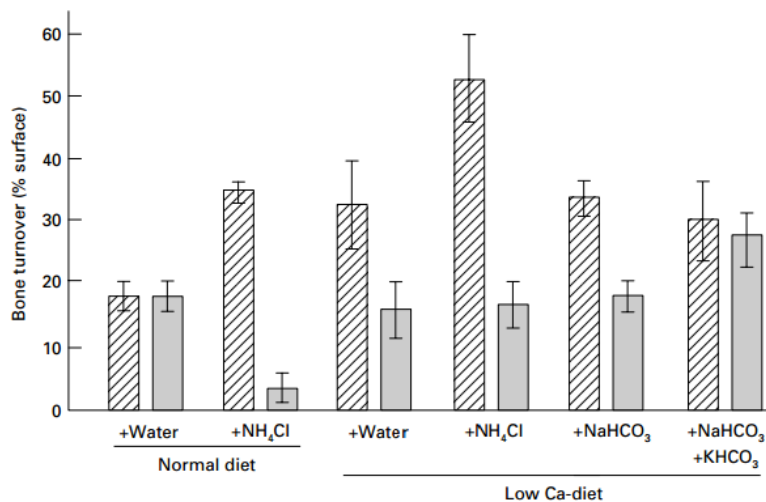
En annen syre som også kan påvirke syrebalansen i kroppen er ammoniumklorid (Hostmark et al. 2013). Ammoniumklorid har den kjemiske formelen NH_4Cl og oppstår som fargeløse krystaller, eller hvitt fint pulver som har en kjemisk saltsmak. I naturen vil den være hygroskopisk, som tilsvarer at det trekker til seg vanndamp fra omgivelsene. Det er fullt løselig i vann, men delvis løselig i alkohol (Bothara 2007). Ammoniumklorid er et surt salt av ammoniakk (NH_3) og HCl . Når dette blir løst i vann, vil en liten del av det produserte ammoniumet (NH_4^+) videre dissosiere til hydrogen-ioner og ammoniakk. Dette gjør ammoniumklorid til en svak syre (Hostmark et al. 2013). Ammoniumklorid blir ofte brukt i legemiddelindustrien og i matindustrien. I matindustrien blir den brukt i bakst som næring for gjæren, som et surhetsregulerende middel og som en smaksforsterker i saltlakris o.l. (Bothara 2007).

En rekke studier publisert fra 1880 til tidlig 1970 tallet viser at naturlig, patologisk og eksperimentelle forhold av syrebelastning, og acidose har en sammenheng både med hyperkalsemi (for høye verdier av kalsium i blodet) og en negativ kalsiumbalanse. Studier har vist seg at syre fra dietten har en effekt på beintettheten i både dyr og mennesker (figur 1) og (figur 2). I disse figurene vises det at langvarige inntak av ammoniumklorid (2 gram/l) medfører en nedgang i beintetthet, og en utvikling av osteoporose i rotter, og at



Figur 3: Langsiktig inntak av ammoniumklorid gir en reduksjon i beintettheten og utvikler osteoporose i rotter (New 2003).

kalsiumkarbonat hindrer beintap (New 2003). I tidligere forsøk med kyllinger foret med ammoniumklorid har dette medvirket til dyschondroplasi (vekstforstyrrelser i leggbeinet) (Tablante et al. 2003), (Jongbloed 1987). Tidligere forskning har også funnet at rotter som ble matet med ammoniumklorid i ett år hadde økt beinresorpsjon og redusert mengder av beinmassen ca. 15-20 %. En lik effekt ble også observert når rotter forbrukte en lav kalsiumdiett. Beinresorpsjonen økte i rotter som konsumerte ammoniumklorid uavhengig av kalsiuminnholdet i dietten. Ammoniumklorid medførte beinresorpsjon og en nedgang i den totale beinmassen (Barzel & Massey 1998).



Figur 4: Beinsomsetningens endringer i inntaket av en normal diett med vann eller ammoniumklorid, og en lav kalsium diett med vann, natriumkarbonat eller natrium bikarbonat eller natrium karbonat og kaliumkarbonat. Verdiene er et gjennomsnitt med standardfeil presentert med lodrette linjer. Inntaket av ammoniumklorid økte beinopptaket og både natriumkarbonat og kaliumkarbonat hindret tap av bein. Bilde: (New 2003).

2.1.3. Sitronsyre

90 % av kroppens innhold av sitronsyre ligger i skjelettet, og at den spiller en viktig rolle i kroppens beinmetabolisme (Dixon & Perkins 1952). Sitronsyre er en syre som blant annet er inngår i sitronsyresyklusen. Fordi sitronsyre har antioksidative egenskaper er den ofte brukt som konserveringsmiddel, surhetsregulerende middel og smakstilsetning i matvareindustrien og har e-nummer 330. Den er også brukt i kjemisk industri, farmasi og medisinsk sammenheng. Produksjon av sitronsyre skjer ved gjæring og da spesielt ved den kjente soppen *Aspergillus niger*. Den biokjemiske prosessen som *Aspergillus niger* bruker til å produsere sitronsyre har tiltrukket seg mye vitenskapelig oppmerksomhet, men det er også andre sopper som kan produsere sitronsyre gjennom biokjemiske prosesser som *Candidia lipolytica* og *Yarrowia lipolytica* (Kutyla-Olesiuk et al.), (Matportalen 2011).

En sammenheng mellom kalsium og sitronsyre ble etablert i 1926 da Pincus, Petersson og Kramer og videre forskning har vist at citratinjeksjoner på hunder gjorde kalsiumeserumet mer ultrafiltrerbart slik at det oppstod en raskere urinutskillelse av kalsium, og dette har i ettertid blitt påvist i senere forskning. (Dixon & Perkins 1952)

Nyere forskning har vist at kyllinger som ble gitt sitronsyre i ulike konsentrasjoner fikk økt beinstyrke (Islam et al. 2012). Kyllingene ble her delt opp i fire grupper der en var kontrollgruppe. Sitronsyre ble fordelt følgende: 0 %, 0,25 %, 0,75 % og 1,25 %.

Konsentrasjonen med 0,75 % viste seg å ha best effekt på beinstyrke på flest kyllinger i gruppen. Konsentrasjonen på 1,25 % hadde også god virkning men det var færre kyllinger som ble påvirket av det (Islam et al. 2012).

Sitronsyre finnes i sitrusfrukter som sitron og appelsiner, men det er også en antioksidant som kan øke metabolismen i forbrenning av fett. Det er ikke funnet noen direkte sammenheng mellom sitronsyre og vekttap, men som en antioksidant som bidrar til økt metabolsk forbrenning (Preuss et al. 2004). En studie som ble gjort der 60 deltakere som var moderat overvektige ble evaluert og fulgt igjennom åtte uker. Her ble det gjort målinger av BMI, appetitt, lipidprofiler, leptin og fett i urinen. Deltakerne ble delt opp i to grupper der den ene gruppen fikk hydroksysitronsyre (som er et derivat av sitronsyre), mens den andre fikk et placebo. Etter forsøket ble det observert at gruppen som fikk hydrokysitronsyre senket BMI med 5 – 6 %, og reduserte også nivået av kolesterol, matinntak, LDL, triglyserider og serum leptin signifikant (Preuss et al. 2004). Leptin er et hormon som produseres i fettvev og som deltar i reguleringen av kroppsvekten (Wadikar & Premavalli 2014).

2.1.4. Hvordan kroppen regulerer syrebelastning

Det er flere måter kroppen kan kvitte seg med overskudd av syre. Et av de viktigste organene kroppen har som bidrar til syrebalanse er nyrene. Nyrene er hovedsakelig et filtersystem for blodet i kroppen som fjerner avfallsstoffer som blir produsert av ulike metabolske prosesser, som for eksempel urin, urinsyre og kreatin. Urin kan også inneholde stoffer som sulfat, fenoler, natrium, kalsium og klor-ioner. Nyrene hjelper til med å vedlikeholde homeostasen ved å regulere konsentrasjonen og volumet av kroppsvæsker. For eksempel mengden H^+ og HCO_3^- blir skilt og kontrollerer kroppens pH (Sjaastad et al. 2010).

Et annet organ som bidrar til å regulere syreinnholdet i kroppen er lungene. Lungene er laget av elastisk vev som strekker seg når man puster. Luftveiene som bringer luft inn til lungene er laget av en glatt muskelbrusk som bidrar til at lungene kan utvide og trekke seg sammen.

Lungene bringer inn oksygenrik luft men samtidig kvitter seg med CO₂ som blir laget av celler. Lungene hjelper også til med å regulere konsentrasjonen av H⁺ ioner i blodet (Sjaastad et al. 2010).

2.2. Økt syrebelastning ved kostholdet

Kostholdet til den vestlige delen av verden bærer i dag stor preg av større mengder med prosessert mat og proteinrike dietter (Calvo, M. S. & Tucker, K. L. 2013). Det er tidligere gjort studier der det ble vist at brusholdige drikkevarer (både brus med og uten koffein) hadde en negativ effekt på bein角度 på barn med lavt inntak av melk. Det ble funnet ut at inntaket av sukkerholdige drikkevarer hadde en negativ effekt på beinstyrke, men at dette var negativt assosiert med det totale proteininntaket, og ikke at det ble byttet ut med melk (Libuda et al. 2008).

Bruskonsumet i den vestlige verden har økt betraktelig, men det har blitt forsket relativt lite på forholdet mellom bein角度 og inntaket av brusholdige drikkevarer. Derfor ble det gjort et forsøk for Oslo helsestudie som omhandlet økningen av brusinntak med lite inntak av frukt i forhold til bein角度. Sukkerholdige drikkevarer kan gi økt syrebelastning på bakgrunn av karbonsyre, sitronsyre og fosforsyre i coladrikker. Den økte syrebelastningen har blitt studert på i flere tilfeller, og det kan være en assosiasjon mellom den økte syrebelastningen og økt kalsiumutskillelse i urinen (Hostmark et al. 2011). En annen studie viste til et forsøk der det ble brukt cola som drikke på rotter (Ogur et al. 2007) dert ble påvist at rottene fikk en signifikant svekkelse av benmineraltetthet. Det ble også vist at rottene konsumerte drikke 1,6-1,9 ganger mer enn kontrollgruppen som fikk vann uten høyere fôrintak (Ogur et al. 2007).

Det er også foreslått om det ikke bare er fosforsyre i cola som kan gi økt risiko for redusert bein角度, men også koffein (Rapuri et al. 2001). Dette ble foreslått på bakgrunn av at koffeinen øker kalsiumutskillelsen og fører til beintap. I en nyere epidemiologisk studie ble det funnet at koffein ikke kan forklare en reduksjon i bentettheten hos kvinner som konsumerer cola drikker. Dette fordi koffeinholdige og koffeinfri cola drikker har vist seg å ha samme grad av bein角度styrrelser (Teofilo et al. 2010).

Det er kjent at dietter fra forskjellige typer mat har en innvirkning på syre-basebalansen. For voksne er følgende faktorer involvert:

1. Den kjemiske sammensetningen av maten eksempel mengde protein, klorid, fosfor, natrium, kalium, kalsium og magnesium.

2. Det ulike opptaket av det relevante næringsmidlet.
3. Den metabolske genereringen av sulfat fra svovelholdige aminosyrer.
4. Graden av dissosiert fosfor ved den fysiologiske pH ved 7,4.
5. Den ioniske valensen av kalsium og magnesium.

PRAL (potential renal acid load) som er en formel som avgjør hvor syrlig eller basisk mat er, blir beregnet for en 24-timers periode sammen med en konstant mengde av urinutskillelse av organiske syrer (Remer 2000). PRAL kan beregnes ut ifra følgende formel:

$$PRAL = (X)mengde \text{ protein } \left(\frac{g}{d}\right) + (X)mengde \text{ fosfor } \left(\frac{mg}{d}\right) - (X)mengde \text{ kalium } \left(\frac{mg}{d}\right) \text{ (Alexy et al. 2005)}$$

2.2.1. Andre risikovirkninger ved inntak av sukkerholdige drikkevarer

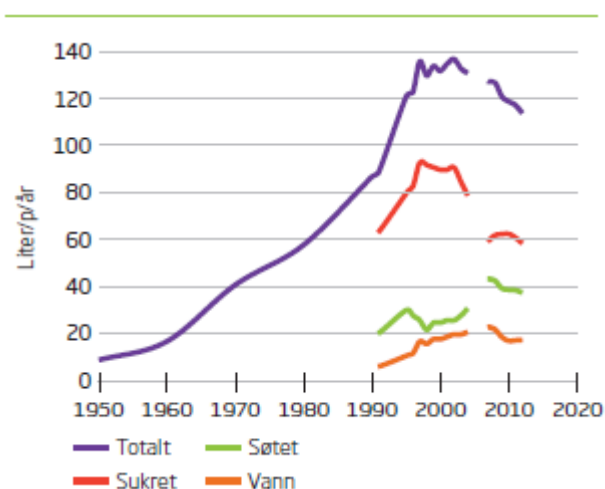
En nylig studie ble gjort i Sverige, ved Karolinska instituttet i Stockholm om inntak av søte drikkevarer økte risikoen for hjerneslag (Larsson et al. 2014). Her ble nesten 70,000 deltakere fra alderen 45 til 83 år (menn og kvinner) fulgt opp i et tiår om deres inntak av sukkerholdige drikkevarer i forhold til utvikling av hjerneslag. Under testperioden ble deltakerne fulgt opp med spørsmålsrunder angående mengde og hva slags type drikkevarer de konsumerte. Både drikkevarer med sukker og kunstig sukker ble tatt med i studie. Eventuelle tilfeller av slag i løpet av studieperioden ble klassifisert som ett av følgende: intracerebral blødning, subaraknoidalblødning eller uspesifisert hjerneslag. Analysene av data som ble samlet inn viste en økning av risiko på 19 % og 22 % på total slag og hjerneslag respektivt, når det ble sammenlignet med de som konsumerte ≥ 2 serveringer av sukkerholdige drikkevarer mot de som konsumerte 0,1-0,5 serveringer per dag. Tidligere har det blitt funnet sammenhenger mellom sukkerholdige drikkevarer mot økning av glukose og insulin i blodet som har videre blitt satt i sammenheng mellom vektøkning og type-2 diabetes, og begge er godt kjent som en risikofaktor for hemoragisk hjerneslag (Larsson et al. 2014).

2.3. Bruskonsum i Norge

Brus og godterier har vært de største sukkerkildene i kostholdet og omsetningen av brus med sukker økte mye fra 1970-årene til det toppet seg i 1997 (tabell 1). Omsetningen av brus har minsket de siste årene og tallet var 59 liter per innbygger i 2012 noe som fortsatt er et høyt brusforbruk. Dette kan være en tankevekker da det er stor sannsynlighet for at det høye inntaket av sukkerholdige drikker kan øke risikoen for overvekt. Salget av brus og mineralvann er mer enn tidoblet siden 1950-årene. Forbruket av sukkerholdig brus ser ut til å ha vært på sitt høyeste i 1997 med 93 liter per innbygger (Helsedirektoratet 2013).

Tabell 1: Tabellen viser bruskonsum med brus tilsatt sukker og brus tilsatt kunstig sukker/søtningsstoff fra 1991 til 2012 (Helsedirektoratet 2013).

	1950	1970	1980	1990	1991	1995	2000	2004	2007	2009	2010	2011	2012
Totalt (l/innb/år)	9	41	58	87	89	121	132	131	127	121	119	117	114
- Brus tilsatt sukker					63	80	90	79	60	63	63	61	59
- Brus tilsatt kunstig søtstoff					20	30	25	31	44	40	39	39	38
- Vann på flaske					6	11	18	21	24	19	17	18	18



Figur 5: Figuren viser salget av mineralvann i liter per person per år (Helsedirektoratet 2013).

I resten av verden er USA og Mexico er de to øverste landene i forhold til konsum av cola og brusholdig drikke. Konsum av cola har vist en økende trend siden 1960-tallet i begge landene og overgår andre drikkevarer som vann, melk, øl og kaffe. I forhold til dette store antallet personer som blir eksponert for denne trenden kan helserisikoen forbundet med konsum av cola ha betydelig offentlige helsekonsekvenser (García-Contreras et al. 2000).

3. Utstyr og metode

3.1. Kjemikalier

- Sitronsyre (Citric acid monohydrat), molekylvekt (mw) 210. Produsent: Merck, 64271 Domstadt, Tyskland.
- Fosforsyre H₃PO₄ (Ortho-phosphoracid 85 %), tetthet: 1 liter = 1,75 liter.
- Ammoniumklorid NH₄Cl, mw 53,5. Produsent: Merck, 64271 Domstadt, Tyskland

(Datablad for kjemikaliene ligger vedlagt i vedlegg 1, 2 og 3.)

3.2. Fôr

Kommersielt kyllingfôr (startfôr Fjør Oppdrett kraft, Felleskjøpet)

3.3. Analytisk innhold:

Råprotein	23,0 %
Trevler	3,3 %
Råfett	6,9 %
Råaske	5,1 %
Selen	0,40 mg/kg
Kalsium	0,75 %
Fosfor	0,56 %
Natrium	0,17 %
Lysin	1,23 %
Methionin	0,54 %

3.4. Ingredienser

Hvete, Soya ekstrahert, Havre, Mais, Maisgluten, Fiskemel, Vegetabilsk fett, Kalksteinmel, Monokalsiumfosfat, Aminosyrepremiks, Natriumkarbonat, Vitaminprefiks og salt

3.5. Tilsetningsstoffer (per kg)

Vitaminer:

E672 vitamin A 9000 ie, E671 vitamin D3 4900 ie, vitamin E 120 mg

Mikromineraler:

E1 jern som jern(II)fumarat 53 mg, E2 Jod som kalsiumjodat 1,1 mg, E4 kopper som kopper(II)sulfat 15 mg, E5 Mangan som mangansulfat 128 mg, E6 sink som sinksulfat 83 mg, E8 Selen som natriumselenitt 0,26 mg

Enzymer:

4a1640 6-fytase Ec 3.1.3.26 500 FTV, E1602 Endo-1,4 –betaglukanase EC 3.2.1.4 1040 U, E1602 Endo-1,4 –betaxylanase EC 3.2.1.8 3380 U

3.6. Laboratorieutstyr

Tinius Olsen H5KT – maskin for knekktesting

WIFUG Labor L sentrifuge for blodserum

4. Metode og utførelse

Oppgaven ble delt opp i to deler. Den ene er en ren teoretisk del som omhandler å samle inn forskningsrapporter fra andre studier som er gjort innen feltet syrebelastning og benhelse. Den andre delen var en praktisk oppgave som var et forsøk på kyllinger der dyrene fikk ulike konsentrasjon av syre/base. Metodedelen vil da bli delt i to, en som omhandler arbeidet rundt den teoretiske dele og en som handler om den praktiske delen.

4.1. Del I – Teoretisk arbeid av oppgaven

Før arbeidet for den teoretiske delen kunne starte ble det listet opp hvordan søkemotorer som skulle blir brukt og hva slags nøkkelord som ble brukt for å finne relevante studier som omhandlet benhelse og syrebelastning.

Søkemotorer

For at kildene skulle være sikre ble det brukt følgende søkemotorer:

- [Sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
- ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- [hindawi.com](https://www.hindawi.com)
- [journalofanimalscience.org](https://www.journalofanimalscience.org)
- [ps.oxfordjournals.org](https://www.ps.oxfordjournals.org)
- Biblioteket

I de nevnte søkemotorer ble det brukt emneord som var relevante for oppgaven:

- Acid load
- Bone density
- Bone health
- Phosphoric acid
- Citric acid
- Ammonium chloride
- Bone mineral density
- Dietary acid load
- Bone dietary density
- Organic and inorganic acids and bone dietary in chicken

Det ble også brukt ulike kombinasjoner av søkeordene for å finne de mest relevante artiklene med færre treff.

4.2. Del II – Praktisk utførelse av oppgaven

4.3. Tillaging av drikkevann

Tillagingen av drikkevannet til de 4 gruppene med kylling ble laget dagen før mottak. 4 nummererte femliters plastikkbøtter ble brukt for å skille de ulike vannløsningene som gruppene ble tildelt (tabell 2, 3, 4 og 5). Konsentrasjonen i hver av vannløsningene ble tillaget i en svak løsning de første dagene slik at kyllingene tilvente seg vannet. Bøttene ble nummerert fra 1 – 4 og hadde følgende kjemikalier veiet inn:

Tabell 2: Vannløsning for gruppene, dag 1 - 4.

F – 369	Konsentrasjon Mmol/L	mw	Veid ut til 1 liter	Veid ut til 3 liter	Veid ut til 10 liter
Vann	-	-	-	-	-
Sitronsyre	20	210	4,2 g	12,6 g	42,0 g
Fosforsyre	2,7	98	0,1 ml	0,1 ml	0,33 ml
Ammoniumklorid	20	53,5	1,07 g	3,2 g	10,7 g

Tabell 3: Vannløsning for gruppene, dag 4 - 5.

F – 369	Konsentrasjon Mmol/L	mw	Veid ut til 1 liter	Veid ut til 10 liter
Vann	-	-	-	-
Sitronsyre	100	210	21 g	210 g
Fosforsyre	13	98	0,17 ml	1,7 ml
Ammoniumklorid	100	53,5	5,3 g	53 g

Vannløsningen ble økt fra dag 4 og 5 (tabell 3). Dette ble bestemt da kyllingene ikke viste tegn til nedsatt inntak av vann og fôr.

Tabell 4: Vannløsning for gruppene, dag 5 - 6.

F – 369	Konsentrasjon Mmol/L	mw	Veid ut til 1 liter	Veid ut til 3 liter	Veid ut til 10 liter
Vann	-	-	-	-	-
Sitronsyre	100	210	21 g	63 g	210 g
Fosforsyre	13	98	0,17 ml	-	1,7 ml
Ammoniumklorid	50	53,5	2,6 g	-	26,6 g

Den samme konsentrasjonen for løsningene ble beholdt fra dag 5 til dag 6 (tabell 4). Ingen av kyllingene viser tegn til nedsatt inntak av fôr eller vann.

Tabell 5: Vannløsning for gruppene, dag 6.

F – 369	Konsentrasjon Mmol/L	mw	Veid ut til 1 liter	Veid ut til 5 liter	Veid ut til 10 liter
Vann	-	-	-	-	-
Sitronsyre	25	210	5,3 g	26,5 g	53 g
Fosforsyre	13	98	0,17 ml	-	1,7 ml
Ammonium-klorid	25	53,5	2,6 g	-	26,6 g

Konsentrasjonen til sitronsyre ble senket på dag 6 (tabell 5). Kyllingene som fikk sitronsyre viste tegn til nedsatt trivsel, så det ble bestemt at løsningens konsentrasjon måtte senkes.

Denne løsningen ble beholdt utover resten av forsøket.

4.4. Mottak av kyllingene



Figur 6: 100 nyklekte kyllinger ankom kyllinghuset fordelt i fire esker. Ved ankomst var alt på forhånd klargjort slik at dyrene opplevde overgangen på en minst mulig stressende måte. Foto: Privat

100 kyllinger (figur 7) av typen nyklekte Broiler Ross 308 (hanner) ble bestilt fra Samvirkerkylling, Nortura SA som holder til i Våler i Solør. Før kyllingene ankom kyllinghuset var det særdeles viktig at mottaket var forhåndsplanlagt og organisert slik at kyllingene ikke ble stresspåvirket. Dette ble organisert dagen før ankomst, og igjen timene før ankomst slik at ingen misforståelser skulle oppstås. Batteribur ble anordnet gruppevis og nummerert, fôr og vannløsning ble veiet opp og klargjort i traue og rommet var oppvarmet til riktig temperatur (se temperatur) var ordnet før kyllingene ble tatt i mot.

Kyllingene ble fordelt i 4 grupper, veiet gruppevis og plassert i batteribur (figur 8). Gruppe 2 – 4 med 22 dyr, mens kontrollgruppen som fikk vann (gruppe 1) hadde 34. Fôr- og drikke-traue ble plassert rundt alle burene og det ble kontrollert at dyrene begynte å spise og drikke før de fikk ro.



Figur 7: Batteriburene var merket gruppevis og klargjort før kyllingene ble satt inn. Foto: Privat

4.5. Fôring

De første elleve dagene skulle kyllingene stå gruppert i bur, og de ble da også fôret gruppevis i fôr-traue. Mengden fôr som ble spist ble skrevet ned og så etterfylt. Fôret var standard kraftfôr som blir brukt til de fleste oppdrettskyllinger.

4.6. Temperatur og lysprogram

Det ble brukt standard temperaturprogram for slakterkylling. 32 °C de tre første dagene, og deretter ble temperaturen senket med 0,5 °C hver dag til 21 °C som ble holdt ut forsøket.

Lysprogrammet var automatisk og fra dag 1 -7 fikk kyllingene 23 timer lys og 1 timer mørke. Deretter to firetimers mørkeperioder fra kl. 00:00 – 04:00 og 17:00 – 21:00.

4.7. Videre gjennomføring av prosjektperioden

Fra dag 1 til 11 skulle kyllingene stå gruppevis i bur. Det ble sørget for at de hadde kontinuerlig vann og fôr, og forbruket ble målt om morgenen og om ettermiddagen.



Figur 8: Kyllingene skulle etter dag 11 flyttes fra fellesburet til enkeltbur. Her ble forinntaket veiet og fulgt opp for hver enkelt kylling.

Dag 11 så skulle dyrene bli plassert i enkeltbur. 17 kyllinger fra hver gruppe, og 32 fra vanngruppen skulle velges ut til å bli tatt med videre i forsøket. Hvem av kyllingene som ble med videre ble bestemt etter vekt. De kyllingene som vek fra den gjennomsnittlige vekten pr. gruppe ble ekskludert fra videre forsøk. Vekten på kyllingene som ble med videre i forsøket ble veiet og dyrene ble plassert i enkeltbur (tabell 6). Disse burene var på forhånd klargjort med fôr- og vanddispenser og sagflis under

for å ta opp strø. Gruppene fikk fortsette med vannløsningen her og inntaket ble daglig målt og evt. fylt på. Fôrkassene var to melkekartonger som var spleiset sammen til en L-form. En kylling fra gruppe 2 og 4 døde under forsøket og ble strøket fra listen.

Tabell 6: Buranordning fra dag 11 til dag 25. Anordningen ble ordnet gruppevis. Gruppe 1= vann, gruppe 2=sitronsyre, gruppe 3 =fosfor og gruppe 4 = ammoniumklorid.

Gruppe1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Gruppe2	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
Gruppe3	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
Gruppe4	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	

Dag 18 så skulle dyrene veies igjen og det skulle bestemmes strøpoeng etter utseende på strøet, der det ble brukt en poengskala fra 1 – 5, der 1 var bra strø og 5 var dårlig strø/mye klin. Fôret ble også veiet og evt. etterfylt om det var lite igjen.

Dag 25 ble forsøket avsluttet og dyrene avlivet. Dette var en dag som skulle bli lang og mye skulle gjøres og holdes styr på. Derfor ble det dagen før lagt opp en plan på hvordan den siste dagen skulle gjennomføres. Det var viktig at dyrene av samme gruppe ikke ble avlivet etter hverandre, så det ble lagt opp en strategi over hvilken rekkefølge dette skulle foregå.

Strategien ble gjort slik at ett dyr fra hver gruppe ble tatt ut av enkeltburet, merket rundt beinet og lagt i en oppbevaringsbeholder med et lokk over. Lokket ble ikke festet, men hvilte over beholderen. Da alle i første pulje var avlivet så ble det tatt blodprøve og sendt videre til åpning der høyre bryst, begge lårene og lever ble tatt ut. Det ble også tatt en mRNA prøve av brystpartiet og det ble gjort visuelle observasjoner av tarmen og buk fett.

4.8. Avlivning

Avlivningen ble gjort av avdelingsingeniør Frank Sundby som har fagområde innen veterinærmedisin. Avlivningen ble gjennomført på følgende måte: En gruppe på fire dyr (en fra hver gruppe) ble fraktet ut fra enkeltburene, merket rundt beinet og lagt i 4 separerte bølter med et lokk liggende over med nok tilgang til luft. Lokket ble satt på for å hindre kyllingene i å få med seg avlivningen slik at det ikke ble stresset. Dyret som ble tatt ut for avlivning ble først svimeslått ved slag mot hodet. I dette forsøket ble hodet slått mot en bordkant.



Figur 9: Når kyllingen var svimeslått så ble den hengt etter beinene der hovedpulsåren ble skåret over av godkjent personell. Foto: Privat

Når dyret var svimeslått ble det hengt med beina i en festeanordning (figur 10). Hovedpulsåren ble så skåret over, og et reagensrør ble fylt opp med blod for blodprøver som skulle analyseres senere. Når dyret var utblødd ble det fraktet videre inn til dissekering som befant seg i et separat rom. Så kunne neste dyr avlives.

Prosessten var rask og effektiv, men måtte gjøres på en profesjonell og etisk riktig måte slik at dyrene ikke skulle lide.

4.9. Dissekering

Dissekeringen ble gjort av veileder Anna Haug med masterstudentene. Det ble gjort en grundig opplæring på hvordan kyllingene skulle åpnes og hvordan de ulike delene skulle tas ut. Denne opplæringen ble gjort av Frank Sundby og Anna Haug.

Det ble først snittet en åpning i skinnet ved enden av buken slik at skinnet kunne dras opp og brystpartiet ble synliggjort. Det ble skåret ut en liten prøve fra brystpartiet som var til mRNA-prøven. Så kunne høyre bryst fjernes, og det ble skåret ut i et helt stykke. Lårene ble skåret av ved hofteleddet og skinnet av lårpartiene kunne dras ned og skjæres av. Føttene ble skåret av ved kneleddet. Så kunne buken åpnes ved å ta tak under brystbeinet og dra opp. På denne måten ble leveren eksponert og kunne fjernes og veies. Til slutt ble tarmen og buk fett bedømt og fotografert. Høyre bryst, begge lårpartiene og leveren ble tatt vare på for videre analyse i forsøket og ble lagt i merket pose med hva slags del det var, kyllingnummer og forsøksnummer. Disse merkede posene ble på forhånd organisert etter rekkefølgen på avlivningen slik at det ble raskt og effektivt samtidig som at muligheten for feil ikke skulle oppstå.

Etter dissekering så ble posene med de ulike delene av kyllingene fryst ned i normal frysetemperatur ved ca. -18 °C.

4.10. Analysering av blodprøver

Blodprøvene som ble tatt ved avlivningen ble analysert av Først Medisinske Laboratorium som er et privat laboratorium innen fagområdene medisinsk biokjemi, klinisk farmakologi, mikrobiologi og patologi. Laboratoriet er Norges største med ca. 350 ansatte og ligger på Furuset i Oslo. (Først 2014)

For å gjøre prosessen raskere så ble det på forhånd laget blodserum fra prøvene. Prøvene ble sentrifugert med en hastighet på 3000 rpm som tilsvarer 1006 g, i reagensrør slik at blodcellene skiller seg fra blodserumet. Dette serumet ble så pipettert ut og overført til eppendorfrør. Disse rørene ble tilsendt fra Først, med merkelapper som var nummererte og strekkodemerket. Numrene som hver av kyllingene hadde fra de ble plassert i enkeltbur ble samkjørt med de nye numrene fra Først. På denne måten ble det ingen forvekslinger når prøvene ble overført til nye rør, og det ble en organisert måte å sette resultatene opp mot den enkelte kylling.

4.11. Knekktest

Det siste som ble gjort i den praktiske delen av oppgaven var å utføre en knekktest for å måle beinstyrken hos kyllingene.

Det ble bestemt at den øvre delen av venstre lårbein, femur, skulle bli analysert med en knekktest. Apparatet som ble brukt var en Tinnius Olsen H5KT som befant seg ved IHA. Lårene ble tatt ut av fryserommet for tining dagen før forsøket. Denne dagen ble også brukt til å lære seg dataprogrammet som styrte apparatet, og for å ta en test av lårbein. Etter at testen var tilfredsstillende kunne forsøksdagen planlegges. Det ble bestemt at alle prøvene skulle gjøres på en dag, og at prøvenumrene skulle være randomisert slik at resultatene ikke ble preget av forhåndsdømming.

Prosessen for knekktesting startet først med å skjære ut øvre lårbein (femur) fra venstre lår. Dette ble gjort ved å skjære inn mot leddet mellom femur og nedre del av leggen (tibia). Etter at tibia og femur er separert så ble kjøttet rundt femur skåret bort slik at kun beinet ble igjen. Beinet ble plassert i apparatet som knekker den.



Figur 10: Knekktesten ble gjort med et apparat som satt trykk på benet med en plate. Trykket ble målt helt til benet knakk. (bilde: Privat)

To kobberspalter ble lagt under en skive som blir automatisk ført ned med en hastighet på 10 mm/s (figur 10). Beinet som skal testes legges over spaltene slik at platen treffer midt på beinet. Når knekkskiven gikk ned mot midten av lårbeinet så ble det skapt et spenn på lårbeinet på grunn av spaltene, og beinet

knakk under et visst trykk. Apparatet som ble brukt hadde et maks trykk på 250 N, noe som var

tilstrekkelig for de fleste beinene. Noen av beinene

knakk ikke, og disse ble notert ned med kommentar. Etter at knekktesten var gjennomført så ble all data ført opp og statistisk beregnet.

4.12. Statistiske analyser

All data som er jobbet med er samlet opp med kun gjennomsnitt og standardfeil for de ulike gruppene som var med i forsøket, samt de signifikante forskjellene.

Standardfeilen (SE) ble utført ved å dele standardavviket (s) med roten av utvalget (n):

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Å finne standardavviket ble gjort med både Excel og Minitab for å kontrollere at dataene stemte overens.

Det ble brukt to-veis ANOVA-analyse (general linear model) som ble utført i Minitab 17 med de data som ble samlet inn igjennom hele forsøket. Det er kun gruppene som hadde signifikant forskjellige responser som blir arbeidet med videre i resultatet. Resterende av data som ikke var signifikant forskjellige ligger under vedlegg 5. Gruppene ble testet mot hverandre for å finne hva slags responser som skapte ulikhetene. Analysen ble satt opp med følgende hypotese:

H_0 : Det er ingen signifikant forskjell mellom gruppene.

H_A : Det er en signifikant forskjell mellom gruppene.

For at H_0 skal bli forkastet så må $H_A = p\text{-verdi} < 0,05$.

Det ble også utført statistisk analyse med Bonferroni korreksjon. Minitab og Bonferroni ga noe ulike resultater så det ble bestemt at de resultatene som signifikante fra både Minitab og Bonferroni ble tatt med videre. Komplette tabell over alle signifikante verdier ligger i vedlegg 5.

5. Resultater

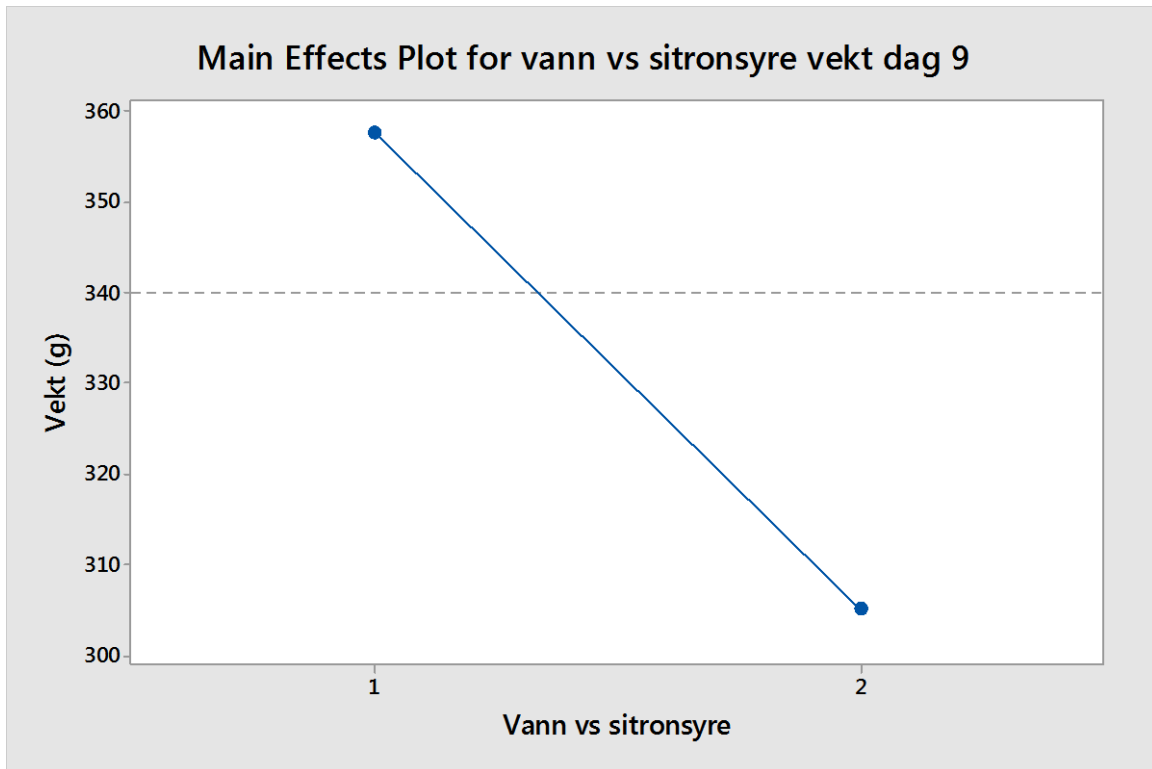
Vann mot sitronsyre

Data for gruppene som fikk vann og sitronsyre ble satt opp mot hverandre i ANOVA. De signifikante verdiene, som er i tabell 7, viser data for total gjennomsnitt (gjsn.) for gruppene, antall deltakere i gruppen (n) og standardfeil (SE). Det er kun responsene som er signifikante som er gjengitt med p-verdi. Et main effect plot ble laget for responsene som var signifikante og finnes i figur 11, 12 og 13.

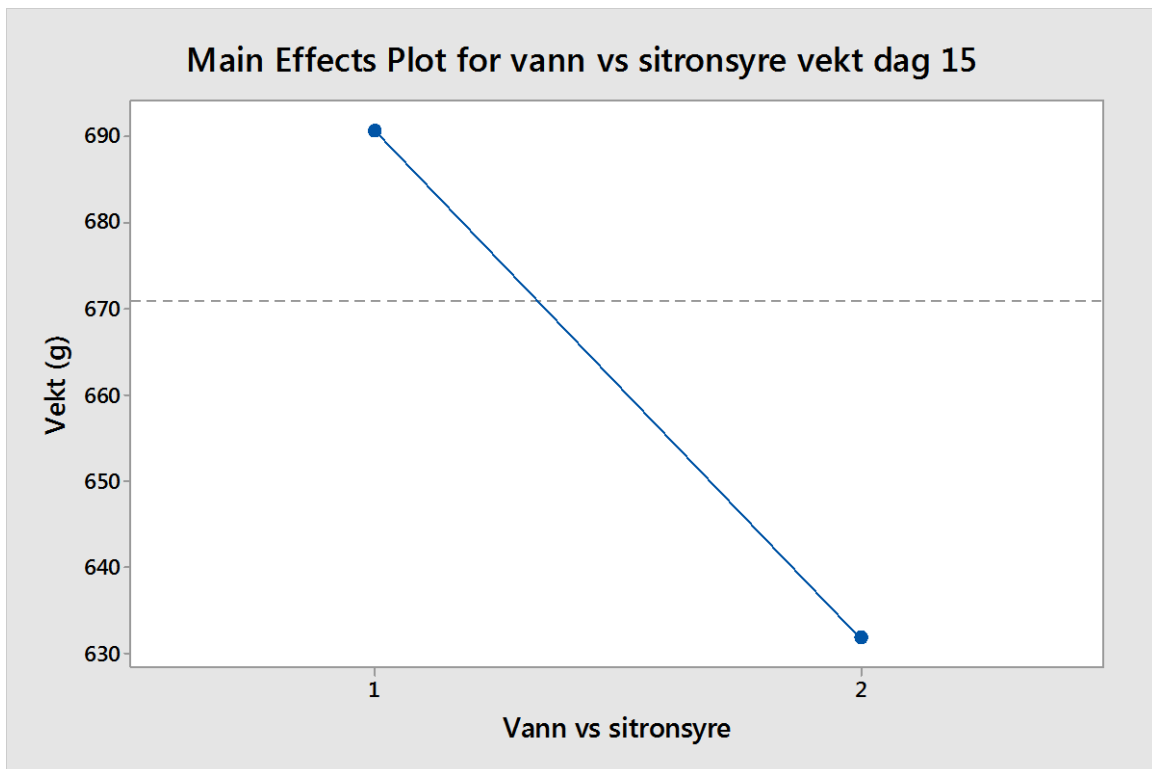
Tabell 7: Responsene som var signifikant forskjellig ($p < 0,05$) mellom vann og sitronsyre var vekt ved alle tre målingene. Vann har gjennomsnittlig (gjsn) høyere vekt og mindre standardfeil (SE). n=antall deltakere i gruppen.

Responser	Vann n=32		Sitronsyre n=16		p-verdi
	gjsn	SE	gjsn	SE	
Vekt dag 9	358	4,36	305	13,55	0,000
Vekt dag 15	691	9,21	632	20,54	0,004
Vekt dag 25	1364	26,33	1239	33,01	0,007

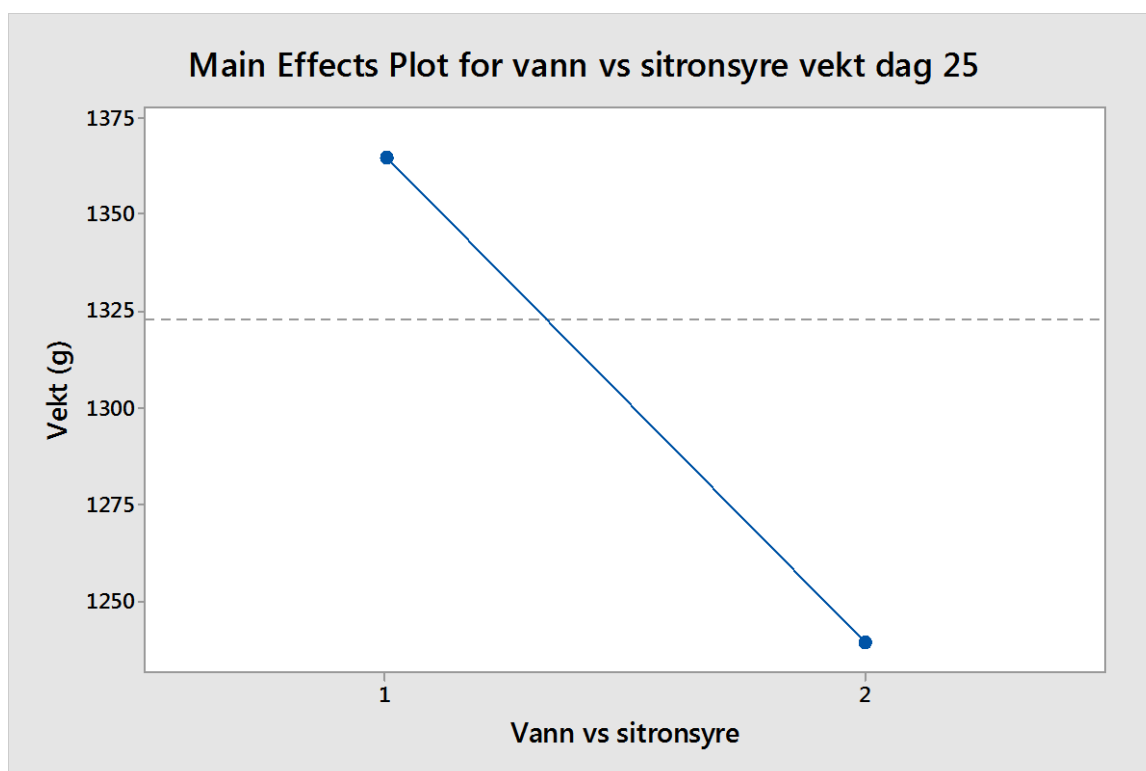
I analysen mellom vann og sitronsyre ble det funnet at det var vekten som var den signifikante forskjellen. Gruppen som fikk vann ble påvist større vekt ved tre målinger. ANOVA-analysen viser også at gruppen som fikk vann har mindre standardfeil enn gruppen som fikk sitronsyre. Noe som tilsier at feilmarginen er større i gruppa som fikk sitronsyre.



Figur 11: Main Effect Plotet viser ulikheten mellom vann- (1) og sitronsyregruppen (2) for målingen av vekt (oppgett i gram) ved dag 9.



Figur 12: Main Effect Plotet for vann-(1) mot sitronsyregruppen (2) for måling av vekt (oppgett i gram) for dag 15.



Figur 13: Main Effect Plotet for vann-(1) mot sitronsyregruppen (2) for måling av vekt (oppgett i gram) for dag 25.

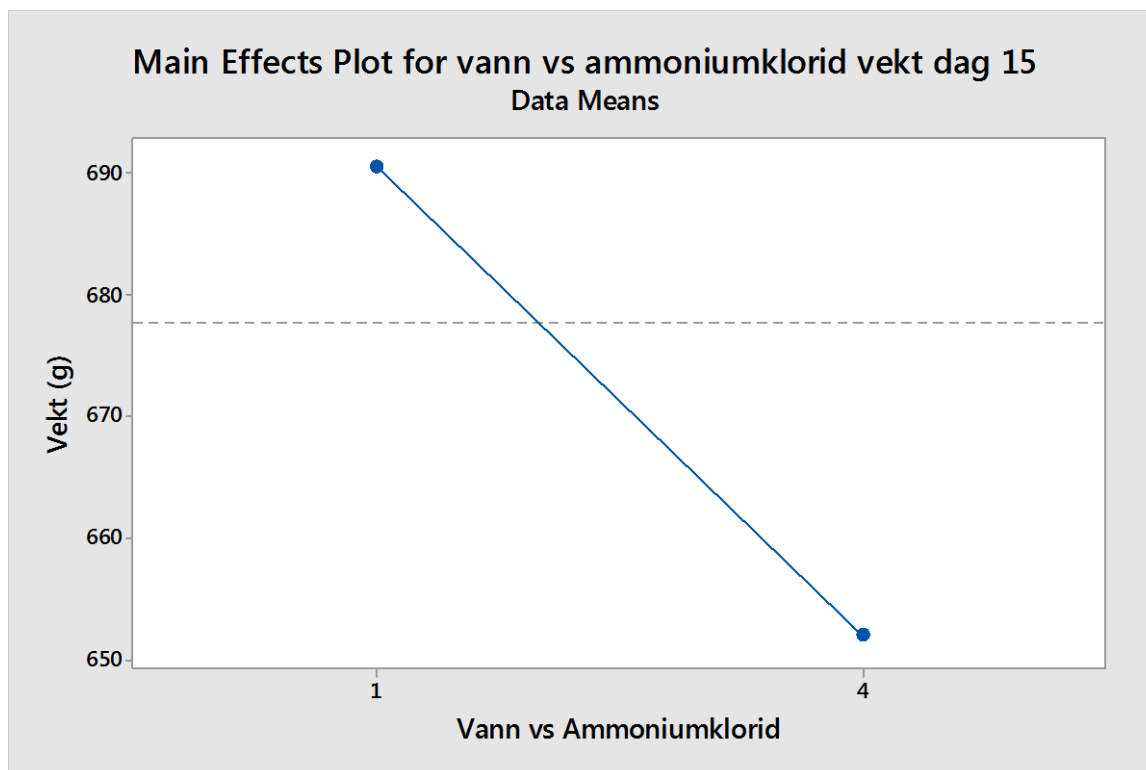
Vann mot ammoniumklorid

Data for vann og ammoniumklorid ble plotet inn i ANOVA og resultatene som var signifikant forskjellige ble ført inn i tabell 8. Et main effect plot for de signifikante responsene ble laget i Minitab og finnes i figur 14, 15 og 16.

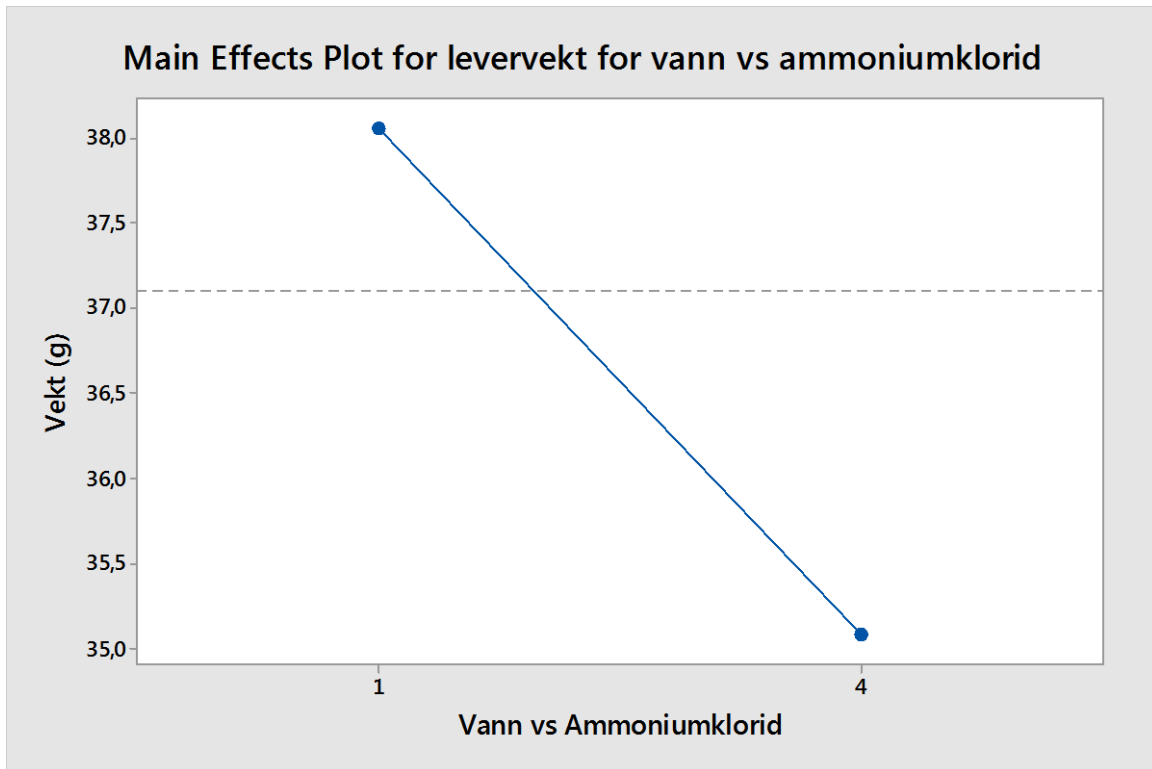
Tabell 8: Responsene som var signifikante ($p < 0,05$) var vekt dag 15 og levervekt. Knekktesten ligger i grenseland og er markert med gul farge. Gjennomsnittet (gjsn), standardfeilen (SE) og deltakere (n) er gjengitt.

Responser	Vann n=32		Ammoniumklorid n=16		p-verdi
	gjsn	SE	gjsn	SE	
Vekt dag 15	691	9,21	652	14,67	0,025
Levervekt	38,05	0,94	35,08	0,72	0,049
Knekktest	217	6,63	193	9,65	0,051

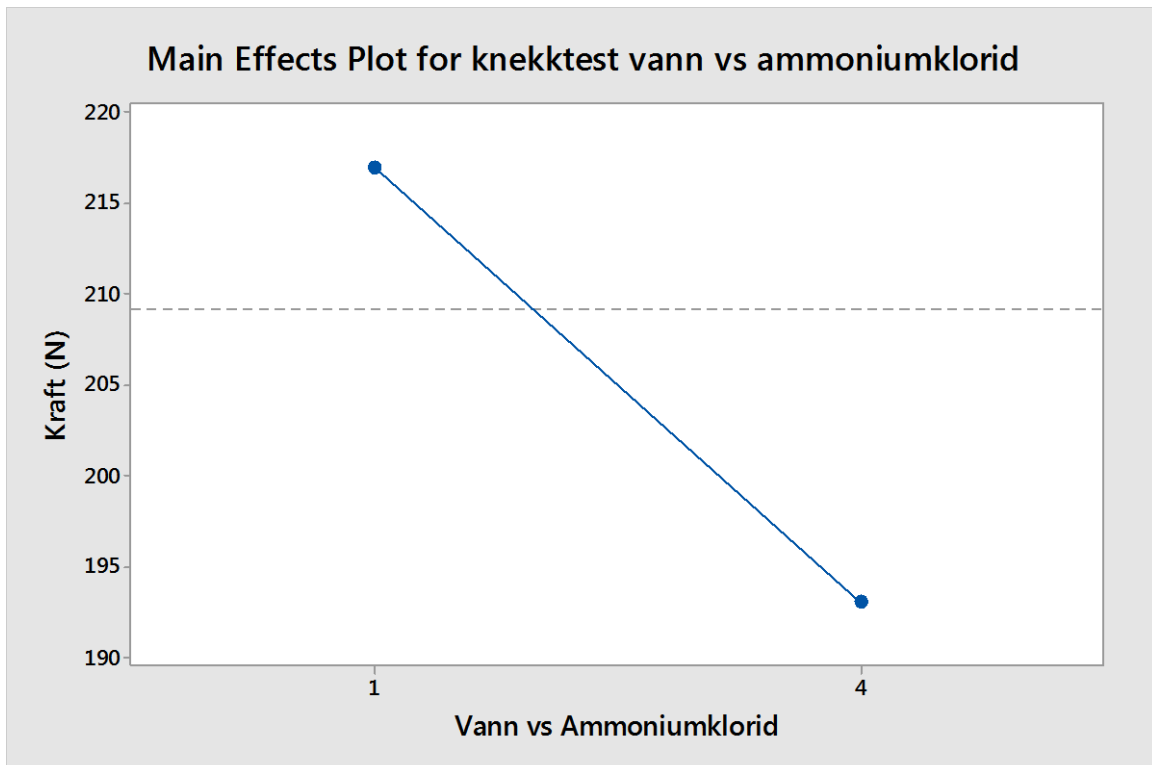
Tabellen viser at gruppen som fikk vann er en signifikant forskjell på responsene vekt dag 15 og levervekt. Knekktesten ligger i grenseland og blir markert gult da den ligger nærme, men er over den fastsatte grensen for p-verdien.



Figur 14: Main Effect Plotet for vann-(1) mot ammoniumkloridgruppen (4) for måling av vekt (oppgett i gram) for dag 15.



Figur 15: Main Effect Plot for vann-(1) mot ammoniumkloridgruppen (4) for måling av levervekt (oppgitt i gram).



Figur 16: Main Effect Plot for vann-(1) mot ammoniumkloridgruppen for måling av knekktest. Dette resultatet var over $p < 0,05$, men ble tatt med da det var i grenseland.

Sitronsyre mot fosforsyre

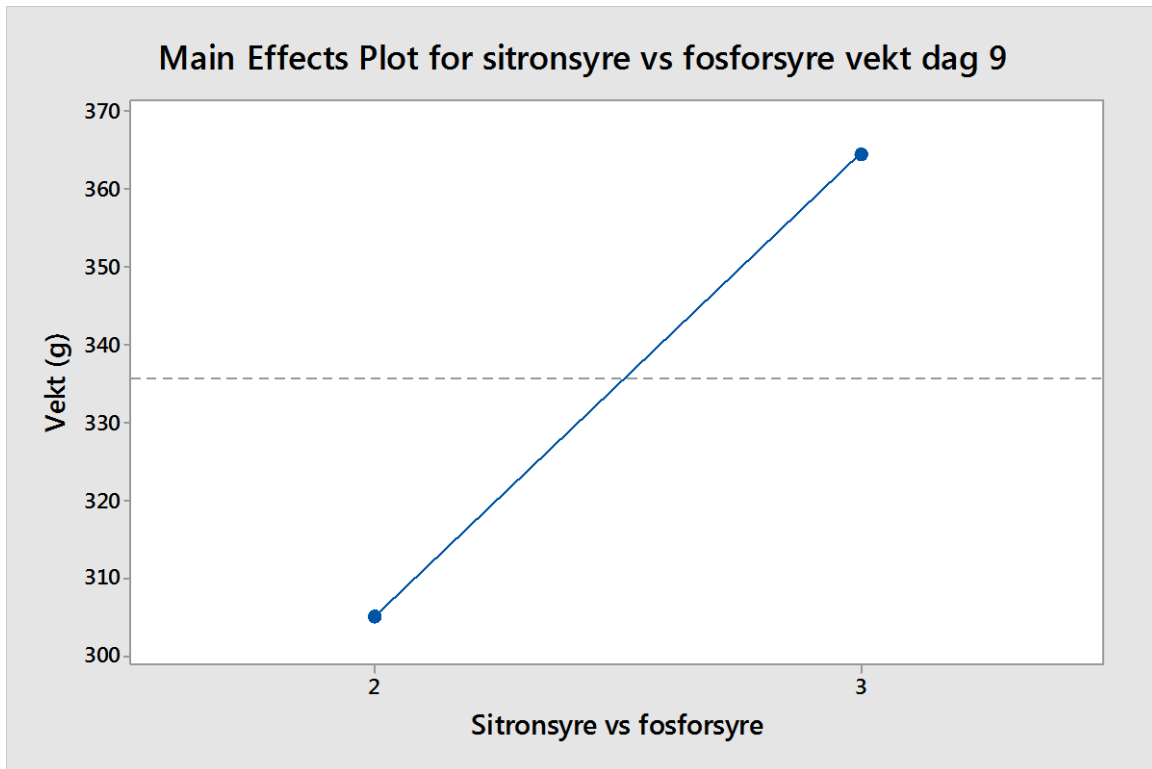
ANOVA-analysen for sitronsyre mot fosforsyre er plottet inn i tabell 3. Tabellen viser responsene som var signifikante ($p < 0,05$) samt gjennomsnittet (gjsn), standardfeil (SE), deltakere i gruppene (n) og p-verdi. Et main effect plot ble laget i Minitab å finnes i figur 17, 18, 19 og 20.

Tabell 9: Data for responsene som var under $p < 0,05$ var vekt dag 9, vekt dag 15 og vekt dag 25 samt fôrintak.

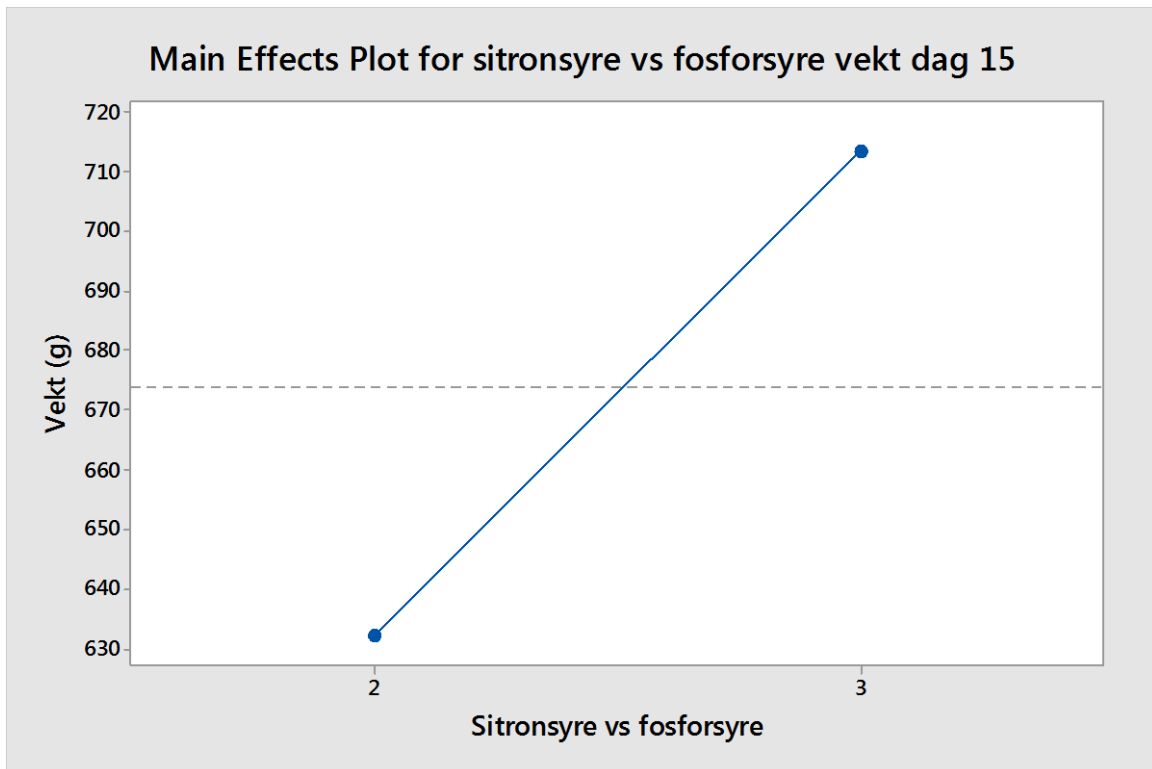
Gjennomsnittet (gjsn), deltakere pr. gruppe (n), standardfeil og p-verdi er gjengitt fra ANOVA.

Responser	Sitronsyre n=16		Fosforsyre n=17		p-verdi
	gjsn	SE	gjsn	SE	
Vekt dag 9	305	13,55	364	8,14	0,001
Vekt dag 15	632	20,54	713	13,38	0,002
Vekt dag 25	1239	33,01	1407	22,95	0,000
Fôrintak	1256	35,7	1386	20,8	0,003

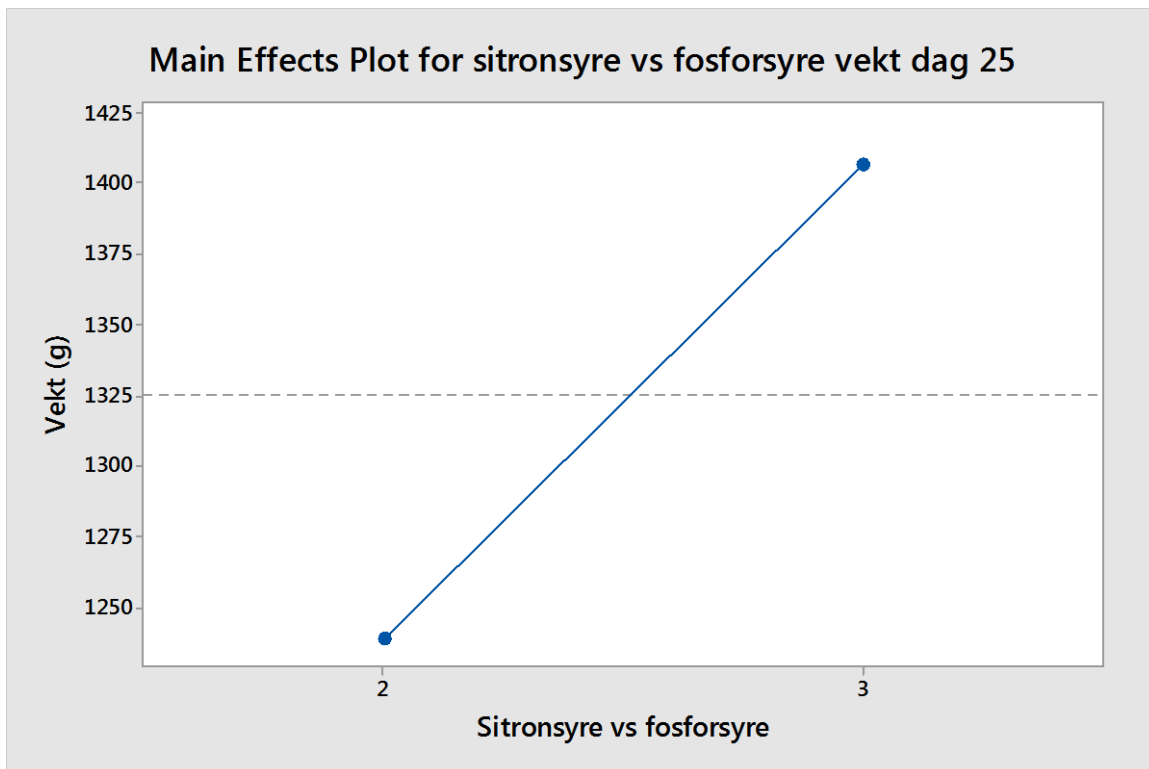
ANOVA viser at alle tre målinger av vekt, dag 9, dag 15 og dag 25 var signifikant forskjellige. Gruppen som fikk fosforsyre har et høyere fôrintak og er større i vekt i forhold til sitronsyre. Sitronsyre har en større standardfeil i gruppen enn gruppen som fikk fosforsyre.



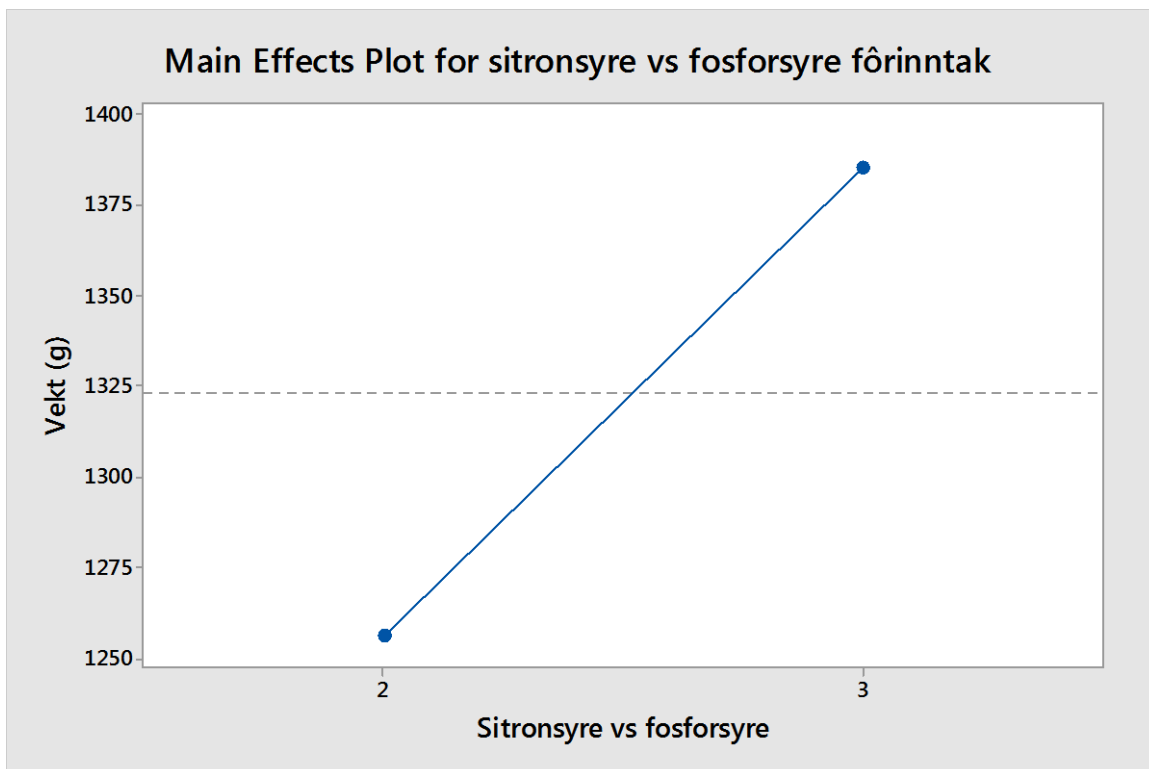
Figur 17: Main Effect Plot for sitronsyre (2) mot fosforsyre (3) viser ulikheten mellom gruppene i forhold til vekt dag 9.



Figur 18: Main Effect Plot for sitronsyre (2) mot fosforsyre (3) viser ulikheten mellom gruppene i forhold til vekt dag 15.



Figur 19: Main Effect Plot for sitronsyre (2) mot fosforsyre (3) viser ulikheten mellom gruppene i forhold til vekt dag 25



Figur 20: Main Effect Plot for sitronsyre (2) mot fosforsyre (3) viser ulikheten mellom gruppene i forhold til fôrintak.

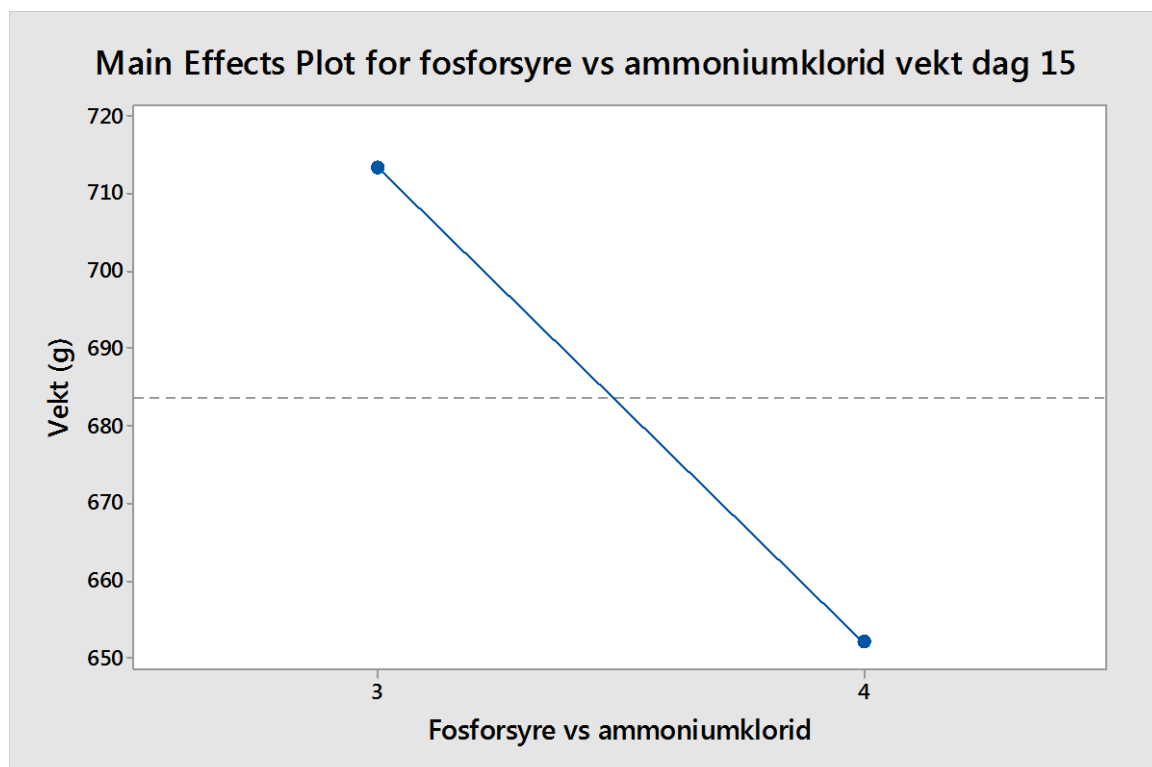
Fosforsyre mot ammoniumklorid

ANOVA-analysen for fosforsyre mot ammoniumklorid er vist i tabell 4 og viser de signifikante forskjellene som var mellom gruppene. Gruppenes responser er gjengitt med gjennomsnitt, standardfeil, antall deltakere og p-verdi. Et main effect plot ble laget i Minitab og finnes i figur 21, 22 og 23.

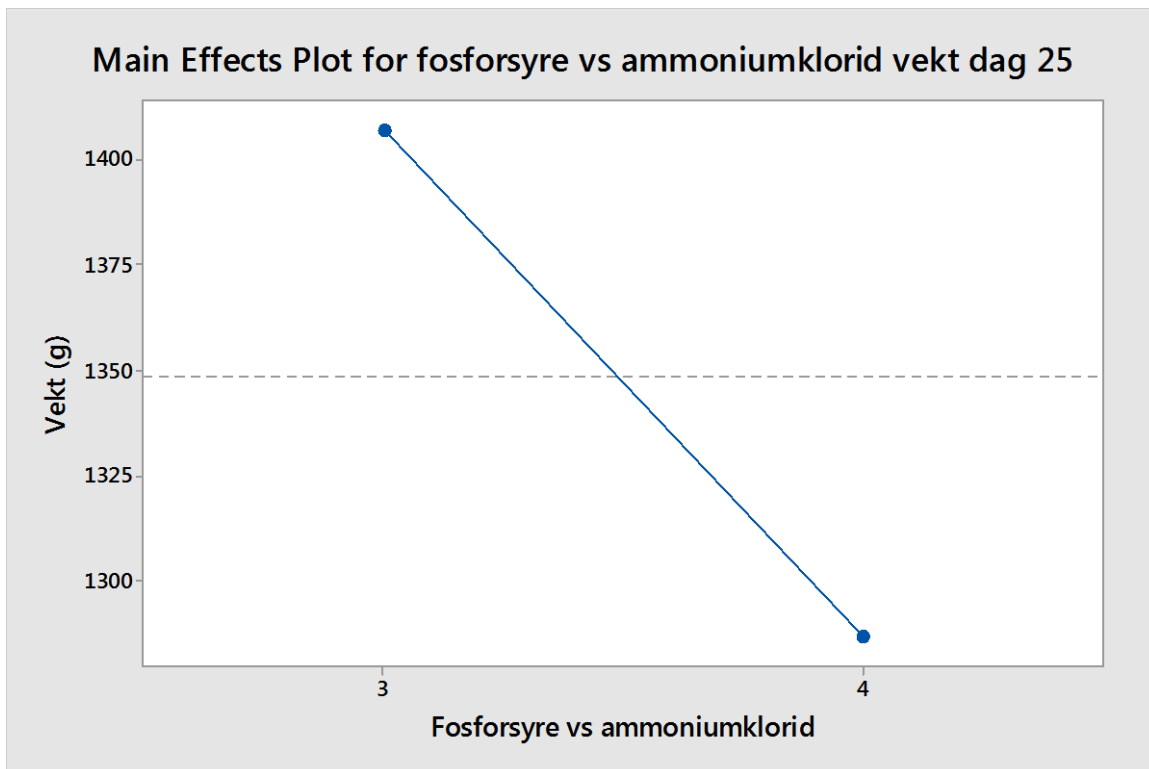
Tabell 10: Responsene som var signifikant forskjellige for fosforsyre mot ammoniumklorid er gjengitt med p-verdi, gjennomsnitt (gjsn), standardfeil (SE) og antall deltakere i gruppene (n).

Responser	Fosforsyre n=17		Ammoniumklorid n=16		p-verdi
	gjsn	SE	gjsn	SE	
Vekt dag 15	713	13,38	652	14,67	0,004
Vekt dag 25	1407	22,95	1287	28,6	0,002
Fôrintak	1386	20,8	1264	28,2	0,001

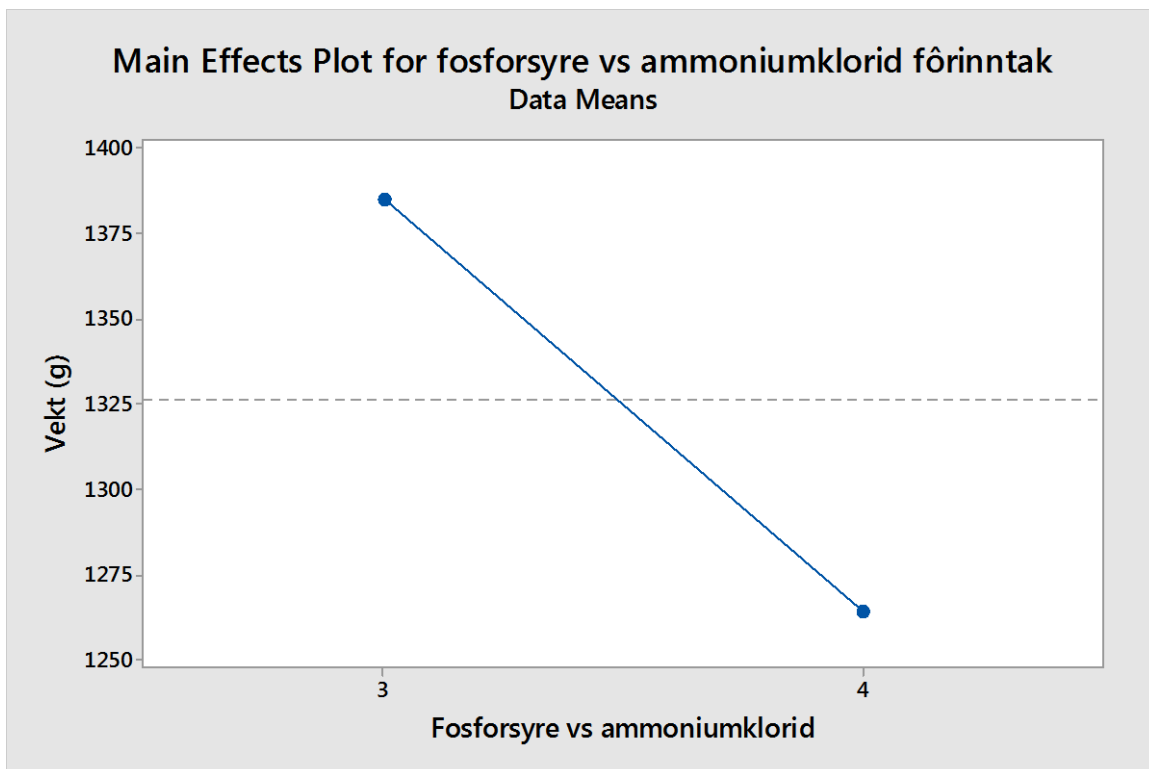
ANOVA-analysen viser at det er vekt for dag 15 og 25 og fôrintak som var signifikant forskjellig mellom gruppene. Det er gruppen som fikk fosforsyre som har økt signifikant mest i vekt på disse målingene. Ammoniumklorid har en større standardfeil på alle responsene.



Figur 21: Main Effect Plot for fosforsyre mot ammoniumklorid for vekt dag 15.



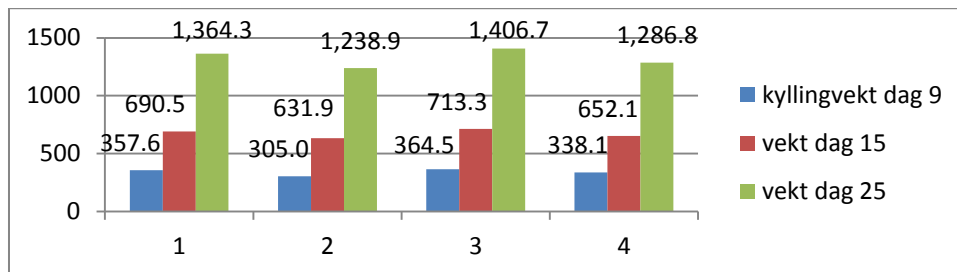
Figur 22: Main Effect Plot for fosforsyre mot ammoniumklorid for vekt dag 25.



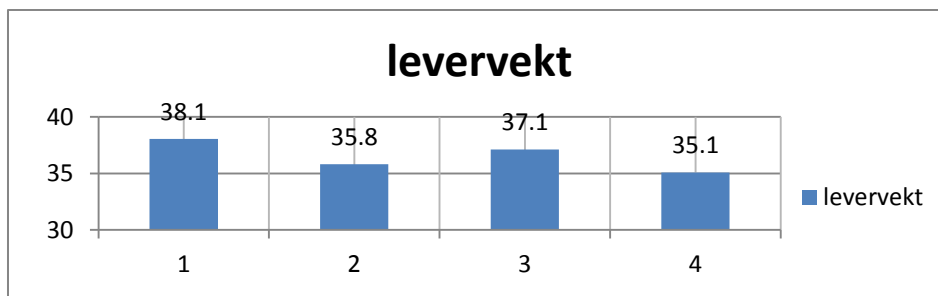
Figur 23: Main Effect Plot for fosforsyre mot ammoniumklorid i forhold til fôrintak.

Grafisk illustrasjon

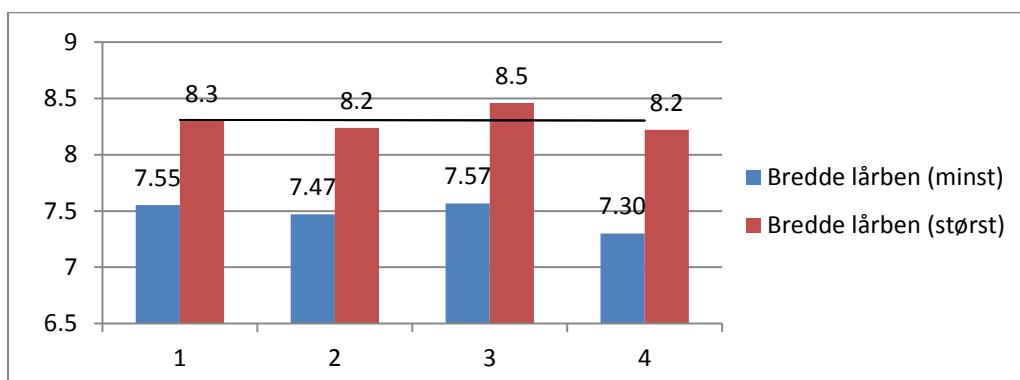
Grafene illustrerer forskjellen mellom gruppene. Resultatet blir også kort forklart om de viktigste observasjonene. Nærmere diskusjon av resultatet og sammenhenger mellom gruppene blir diskutert i et eget avsnitt.



Hver av gruppene øker vekten proporsjonalt med hverandre. Gruppene seg i mellom var av ulik vekst der gruppen som fikk fosforsyre (3) var gjennomsnittlig tyngst ved tre målinger. Gruppen som fikk sitronsyre (2) var den letteste gruppen gjennomsnittlig ved alle tre målinger. Resultatet er gjennomsnittlig beregnet for alle kyllingene i gruppene.

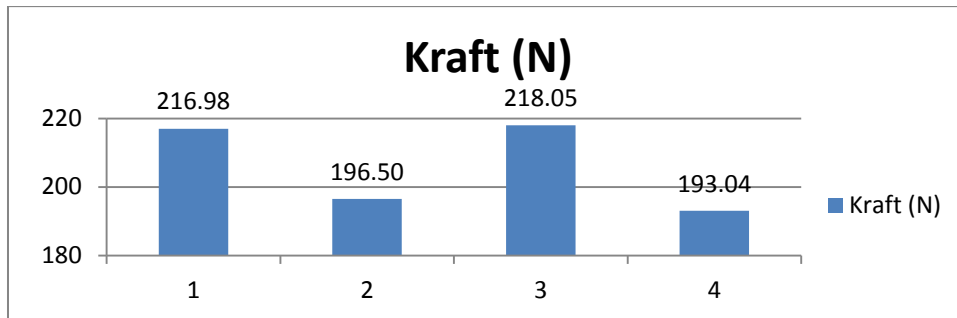


Gruppen med vann (1) hadde størst levervekt, og gruppen som fikk ammoniumklorid (4) veide minst (gjennomsnittlige tall for hele gruppen).

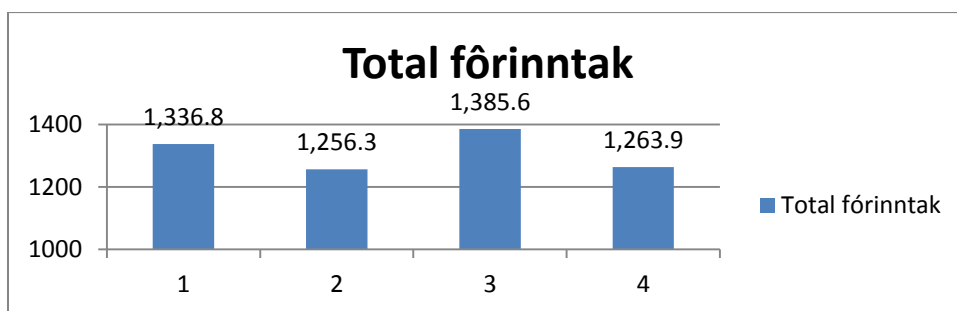


Ved måling av diameter av lårbein (oppgett i mm) så var gruppen med fosforsyre (3) den gruppen som hadde størst lårbein ved både største og minste delen av lårbeinet. Gruppen med

den minste bredden både ved minste og største bredde var ammoniumklorid (4). Tallene er gjennomsnittet for alle kyllingene i gruppene.



Kraften som ble målt ved knekktesten viste at lårbeinet i gruppen fosforsyre (3) trengte mest kraft (218 N) for å knekke. Gruppen med ammoniumklorid (4) trengte minst kraft for å knekke (193 N). Gruppen med vann (1) lå tett under fosforsyre mens gruppen med sitronsyre lå tettere mot sitronsyre (2). Resultatet er gjennomsnittlig beregnet for alle kyllingene i gruppene.



Det totale fôrinntaket som ble målt under hele forsøksperioden viser at gruppen som fikk fosforsyre (3) var gruppen som spiste mest. Her var det gruppen som fikk sitronsyre som spiste minst mens gruppen som fikk ammoniumklorid lå tett over. Resultatet er gjennomsnittlig beregnet for alle kyllingene i gruppene. Fôrinntaket er oppgitt i gram.

5.1. Væskeforbruk

Væskeforbruket ble ikke tatt med i ANOVA siden det er for mye feilkilder i data.

Væskeforbruket vil kun bli brukt som en evaluering i forhold til teori i diskusjonen. Det ble da kun beregnet antall liter væske som ble forbrukt pr. gruppe og pr. kylling i gruppene i tabell 11.

Tabell 11: Væskeforbruket til kyllingene ble målt når vannet ble byttet. Mengden er oppgitt i liter og n=antallet kyllinger i gruppene. Gruppene er rangert med nummer der vann= 1, sitronsyre=2, fosforsyre =3 og ammoniumklorid=4

Gruppe	Dag 1-4	Dag 5-12	Dag 13-24	Tot. vanninntak	Vann i liter pr. kylling
1 n=32	13,78	23,5	100	137,8	4,3
2 n=16	5,93	9,68	45,2	60,81	3,8
3 n=17	7,04	12,94	55,2	75,18	4,4
4 n=16	7,78	11,34	43,5	62,62	3,9

Tabellen viser at gruppen som fikk fosforsyre var gruppen som tilsynelatende drakk mest, mens gruppen som fikk sitronsyre drakk minst væske. Tallene er derimot kun et estimat da flere av tappeventilene lakk, og det dryppet litt fra beholderne.

6. Diskusjon

6.1. Syreløsningenes påvirkning av vekt

Vekt var den responsen som ga mest signifikant utslag på ulikheter mellom gruppene.

Gruppen som fikk fosforsyre var den gruppen som økte mest i vekt, mens gruppen som fikk sitronsyre økte minst. Når fôrinntak sammenlignes med vektøkningen så tyder dette på at syreinnhold har påvirket mengde mat kyllingene spiste. Gruppen som fikk sitronsyre veide minst ved alle tre målinger og var også den gruppen som spiste minst. Kyllingene hadde under forsøket like mye tilgang på mat, så vannets innhold av syre må ha påvirket kyllingenes fôrinntak. Ammoniumklorid er forsøkets eneste base, men har samme påvirkning på vekt som sitronsyre. Gruppen som fikk ammoniumklorid hadde forsøkets nest laveste vekt, rett over sitronsyre. Ammoniumklorid hadde en gjennomsnittlig sluttvekt på 1287 gram, der sitronsyregruppen hadde 1239 gram. Med omtrent samme fôrinntak og relativ lik levervekt så kan det tydes at ammoniumklorid ga det samme utslaget på vekt som for sitronsyre.

Gruppene som økte mest i vekt var kyllingene som fikk fosforsyre og vann. Gruppen som fikk fosforsyre lå på en sluttvekt på 1407 gram og var den gruppen som veide mest igjennom hele forsøket. Vanngruppen lå like under med en sluttvekt på 1364 gram. ANOVA viste at når vekten mellom fosforsyre og sitronsyre ble sammenlignet mot hverandre så var det en klar signifikant forskjell ved alle tre målingene. Det ble også vist en signifikant forskjell av mengde fôr kyllingene spiste seg imellom og det gir en klar indikasjon på at syren fra sitronsyre har påvirket mengden fôr kyllingene spiste. Dette ble også vist mellom vann og sitronsyre da alle vektmålingene var signifikant forskjellige. Når ammoniumklorid og vann ble sammenlignet så var det kun vekten på dag 5 som viste seg å være signifikant forskjellig mellom gruppene. Dette vil si at ammoniumklorid har påvirket vekten, men ikke i den grad at det har utgjort en forskjell på sluttvekten, men en større forskjell ble funnet da ammoniumkloridgruppen og fosforsyregruppen ble sammenlignet. ANOVA-analysen viste en forskjell på vekt ved både dag 15 og dag 25. Her ble det også vist en klar signifikant forskjell i fôrinntak. Dette vil så at forskjellen mellom gruppen som veide mest og gruppene som veide minst, fosforsyre mot ammoniumklorid og fosforsyre mot sitronsyre, hadde en signifikant forskjell på sluttvekten og en klar forskjell på fôrinntak. Dette kan bety at inntaket av syre når det kommer til vektøkning ikke har så mye å si på stoffskifte, men det kan føre til at kyllingene ikke får lyst på mat. Siden fôrinntaket gikk i takt med økning av vekt så kan det se ut til at syreinnhold i drikkevannet forstyrret appetitten/trivselen til dyrene. Kontrollgruppen

(vann) spiste og økte omtrent like mye som gruppen som fikk fosforsyre. Ved å sammenligne gruppene fosforsyre og vann, så viser resultatet at fosforsyre ikke har påvirket kyllingens fôrinntak eller vekt på en negativ måte.

Gruppenes vannforbruk var også noe som ble målt under forsøket. Disse tallene viste at fosforsyre var den gruppen som drakk mest vann, med et totalt vanninntak på ca. 75 liter igjennom forsøket. Naturlig nok var gruppen som drakk mest vann i totale liter, vanngruppen siden den hadde 32 kyllinger hadde mye flere deltakere i gruppen, men når det blir sett på gjennomsnittlig vannforbruk pr. kylling så viser det seg at dyrene i fosforgruppen drakk mest væske. Gruppen som drakk minst var sitronsyregruppen som lå på et inntak på ca. 60 liter. Det er interessant å se tidlig i forsøket at det skapes en trend på mengde væske som ble drukket. I de 11 første dagene så var kyllingene i fellesbur der de fikk vannet servert i traue. Her var det ingen lekkasjer så det estimerte vannforbruket blir riktig. Tidlig i forsøket kommer det frem at gruppen som fikk sitronsyreløsningen i vannet drakk mindre allerede de første fem dagene, mens det er gruppen som fikk ammoniumklorid som drikker mest, men etter dag fem så faller denne gruppen også nedover. Gruppen som fikk sitronsyre var alltid gruppen som drakk minst. Dette gir en indikasjon på at kyllingene reagerer på vannet med sitronsyre med en gang, mens det tar litt tid før gruppen med ammoniumklorid reagerer på det. Inntaket av vann blir veldig likt inntaket av mat og til slutt kyllingens totale vekt.

Målingen av væskeinnhold ble ikke vurdert videre som et resultat fordi dette er et estimat av gjennomsnittet og ikke hentet fra hvert enkelt individ. Noen av drikkeventilene og drikkebeholderne lakk slik at målingen av forbruket ikke var nøyaktig. Det gir en viss indikasjon på inntaket av væske, men siden det kun var noen av gruppene som hadde dårlige ventiler så ble resultatet ikke tatt med i ANOVA.

Det er funnet lite teori som knytter de ulike syrene til økning/tap av vekt. En mulig forklaring for at gruppen som fikk sitronsyre, kan ligge i et forsøk som ble gjort med en hydroxysitronsyre, (Preuss et al. 2004), der deltakerne som fikk hydroxysitronsyre senket kroppsvekten og matinntaket betydelig. Hydroxysitronsyre er et derivat av sitronsyre og kan derfor ikke helt sammenlignes, men det kan gi en indikasjon på at sitronsyre kan ha noe med det reduserte matinntaket som fører til redusert vekt. Forsøket viste også at inntaket av hydroxysitronsyre reduserte mengden leptin som er et hormon som styrer appetitten. Med redusert leptin vil også lysten på mat redusere. Dette kan være en medvirkende årsak til at gruppen som fikk sitronsyre spiste minst.

6.2. Påvirkning av syre på beinstyrke

Kyllingens beinstyrke ble målt ved en fysisk knekktest av lårbeinet. Lårbeinet ble tatt ut, målt opp ved den tykkeste og smaleste siden og satt inn i et apparat som måler spenningen i benet. Ved nok spenn så vil benet knekke og data på når og hvor mye kraft som ble brukt for å bryte benet ble målt. Knekktesten ble forsøkets mest relevante del av oppgavens hovedmål. Testen gir et resultat som viser hvor sterkt beinet er. Testen ble gjort med bein fra alle kyllingene som ble testet, og det ble testet i randomisert rekkefølge slik at det ikke skulle bli knyttet forventninger til resultatet. Knekktesten viser at det er forskjeller mellom gruppene når det gjelder bruddstyrke og størrelse på benet. Resultatet viser at det er gruppen som fikk fosforsyre som har størst beindiameter og bruddstyrke, mens ammoniumklorid har testens minste beindiameter og bruddstyrke. Det viser seg derimot at det er lite signifikante forskjeller mellom gruppene. Det er kun bruddstyrken mellom vann og ammoniumklorid som gir et lite utslag på at det er en forskjell, men den signifikansen ligger i grenseland ($p=0,051$). Det blir derfor feil å diskutere dette resultatet, men siden oppgaven i hovedsak handler om beinstyrke i forhold til syrebelastning så blir den valgt med som et mulig resultat. Det er vist i forsøk at kyllinger som er foret med ammoniumklorid som tilskudd utviklet dyschondroplasi, som er en vekstforstyrrelse i benet (Tablante et al. 2003). Det ble også gjort et forsøk på rotter (Barzel & Massey 1998) der det ble funnet signifikante resultater for nedgang i den totale benmassen. Det ble ikke observert noen vekstforstyrrelser i forsøket, men det kan være en medvirkende årsak til at gruppen som fikk ammoniumklorid lå i grenseland for signifikans i knekktesten. Ammoniumklorid vil dissosiere seg til hydrogen-ioner og ammoniakk i vannløsning som vil føre til at den blir en svak syre (Hostmark et al. 2013). Denne syren kan ha hatt en innvirkning på kalsiumutskillelse i urinen til kyllingene, men om det kan er tilfelle vil kun bli spekulasjoner da det ikke var signifikante verdier ved knekktesten.

Det er blitt gjort flere forsøk som skal tilsi at en syrebelastning i kroppen kan ha negativ påvirkning på bein og det ble gjort en studie på kvinner i overgangsalderen (Calvo, Mona S. & Tucker, Katherine L. 2013), som kunne konkludere med at et høyere inntak av fosforsyre (E338) av det maksimalt daglige inntak hadde en negativ innvirkning på kroppens fosfor:kalsium balanse. Deltakerne som hadde for høye verdier av fosfor hadde fått svekket beinmassen og en lavere beinmineralitet (bone mineral density, BMD). En annen studie, (Libuda et al. 2008), fant ut at det var en negativ assosiasjon mellom inntaket av coladrikker og beinstyrke hos barn. Forsøket var basert på hvor stor effekt det hadde ved å bytte ut den daglige melken med coladrikke. Det viste seg i dette forsøket at det ikke er melken, men det

totale proteininntaket som er viktig for å opprettholde god beinstyrke. Ved å fjerne en viktig proteinkilde fra kosten og erstatte dette med coladrikke så ga det et betydelig utslag på beinstyrken. Det økte inntaket av coladrikker kan øke syreinnholdet i kroppen som igjen kan øke kalsiumutskillelsen i urinen (Hostmark et al. 2011). Dette støttes også opp av (Heaney 2013) som forsket på kalsium og proteiner i forhold til beinstyrke på eldre mennesker. Det viste seg at de som hadde mangel på kalsium og proteiner hadde også størst risiko for beinbrudd. Siden beinets totale volum består av 50 % protein så er det naturlig at det ikke bare er viktige mineraler som kalsium som forårsaker god beinbygning, men også inntaket av proteiner.

Fôret som ble brukt i forsøket var et kommersielt kraftfôr som blir brukt til oppdrett av slaktekylling. Dette kraftfôret er rikt på råproteiner (23 %) og også rik på kalsium og vitamin D. Dette kan ha vært en medvirkende årsak til at balansen mellom fosfor og kalsium opprettholdes på et akseptabelt nivå (Calvo, Mona S. & Tucker, Katherine L. 2013). Det ble ikke målt innholdet av fosfor og kalsium i lårbenet til kyllingene etter slakting, noe som skulle ha blitt gjort, sett i ettertid. Forsøket baserte beinstyrken kun på knekktesten og teoretiske funn fra andre forsøk så det vil kun bli et estimat om hvorvidt innholdet av fosfor og kalsium var innenfor de anbefalte grenser.

I forsøket konsumerte kyllingene i gjennomsnitt ca. 4,4 l fosforsyreløsning pr. kylling. Den mengden fosforsyreløsning som kyllingene fikk under forsøket har en liten syrebelastende effekt, og er en trolig tolererbar mengde. Det ble gjort beregninger på hvor mye fosforsyre hver enkelt kylling konsumerte igjennom forsøket (vedlegg 6) som tilsier at kyllingene fikk ca. 1 mg fosforsyre igjennom hele forsøket. Det kan tydes på at inntaket av fosforsyre kanskje skulle bli økt til betydelig mengde for at det skulle ha vært en potensiell negativ effekt på syrebelastning. Tilskuddet av fosforsyre viste at kyllingene fikk like god beinstyrke og økt vekt som kontrollgruppen.

Det er blitt foreslått til at innholdet av fosforsyre i cola kan være en medvirkende årsak til økt syredannelse i kroppen og to studier som omhandlet rotter, fant at inntaket av cola økte reduksjonen av beinmineraltettheten (García-Contreras et al. 2000; Ogur et al. 2007). Rottene ble gitt cola som drikke og ikke en vannløsning av fosforsyre som var ved dette forsøket. Det er foreslått at det ikke bare er fosforsyren i cola som medvirker til reduksjon av beinmineraltetthet, men også koffeinen som er tilsatt. Dette konkluderte en studie med da det ble funnet signifikante resultater på at koffein hadde en negativ effekt på beintap på eldre

kvinner (Rapuri et al. 2001). Det vil derfor være fristende å si at det ikke bare er fosforsyre som kan ha en negativ effekt, men også koffeininnholdet. Det ville vært interessant for forsøket å bytte ut vannløsning med en ren colaløsning for å se om det kan påvises ulikheter mellom en fosforsyreløsning og colaløsning. Dette kan være med på å avdekke om det er blandingen av ingrediensene i cola som gir en skadelig effekt eller ikke.

Det er ikke oppført på etikettene hvor mye fosforsyre det er tilsatt i coladrikker så det blir vanskelig å estimere hvor mye som må inntas for at fosforsyre skal bli høyere enn det maksimalt daglige inntaket som er for fosforsyre (E-338) 70 mg/kg kroppsvekt (DatabaseSør 2002). Tidligere studier har sett på hvor mye innhold av fosforsyre det er i cola (Hostmark et al. 2013) der det ble estimert et innhold på ca. 0,5 g/l. Kyllingene i forsøket fikk i seg ca. 1 mg fosforsyre på 4,4 liter løsning. Dette betyr at innholdet av fosforsyre i vannløsningen er langt unna de verdiene som er estimert i cola. Mengden fosforsyre kunne ha blitt økt, men det er vanskelig å si hvordan kyllingene vil reagere på en økt mengde. Siden det ble observert tidlig i forsøket at dyrene mistrivdes med noen av syrene var det naturlig å gå rolig frem med konsentrasjonen av løsningene for å sikre dyrenes helse.

Sukkerholdige drikkevarer har tidoblet siden 1950 årene (Helsedirektoratet 2013), dette vil også bety at økning i sukkerinntak har økt betydelig. Fruktosekomponenter av fruktose har også muligheten til å øke den totale syrebelastningen i kroppen da på grunn av urinsyren som blir dannet av katabolisme av fruktose i leveren (Hostmark et al. 2011).

Flere forsøk viser til at en økt syrebelastning kan gi økt risiko for dårligere beinstyrke, men det er derimot også funnet studier som sier at en økt syrebelastning av fosforsyre ikke hadde en signifikant påvirkning av kalsiumutskillelse i urinen (Fenton et al. 2009).

Forsøket har vist at det skjer noen få fysiologiske forandringer ved inntak av syre. Kyllingene som fikk fosforsyre fikk økt vekten og beindiameter og beinstyrke i forhold til de andre gruppene, men hadde ikke signifikant sterkere beinstyrke enn noen av de andre gruppene. Dette kan tilsi at fosforsyre kan stimulere til økt vekt og beindiameter blant syrene, men ikke øke beinstyrken signifikant i forhold til vektøkningen. Fosforsyren lå nærme kontrollgruppen på alle de signifikante verdiene, noe som kan tyde på at den tilsatte mengden fosforsyreløsning ikke hadde innvirkning på kyllingens fysiologiske forandring.

Forsøket kunne sett mer på innhold av mineraler for å finne ut om fosforsyre ga en økt risiko for lavt mineralinnhold i lårbein. Det praktiske forsøket hadde flere begrensninger. Dette var

et preliminært forsøk som baserte metoden på tidligere studier. Det ble tidlig observert at kyllingene ikke trivdes med en høyere konsentrasjon av syre i begynnelsen av forsøket, noe som kan ha medvirket til at lavt inntak av vannløsning og før.

Studier gir indikasjon på at det er uenigheter på dette området. Det er en enighet om at fosforsyre er helsemessig ugunstig for beinstyrke ved for høye inntak, men om innholdet i coladrikker kan påvirke syrebelastningen på denne negative måten er det fortsatt uklart om.

7. Videre arbeid

Videre arbeid kunne være å se på interaksjon mellom inntaket av syreholdig drikke og innholdet av protein, fosfor, magnesium og kalsium på syrebelastning i kylling. Det kunne også vært interessant å se på hvordan kyllingene reagerte på om de fikk syreløsningen senere i forsøket da det viste seg at de ikke trivdes med en høyere syrekonsentrasjon i tidlig levealder.

8. Konklusjon

Det ble ikke funnet en sammenheng mellom inntak av fosforsyre og økt risiko for nedsettende beinhelse i oppdrettskylling. Det er i midlertidig enighet om at et for høyt inntak av syreholdig mat og drikke kan medføre til økt syrebelastning som igjen kan føre til økt risiko for dårligere beinhelse. Tilsetning av sitronsyre og ammoniumklorid fører til lavere inntak av drikke og mat som førte til nedsatt vekt.

Referanseliste

- Alexy, U., Remer, T., Manz, F., Neu, C. M. & Schoenau, E. (2005). Long-term protein intake and dietary potential renal acid load are associated with bone modeling and remodeling at the proximal radius in healthy children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (5): 1107-1114.
- Arnett, T. R. (2007). Acid–base regulation of bone metabolism. *International Congress Series*, 1297 (0): 255-267.
- Barzel, U. S. & Massey, L. K. (1998). Excess Dietary Protein Can Adversely Affect Bone. *The Journal of Nutrition*, 128 (6): 1051-1053.
- Bothara, D. K. G. (2007). *Inorganic Pharmaceutical Chemistry*: Nirali Prakashan.
- Bushinsky, D. (1994). Acidosis and bone.
- Bushinsky, D. A., Smith, S. B., Gavrilov, K. L., Garilov, L. F., Li, J. & Levi-Setti, R. (2003). *Chronic acidosis-induced alteration in bone bicarbonate and phosphate*, b. 285. F532-F539 s.
- Calvo, M. S. & Tucker, K. L. (2013). Is phosphorus intake that exceeds dietary requirements a risk factor in bone health? *Ann N Y Acad Sci*, 1301: 29-35.
- Calvo, M. S. & Tucker, K. L. (2013). Is phosphorus intake that exceeds dietary requirements a risk factor in bone health? *Annals of the New York academy of sciences* (Dietary Phosphorus Excess and Health): 6.
- Cano-Marquina, A., Tarín, J. J., García-Pérez, M.-Á. & Cano, A. (2014). Transient regional osteoporosis. *Maturitas*, 77 (4): 324-329.
- DatabaseSør. (2002). Info om E-338. *Matvareguiden*.
- Dixon, T. F. & Perkins, H. R. (1952). Citric acid and bone metabolism. *Institute of Orthopaedics, London, W .1*.
- Fenton, T., Lyon, A., Eliasziw, M., Tough, S. & Hanley, D. (2009). Phosphate decreases urine calcium and increases calcium balance: A meta-analysis of the osteoporosis acid-ash diet hypothesis. *Nutrition Journal*, 8 (1): 41.
- Fjellvåg, H. & Haraldsen, H. (2009). Fosforsyre. www.snl.no.
- Fürst. (2014). Tilgjengelig fra: <http://www.furst.no/>.
- García-Contreras, F., Paniagua, R., Avila-Díaz, M., Cabrera-Muñoz, L., Martínez-Muñiz, I., Foyo-Niembro, E. & Amato, D. (2000). Cola Beverage Consumption Induces Bone Mineralization Reduction in Ovariectomized Rats. *Archives of Medical Research*, 31 (4): 360-365.
- Gerdes, U. & Kjeldsen, H. C. (2010). Parathyroideahormon (PTH). *Schröder T*.
- Gorter, E. A., Hamdy, N. A. T., Appelman-Dijkstra, N. M. & Schipper, I. B. (2014). The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone* (0).
- Heaney, R. P. (2013). Dairy Intake, Dietary Adequacy, and Lactose Intolerance. *American Society for Nutrition*.
- Helsedirektoratet. (2013). Utviklingen i norsk kosthold.
- helseinformatikk, N. (2013). *Norsk helseinformatikk*.
- Hostmark, A., Lunde, M. S. & Haug, A. (2013). Increased serum triglycerides and reduced HDL cholesterol in male rats after intake of ammonium chloride for 3weeks. *Lipids in Health and Disease*, 12 (1): 92.
- Hostmark, A. T., Sogaard, A. J., Alvaer, K. & Meyer, H. E. (2011). The oslo health study: a dietary index estimating frequent intake of soft drinks and rare intake of fruit and vegetables is negatively associated with bone mineral density. *J Osteoporos*, 2011: 102686.
- Islam, K. M., Schaeublin, H., Wenk, C., Wanner, M. & Liesegang, A. (2012). Effect of dietary citric acid on the performance and mineral metabolism of broiler. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 96 (5): 808-17.

- Jongbloed, A. W. (1987). *Phosphorus in the feeding of pigs : effect of diet on the absorption and retention of phosphorus by growing pigs*. Lelystad: I.V.V.O.
- Kutyła-Olesiuk, A., Wawrzyniak, U. E., Ciosek, P. & Wróblewski, W. Electrochemical monitoring of citric acid production by *Aspergillus niger*. *Analytica Chimica Acta* (0).
- Larsson, S. C., Åkesson, A. & Wolk, A. (2014). Sweetened Beverage Consumption Is Associated with Increased Risk of Stroke in Women and Men. *The Journal of Nutrition*.
- Libuda, L., Alexy, U., Remer, T., Stehle, P., Schoenau, E. & Kersting, M. (2008). Association between long-term consumption of soft drinks and variables of bone modeling and remodeling in a sample of healthy German children and adolescents. *Am J Clin Nutr*, 88 (6): 1670-7.
- Matportalen. (2011). Hva betyr E-numerne?
- Melton, L., Chrischilles, E., Copper, C., Lane, A. & Riggs, B. (1992). How Many Women Have Osteoporosis? , 7.
- New, S. A. (2003). Intake of fruit and vegetables: implications for bone health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62 (04): 889-899.
- Ogur, R., Uysal, B., Ogur, T., Yaman, H., Oztas, E., Ozdemir, A. & Hasde, M. (2007). Evaluation of the effect of cola drinks on bone mineral density and associated factors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 100 (5): 334-8.
- Preuss, H. G., Bagchi, D., Bagchi, M., Rao, C. V., Dey, D. K. & Satyanarayana, S. (2004). Effects of a natural extract of (-)-hydroxycitric acid (HCA-SX) and a combination of HCA-SX plus niacin-bound chromium and *Gymnema sylvestre* extract on weight loss. *Diabetes Obes Metab*, 6 (3): 171-80.
- Rapuri, P. B., Gallagher, J. C., Kinyamu, H. K. & Ryschon, K. L. (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (5): 694-700.
- Remer, T. (2000). ACID-BASE IN RENAL FAILURE: Influence of Diet on Acid-Base Balance. *Seminars in Dialysis*, 13 (4): 221-226.
- Seifter, J. L. (2011). Acid-Bace disorders. *Goldman L, Schafer AI, eds*.
- Sjaastad, Ø., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of domestic animals*, b. 2.
- Susan E. Brown, P., CCN and Russel Jaffe, MD, PhD, CNN. (2000). Acid-alkaline balance and its effect on bone health. *International journal of integrative medicine*, 2.
- Tablante, N. L., Estevez, I. & Russek-Cohen, E. (2003). Effect of Perches and Stocking Density on Tibial Dyschondroplasia and Bone Mineralization as Measured by Bone Ash in Broiler Chickens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 12 (1): 53-59.
- Teofilo, J. M., Leonel, D. V. & Lamano, T. (2010). Cola beverage consumption delays alveolar bone healing: a histometric study in rats. *Braz Oral Res*, 24 (2): 177-81.
- Wadikar, D. D. & Premavalli, K. S. (2014). Beverage from *Coleus aromaticus* reduces leptin levels and improves appetite rating in human volunteers. *Nutrition*, 30 (6): 702-705.

Vedlegg 1

HMS-DATABLAD

Ammoniumklorid

FORMEL: NH₄Cl

R-SETNINGER

R22 Farlig ved svelging.

R36 Irriterer øynene.

S-SETNINGER

S22 Unngå innånding av støv.

EKSPONERINGSKONTROLL OG PERSONLIG VERNEUTSTYR

BEGRENSNING OG KONTROLL AV EKSPONERING

Alt arbeid med farlige kjemikalier skal utføres i avtrekkskap eller i godt ventilert og godkjent rom. Mulighet for øyeskylling skal finnes på arbeidsplassen. Unngå håndtering som medfører støvdannelse.

ÅNDEDRETTSVERN

Åndedrettsvern skal benyttes ved forekomst av støv. Støvfilter P2 (for fint støv).

ØYEVERN

Ved risiko for direkte kontakt eller sprut skal øyebeskyttelse benyttes. Tettsittende vernebriller.

HÅNDVERN

Vernehansker bør benyttes ved direkte kontakt og sprut.

Vernehanskene som brukes må være i hht. spesifikasjonene i EU direktiv 89/686/EEC og standarden EN374.

Våres anbefaling gjelder kun for produktet nevnt i HMS-databladet og levert av oss for laboratoriebruk.

Anbefalingen gjelder ikke ved oppløsning eller blanding med andre stoffer under betingelser som er forskjellige fra det. Vernehansker av følgende materiale har normalt ved romtemperatur gjennombruddstid mer enn 4 timer:

Nitril.

ANNET HUDVERN ENN HÅNDVERN

Ved risiko for direktekontakt eller sprut bør verneklær benyttes. Bruk av barriere krem (før arbeid med produktet) anbefales.

FJERNING AV KJEMIKALIEAVFALL

GENERELT

Klassifisert som farlig avfall. Destrueres i henhold til lokale forskrifter, eller kontakt et godkjent deponeringssted.

Spørsmål om allmenn kjemisk avfallshåndtering kan som regel besvares av kommunen eller NORSAS.

AVFALLSGRUPPER

Avfallsstoffnr. 7091 Uorganiske salter og annet fast stoff.

Forslag til EAL-kode(r): 16 05 07 (EAL-kode) Annet avfall som inneholder uorganiske kjemiske produkter, f.eks.

laboratoriekjemikalier ikke spesifisert andre steder, pulver til brannslukkingsapparater. (VWR 2004)

Vedlegg 2

HMS-DATABLAD

Fosforsyre

FORMEL: H₃PO₄

R-SETNINGER

R34 Etsende

S-SETNINGER

S1/2 Oppbevares innelåst og utilgjengelig for barn.

S26 Får man stoffet i øynene; skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege.

S36/37/39 Bruk egnede verneklær, vernehansker og vernebriller/ansiktsskjerm.

S38 Ved utilstrekkelig ventilasjon, må det benyttes egnet åndedrettsvern.

S45 Ved uhell eller illebefinnende er omgående legebehandling nødvendig; vis etiketten om mulig.

EKSPONERINGSKONTROLL / PERSONLIG VERNEUTSTYR

Annen informasjon om grenseverdier Det oppgitte verneutstyr er veiledende. Risikovurderingen (Faktisk risiko) kan føre til andre krav.

BEGRENSNING AV EKSPONERING PÅ ARBEIDSPLASSEN

Sørg for tilstrekkelig ventilasjon. Vask hendene etter hvert skift, og før spising, røyking eller bruk av toalett.

ÅNDEDRETTSVERN VED UTILSTREKkelig VENTILASJON

Bruk egnet åndedrettsvern med gassfilter, type E.

HÅNDVERN

Benytt hansker av motstandsdyktig materiale, f.eks.: Neoprengummi. Nitrilgummi. Gjennomtrengningstid > 8 timer.

ØYEVERN

Bruk tettsluttende vernebriller eller ansiktsskjerm ved fare for sprut/dampdannelse.

ANNET HUDVERN ENN HÅNDVERN

Benytt hensiktsmessige verneklær for beskyttelse ved mulig hudkontakt. Bruk motstandsdyktige klær som dekker hele kroppen ved risiko for direktekontakt ved søl eller sprut. Støvler av motstandsdyktig materiale, f.eks. neoprengummi.

Annen informasjon Nøddusj og mulighet for øyeskylling må finnes på arbeidsplassen

FJERNING AV KJEMIKALIEAVFALL

Produktet er klassifisert som farlig avfall: Ja

Egnede metoder til fjerning av kjemikalie: Leveres som farlig avfall til godkjent behandler eller innsamler.

Koden for farlig avfall (EAL-kode) er veiledende. Bruker må selv angi riktig EAL-kode hvis bruksområdet avviker (Solberg 2009)

Vedlegg 3

HMS-DATABLAD

Sitronsyre

FORMEL C6H8O7

R-SETNINGER

R36 Irriterer øynene.

S-SETNINGER

S26 Får man stoffet i øynene; skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege.

EKSPONERINGSKONTROLL OG PERSONLIG VERNEUTSTYR

BEGRENSNING OG KONTROLL AV EKSPONERING

Alt arbeid med farlige kjemikalier skal utføres i avtrekkskap eller i godt ventilert og godkjent rom. Mulighet for øyeskylling skal finnes på arbeidsplassen.

ÅNDEDRETTSVERN

Åndedrettsvern skal benyttes ved forekomst av støv. Støvfilter P3 kan være nødvendig.

ØYEVERN

Ved risiko for direkte kontakt eller sprut skal øyebeskyttelse benyttes. Tettsittende vernebriller.

HÅNDVERN

Vernehansker skal benyttes ved fare for direkte kontakt og sprut.

Vernehanskene som brukes må være i hht. spesifikasjonene i EU direktiv 89/686/EEC og standarden EN374.

Våres anbefaling gjelder kun for produktet nevnt i HMS-databladet og levert av oss for laboratoriebruk.

Anbefalingen gjelder ikke ved oppløsning eller blanding med andre stoffer under betingelser som er forskjellige fra det. Vernehansker av følgende materiale har normalt ved romtemperatur gjennombruddstid mer enn 4 timer:

Nitril.

ANNET HUDVERN ENN HÅNDVERN

Bruk av barriere krem (før arbeid med produktet) anbefales. Verneklær etter behov.

FJERNING AV KJEMIKALIEAVFALL

GENERELT

Klassifisert som farlig avfall. Destrueres i henhold til lokale forskrifter, eller kontakt et godkjent deponeringssted.

Spørsmål om allmenn kjemisk avfallshåndtering kan som regel besvares av kommunen eller NORSAS.

AVFALLSGRUPPER

Avfallsstoffnr. 7134 Surt organisk avfall.

Forslag til EAL-kode(r): 06 01 06 (EAL-kode) Andre syrer. (VWR 2001)

Vedlegg 4

ANOVA-analyse fra Minitab 17

General Linear Model: Vekt 9 f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	29449	29449	21,53	0,000
Error	46	62920	1368		
Total	47	92369			

General Linear Model: Vekt 15 f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	36719	36719	9,10	0,004
Error	46	185543	4034		
Total	47	222262			

General Linear Model: Vekt 25 f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	167768	167768	8,12	0,007
Error	46	949947	20651		
Total	47	1117715			

General Linear Model: Levervekt f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	54,30	54,30	1,77	0,189
Error	46	1408,07	30,61		
Total	47	1462,37			

General Linear Model: Bredde l f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	0,0622	0,06216	0,22	0,644
Error	42	12,0451	0,28679		
Total	43	12,1073			

General Linear Model: Bredde s f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	0,0347	0,03469	0,10	0,754
Error	42	14,6308	0,34835		
Total	43	14,6655			

General Linear Model: Kekktest f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	3841	3841	2,90	0,096
Error	42	55712	1326		
Total	43	59552			

General Linear Model: Forinntak f/s versus Vann vs sitronsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs sitronsyre	1	69176	69176	3,15	0,083
Error	46	1011576	21991		
Total	47	1080752			

General Linear Model: Vekt 9 v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	527,0	527,0	0,67	0,416
Error	47	36842,1	783,9		
Total	48	37369,1			

General Linear Model: Vekt 15 v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	5727	5727	2,03	0,161
Error	47	132918	2828		
Total	48	138644			

General Linear Model: Vekt 25 v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	19952	19952	1,13	0,294
Error	47	831517	17692		
Total	48	851469			

General Linear Model: Levervekt v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	9,65	9,651	0,42	0,520
Error	47	1079,96	22,978		
Total	48	1089,62			

General Linear Model: Bredde l v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	0,00229	0,002291	0,01	0,913
Error	44	8,39075	0,190699		
Total	45	8,39304			

General Linear Model: Bredde s v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	0,2588	0,2588	1,08	0,304
Error	44	10,5160	0,2390		
Total	45	10,7748			

General Linear Model: Kekktest v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	11,5	11,47	0,01	0,928
Error	44	61434,0	1396,23		
Total	45	61445,4			

General Linear Model: Forinntak v/f versus Vann vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs fosforsyre	1	26419	26419	1,51	0,225
Error	47	822157	17493		
Total	48	848576			

General Linear Model: Vekt 9 v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	4066	4066	1,97	0,168
Error	46	95131	2068		
Total	47	99198			

General Linear Model: Vekt 15 v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	15798	15798	5,34	0,025
Error	46	135963	2956		
Total	47	151761			

General Linear Model: Vekt 25 v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	64139	64139	3,33	0,074
Error	46	884725	19233		
Total	47	948864			

General Linear Model: Levervekt v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	90,09	90,09	4,10	0,049
Error	45	987,92	21,95		
Total	46	1078,01			

General Linear Model: Bredde l v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	0,6400	0,6400	3,01	0,090
Error	44	9,3574	0,2127		
Total	45	9,9974			

General Linear Model: Bredde s v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	0,0647	0,06470	0,26	0,614
Error	44	11,0240	0,25055		
Total	45	11,0887			

General Linear Model: Kekktest v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	5796	5796	4,04	0,051
Error	44	63087	1434		
Total	45	68883			

General Linear Model: Forinntak v/a versus Vann vs Ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Vann vs Ammoniumklorid	1	56658	56658	2,91	0,095
Error	46	895784	19474		
Total	47	952442			

General Linear Model: Vekt 9 s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	29115	29115	14,54	0,001
Error	31	62056	2002		
Total	32	91171			

General Linear Model: Vekt 15 s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	54592	54592	11,29	0,002
Error	31	149852	4834		
Total	32	204445			

General Linear Model: Vekt 25 s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	232094	232094	17,78	0,000
Error	31	404561	13050		
Total	32	636655			

General Linear Model: Levervekt s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	14,45	14,45	0,60	0,444
Error	31	745,95	24,06		
Total	32	760,40			

General Linear Model: Bredde l s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	0,06612	0,06612	0,23	0,637
Error	26	7,56103	0,29081		
Total	27	7,62714			

General Linear Model: Bredde s s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	0,3418	0,3418	1,01	0,325
Error	26	8,8268	0,3395		
Total	27	9,1686			

General Linear Model: Kekktest s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	3232	3232	2,57	0,121
Error	26	32696	1258		
Total	27	35928			

General Linear Model: Forinntak s/f versus Sitronsyre vs fosforsyre

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs fosforsyre	1	137828	137828	10,09	0,003
Error	31	423564	13663		
Total	32	561392			

General Linear Model: Vekt 9 s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	8722	8722	2,17	0,151
Error	30	120345	4012		
Total	31	129067			

General Linear Model: Vekt 15 s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	3260	3260	0,64	0,430
Error	30	152898	5097		
Total	31	156158			

General Linear Model: Vekt 25 s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	18331	18331	1,20	0,282
Error	30	457769	15259		
Total	31	47610			

General Linear Model: Levervekt s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	3,944	3,944	0,17	0,679
Error	29	653,913	22,549		
Total	30	657,857			

General Linear Model: Bredde l s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	0,1995	0,1995	0,61	0,443
Error	26	8,5277	0,3280		
Total	27	8,7271			

General Linear Model: Bredde s s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	0,00237	0,002374	0,01	0,936
Error	26	9,33477	0,359030		
Total	27	9,3371			

General Linear Model: Kekktest s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	83,8	83,78	0,06	0,803
Error	26	34349,2	1321,12		
Total	27	34433,0			

General Linear Model: Forinntak s/a versus Sitronsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sitronsyre vs ammoniumklorid	1	468	468,2	0,03	0,868
Error	30	497190	16573,0		
Total	31	497658			

General Linear Model: Vekt 9 f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	5751	5751	1,89	0,179
Error	31	94267	3041		
Total	32	100018			

General Linear Model: Vekt 15 f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	30868	30868	9,54	0,004
Error	31	100272	3235		
Total	32	131140			

General Linear Model: Vekt 25 f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	118564	118564	10,83	0,002
Error	31	339340	10946		
Total	32	457904			

General Linear Model: Levervekt f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	33,09	33,09	3,05	0,091
Error	30	325,81	10,86		
Total	31	358,89			

General Linear Model: Bredde l f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	0,5333	0,5333	3,06	0,091
Error	28	4,8733	0,1740		
Total	29	5,4067			

General Linear Model: Bredde s f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	0,4320	0,4320	2,32	0,139
Error	28	5,2200	0,1864		
Total	29	5,6520			

General Linear Model: Kekktest f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	4692	4692	3,28	0,081
Error	28	40072	1431		
Total	29	44763			

General Linear Model: Forinntak dag 9-25 f/a versus Fosforsyre vs ammoniumklorid

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Fosforsyre vs ammoniumklorid	1	122003	122003	12,29	0,001
Error	31	307772	9928		
Total	32	429775			

Vedlegg 5

Alle prøvene som ble tatt under forsøket. Enzymene ble utelatt da de var markører for leverskade noe som ikke ble påvist under forsøket eller av prøveresultatene.

Tabell 12: a,b,c,d Utgjør signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom gruppene hvis bokstavene er ulike. Om bokstavene er like mellom gruppene så vil dette tilsi at det ikke er en signifikant forskjell mellom dem.

	Vann		Sitronsyre		Fosforsyre		Ammoniumklorid	
	Gjn	SE	Gjn	SE	Gjn	SE	Gjn	SE
Vekt dag 9	358 ^{a,b}	4.36	305 ^c	13.55	364 ^b	8.14	338 ^{a,b,c}	17.83
Vekt dag 15	691 ^a	9.21	632 ^b	20.54	713 ^a	13.38	652 ^b	14.67
Vekt dag 25	1364 ^a	26.33	1239 ^b	33.01	1407 ^c	22.95	1287 ^{a,b}	28.60
Levervekt	38.05 ^b	0.94	35.79 ^{a,b}	1.50	37.11 ^{a,b}	0.88	35.08 ^a	0.72
Diameter lårben (minst)	7.55	0.08	7.47	0.17	7.57	0.09	7.30	0.11
Diameter lårben (Stor)	8.30	0.09	8.24	0.18	8.46	0.10	8.22	0.11
Kraft (N)	217.0 ^a	6.63	196.5 ^{a,b}	8.38	218.0 ^{a,b}	8.99	193.0 ^b	9.65
Total forinntak	1337 ^{a,b,c}	26.65	1256 ^a	35.74	1386 ^b	20.76	1264 ^{a,c}	28.19
Kolestrol	4.43 ^{a,b,c}	0.08	4.54 ^a	0.11	4.25 ^b	0.08	4.23 ^{b,c}	0.09
Triglyserider	1.30 ^{a,b,c}	0.07	1.37 ^a	0.08	1.15 ^b	0.05	1.13 ^{b,c}	0.06
ASAT	307 ^a	9.76	293 ^{a,b}	10.60	290 ^{a,b}	12.29	272 ^b	11.35
LD	2785 ^{a,c}	105.47	2665 ^{a,b,c}	118.17	2753 ^c	93.75	2317 ^b	183.51
CK	9070	804.23	6763	698.23	8749	1089.32	7269	841.18
Urinsyre	489	15.64	461	27.81	443	19.09	443	25.86
Albumin	14.8 ^{a,c}	0.32	14.9 ^{a,c}	0.47	14.1 ^{a,b,c}	0.18	13.7 ^b	0.35
Natrium	157.0 ^a	0.50	154.5 ^{b,c,d}	1.20	154.1 ^{b,c,d}	0.61	154.7 ^{b,c,d}	0.90
Strøkkvalitet	Bra strø		Bra strø		Bra strø		Mørk strø	
Tarmutseende	2.09	0.08	2.00	0.16	2.19	0.13	2.06	0.14

Vedlegg 6

Utrekning av vekt fosforsyre blandet inn i vannløsning:

$$\frac{0,013 M * 0,00017 l}{1 l} = 2,2 * 10^{-6} M$$

$$2,2 * 10^{-6} mol * 98 \frac{g}{mol} = 0,00021 g$$

0,00021 g fosforsyre * 4,4 l drikket løsning pr. kylling = 0,95 mg fosforsyre igjennom hele forsøket.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no