

3.3.3 Milchparameter

Die Milchmengenerfassung im Melkstand wurde elektronisch gesteuert mit anschließender Datenspeicherung im Rechner. In jeder Versuchsperiode wurden 6 Milchproben gezogen und vom Milchprüfing Baden-Württemberg mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie auf Fett-, Eiweiß-, Harnstoff-, Laktosegehalt und zusätzlich die Zellzahl untersucht. Die Menge an Fett-Eiweiß-korrigierter Milch (FECM) wurde anhand der Formel nach MEYER et al. (1993) berechnet:

$$\text{FECM (kg)} = [0,37 \times \text{Fett (\%)} + 0,21 \times \text{Eiweiß (\%)} + 0,95] / 3,1 \times \text{Milchmenge (kg)}$$

3.3.4 Erfassung der Kauaktivität

3.3.4.1 Grassilage-Versuch

Im GS-Versuch wurde die Kauaktivität mittels eines stationären Kauaktivitätsmessungssystems an allen vier pansenfistulierten Kühen ermittelt. Die Untersuchungen wurden mit jeweils zwei Tieren parallel an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Datenerhebung und das Auswertungsprogramm basierten auf der am Hohenheimer Institut entwickelten Technik von SUSENBETH et al. (1998, 2004). Die Messung erfolgte über einen geschlossenen Luftschlauch aus weichem Silikon, der an einem flexiblen Nylonhalter befestigt wurde. Der Schlauch verlief unterhalb des Tiermaules über den gesamten Unterkieferriemen entlang einer Seite bis zum Genickriemen. Oberhalb des Genickriemens wurde der Luftschlauch in ein Kupplungsstück mit Drehgelenk geführt, ein Abknicken wurde dadurch verhindert.

Der durch die Kaubewegungen des Tiermauls erzeugte Luftwiderstand wurde als Impuls über den Silikonschlauch an die Messeinheit weitergeleitet und gespeichert. Ein Computer zeichnete jeden Kauschlag auf, so dass sowohl die Kauzeit als auch die Kauschläge erfasst wurden. Die so erfassten Daten wurden anschließend mit einem speziell dafür entwickelten Programm ausgewertet, welches mit den folgenden Bedingungen arbeitete:

- Die Kauzeit wurde als eine Zeitspanne zwischen zwei Impulsen definiert, die weniger als 10 sec beträgt.

- Für die Kauschläge wurde eine Zeitspanne von 4 sec definiert, in der mindestens zwei Impulse erfolgen.
- Ein Bissen ergab sich aus mehr als 10 Kauschlägen.
- Eine Pause zwischen den Bissen wurde definiert, wenn innerhalb von 4 sec kein Bissen erfolgt.
- Wiederkauperioden können durch Darstellung aller Impulse auf dem Bildschirm des Computers erkannt werden, da sich diese als regelmäßig wiederkehrende Serien von Kauschlägen kennzeichnen lassen.

Die folgenden Parameter zur Charakterisierung des Kauverhaltens konnten somit bestimmt werden:

Kauzeit, Wiederkauzeit, Anzahl der Wiederkauschläge, Anzahl der Wiederkauperioden, Anzahl der Bissen während einer Wiederkauperiode sowie Kauschläge pro Bissen.

3.3.4.2 Maissilage-Versuch

Im MS-Versuch wurde die Kauaktivität mittels eines mobilen Kauaktivitätsmessungssystems an sechs Tieren je Versuchsabschnitt parallel ermittelt. Für die Auswertung wurden mindestens drei vollständig aufgezeichnete Tage pro Tier und Versuchsperiode verwendet.

Das Kauverhalten der Kühe wurde anhand eines speziell dafür konstruierten Halfters dokumentiert, welches den Tieren 24 Stunden lang angelegt wurde. Die Kühe konnten sich damit im Laufstall frei bewegen. Zwei Tage vor Beginn der Messperiode wurden die Tiere an das Tragen der Halfter gewöhnt.

Die Messtechnik basiert auf der Methode von SUSENBETH et al. (1998), welche in Hohenheim entwickelt wurde und inzwischen am Institut für Tierernährung in Hohenheim weiterentwickelt wurde. Die Kaubewegungen der Kühe konnten durch einen einseitig geschlossenen Silikonschlauch, der am Unterkieferriemen bis hin zum Genickstück des Halfters befestigt wurde und mit einem Druckluftschalter verbunden war, erfasst werden. Der Druckluftschalter wurde mit einem Datenlogger (Gemini Tinytag Plus Data Logger), welcher ebenfalls am Genickstück angebracht wurde, verkabelt. Durch die Kaubewegungen wurde im Silikonschlauch ein Luftstrom erzeugt, der im Schalter zwei Kontaktfedern aneinanderdrückte und damit einen elektrischen Impuls auslöste. Dieser wurde im Datenlogger gespeichert. Vor jeder Messung wurde der Druckluftschalter mit einem Voltmeter geeicht.

Die im Datenlogger abgespeicherten Daten wurden mit dem Programm Gemini Logger Manager (GLM, Version 2.2) ausgelesen und die Kauaktivität über 24 Stunden graphisch dargestellt. Die charakteristische Impulsfolge der Wiederkaubewegungen wurde visuell ermittelt und die Daten anschließend mit dem Auswertungsprogramm RAP (SCHÄFER, 2003, Rumination Analysis Program, Version 1003) ausgewertet. Das Programm arbeitete mit folgenden Grundeinstellungen:

- Länge des Messintervalls 6 sec.
- „Count Limit“, Höchstzahl der Kauschläge in einem Messintervall 9
- Mindestanzahl der Kauschläge pro Bolus 15
- „Pause Threshold“, Zeit zwischen Abschlucken eines Bolus und Rejektion 6 sec.

Als auszuwertende Parameter wurden gesamte Kauzeit, Fresszeit, Wiederkauzeit, Anzahl der Wiederkauschläge, Anzahl der Wiederkauperioden, Anzahl der Bissen während einer Wiederkauperiode, Wiederkauschläge pro Sekunde, Anzahl der Boli pro Wiederkauperiode sowie Wiederkauschläge pro Bissen erfasst.

3.3.5 Bestimmung von NDF- und TM-Abbau der TMR und von deren Komponenten mittels Nylon bag Technik

Im MS-Versuch wurden *in situ* Untersuchungen zum NDF- und TM-Abbau durchgeführt. Um mögliche Effekte der PL auf das Pansenmilieu bzw. das ruminale Abbauverhalten feststellen zu können, wurden in jedem Versuchsabschnitt an vier pansenfistulierten Kühen der NDF- und TM-Abbau von Heu MS, TMR und KF über eine Dauer von 24 Stunden *in situ* ermittelt (HUNTINGTON und GIVENS, 1995). Die *in situ* Messung der zu prüfenden PL wurde jeweils durchgeführt, während die Tiere die entsprechende PL als TMR vorgelegt bekamen. Bei dieser *in situ* Messung sollte nicht der Einfluss der PL der Probe auf die Verdaulichkeit der Probe betrachtet werden, sondern der Einfluss der PL der TMR auf den Pansenfermentationsstatus. Die Änderung des Abbauverhaltens ist somit ein Resultat des veränderten Pansenmilieus.

Zu Versuchsbeginn wurde eine Probe von etwa 3 kg Frischsubstanz aus dem Heu und etwa 0,5 kg aus dem KF entnommen und auf TM- und NDF-Gehalt nach NAUMANN und BASSLER (1997) untersucht. Das Probenmaterial von Heu und KF

wurde in allen vier Versuchsabschnitten verwendet. In jedem Versuchsabschnitt wurden einen Tag vor der *in situ* Messung Proben von je etwa 5 kg FM TMR und MS entnommen, ein Teil davon wurde zur TM- und NDF-Bestimmung weiterverwendet. Während das Heu mit einer Schere auf 10 mm PL zerkleinert wurde, wurden frische MS und TMR in unveränderter (original) PL inkubiert. Die *in situ*-Beutel waren aus Polyester-Monofilament mit einer thermisch versiegelten Naht gefertigt (Ankom rumen sampling bags, Bar Diamond). Die Größe der Beutel betrug $10,5 \times 15$ cm (315 cm^2), und deren Porengröße lag bei etwa $53 \mu\text{m}$. Für jedes Substrat wurden 3 Parallelen mit jeweils 12 mg TM/cm^2 Nylonbeutel (Einwaage pro Beutel FM: MS 10 g, TMR 8,5 g, Heu 4 g, KF 5 g) eingewogen. Die *in situ*-Beutel wurden eine Stunde vor der Morgenfütterung an einem Gewicht in den ventralen Pansen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Nach der Entnahme aus dem Pansen wurden die Beutel sofort auf Eis gelagert und umgehend eingefroren, um die Fermentationsvorgänge zu stoppen. Nach zwei Tagen wurden die Beutel aufgetaut und unter fließendem Wasser gereinigt. Darauf folgend wurden die Proben in einer Waschmaschine 3×12 min mit kaltem Wasser gewaschen. Die Ermittlung der TM-Verluste erfolgte durch 48-stündiges Trocknen in einem Umlufttrockenschrank bei 60°C und anschließendes Zurückwiegen. Die in den Beuteln verbliebenen Probenreste der Substrate wurden auf ihren NDF-Gehalt analysiert (VAN SOEST, 1991). Der Prozentsatz der verschwundenen TM und NDF wurde durch Berücksichtigung des nach der Inkubation noch in den Beuteln verbleibenden Anteils berechnet.

3.3.6 Bestimmung der Partikel- und Flüssigkeitspassage

Die Passage der festen Phase wurde mit Hilfe von markierten Heupartikeln, mit Yb als Yb-NDF, bestimmt. Für die Herstellung des Yb-NDF wurde das im Versuch verwendete Heu auf 2 mm gemahlen und die Partikel zwischen 1 - 2 mm ausgesiebt und für die nachfolgende Markierung mit Yb verwendet. Die Bestimmung der Flüssigkeitspassage erfolgte mit $\text{LiCo-EDTA} \times 3\text{H}_2\text{O}$. Die Vorbereitung der Marker wurde nach UDEN et al. (1980) und MAMBRINI & PEYRAUD (1993) durchgeführt.

145 g Yb-NDF und 15 g LiCo-EDTA wurden als „Pulse Dose“ am 11. Tag jedes Versuchsabschnitts vor der Morgenfütterung den Tieren direkt durch die Pansenfistel in den Pansen verabreicht. Der vorher verflüssigte LiCo-EDTA Marker konnte mit Hilfe

eines Schlauches zentral in die Faserschicht fließen, während das Yb-NDF manuell auf die kraniale Fasermatte im Pansen gelegt wurde. Zur Bestimmung des Nullpunktes und als Matrix für die Standardvorbereitung der Yb- und Co-Analyse wurde vor Verabreichung der Marker eine Kotprobe rektal entnommen (MOORE et al., 1992). Die Entnahme der Kotproben (ca. 200 g) begann 4 Stunden nach der Markerverabreichung und erfolgte 7 Tage lang zu folgenden Zeitpunkten (in Stunden nach der Markerverabreichung): 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 52, 56, 60, 72, 84, 96, 104, 108, 120, 128, 132 und 144 Stunden. Die Proben wurden 72 Stunden lang bei 60°C getrocknet und anschließend auf 1 mm gemahlen.

Zur Analyse der Yb- und Co-Konzentration im Kot wurden 0,5 g des getrockneten Materials in 50 ml PTFE-Auflösungsgefäße eingewogen und nach Zugabe von 5 ml konzentrierter Salpetersäure (65 % suprapur, Fa. Merck) bei 180°C über 265 Minuten in einer Druckauflösungsapparatur nach TÖLG aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Gefäße geöffnet und etwa 30 Minuten auf einer Heizplatte bei 50°C abgeraucht, um die beim Aufschluss entstandenen nitrosen Gase zu entfernen. Die Aufschlusslösungen wurden in 50 ml Messkolben überführt und mit 1 ml einer 10 %-igen KCl (p.a. Fa. Merck) versetzt und anschließend bis zur Markierung mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Durchmischen der Proben wurden diese über einen Trichter mit Faltenfilter (Fa. Macherey & Nagel, Ø 15 cm, No 615 ¼) in 50 ml Plastikgefäße zur Aufbewahrung filtriert. Die Messung der Yb- und Co-Konzentration erfolgte am Atomabsorptions-Spektrometer (Spectra AA, Varian, 220 FS) durch eine oxidierende Luft-Acetylen-Flamme gegen Standard mit Kotmatrix (Yb = 398,8 nm, Co = 240,7 nm) (Tafaj et al., 2001a).

Die Passageparameter wurden mit dem Statistikprogramm SAS (2001) mit der Option PROC NLIN (Iterative Marquardt Methode) analysiert und nach einem Modell von MOORE et al. (1992) berechnet. Das Modell beinhaltet folgende Parameter:

- k_s : fraktionelle Passagerate im ersten Kompartiment mit langsamer Passage (Pansen, Haube)
- k_f : fraktionelle Passagerate im zweiten Kompartiment mit rascher Passage (post ruminal)
- TD: Zeitverzögerung, Zeit zwischen der Markereingabe und erstem Auftreten des Markers im Kot.
- RMRT: mittlere Verweilzeit im Pansen, = $1/k_s$.
- FMRT: mittlere Verweilzeit im postruminalen Verdauungstrakt, = $1/k_f$.

- TMRT: mittlere Verweilzeit im gesamten Verdauungstrakt,
= RMRT + FMRT + TD.

3.3.7 Erfassung des Pansenvolumens

Im GS-Versuch wurde den drei fistulierten Kühen der Panseninhalt über die Pansenfistel manuell ausgeräumt und während der Entleerung in einem isolierten und auf 38°C vorgewärmten Kunststofffass gesammelt. Der gesamte Panseninhalt, der Anteil der festen Digesta und der schöpfbaren Flüssigkeit wurde nach der Pansenentleerung erfasst (ROBINSON et al., 1987). Während der Entnahme wurden repräsentative Teilproben entnommen, zu einer Sammelprobe zusammengeführt und für die Nasssiebung bei - 21°C gelagert.

3.3.8 Messung der Partikelgrößenverteilung und Kinetik der Digesta

Die Kinetik der Partikel im Reticulorumen wurde definiert als der zeitliche Ablauf der Digestazusammensetzung unter Einwirkung wichtiger Einflussfaktoren (Zerkleinerungsrate, Wasserbindungskapazität, Viskosität, funktionelle spezifische Dichte, Integration in der Matte, mikrobieller Abbau und Passagerate).

Die Digestaprobe wurden den Kühen im GS-Versuch eine Stunde vor (-1 h) sowie sieben Stunden (7 h) und 11 Stunden (11 h) nach der Morgenfütterung bzw. im MS-Versuch eine Stunde vor (- 1 h), zwei Stunden (2 h), sieben Stunden (7 h) und 10 Stunden (10 h) nach der Morgenfütterung entnommen.

Die Probenahmetechnik erfolgte nach der Methode von TAJAJ et al. (2001) in zwei Digestaschichten, im dorsalen und im ventralen Bereich des Pansens (5 bis 10 cm unterhalb der Oberfläche der Fasermatte bzw. 5 bis 10 cm über dem Pansengrund). Da die entnommene Digestaprobe keine freie Flüssigkeit enthalten sollte, wurde die Probe direkt nach der Probenahme in einen Büchner-Trichter ($\varnothing = 200$ mm, Porenweite 0,064 mm) gegeben. Dieser wurde an eine Vakuumpumpe (Saugleistung 4 m³/h) angeschlossen und die freie Flüssigkeit für 10 min abgesaugt. Zunächst wurde ein Teil der Digestaprobe (ca. 120 g FM) für die TM-Bestimmung verwendet. Ein anderer Teil der Digestaprobe (ca. 150 g) wurde für die später folgende Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bei - 21°C eingefroren. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung in der festen Phase des Panseninhaltes als auch im Kot erfolgte mittels Nasssiebmethode nach LECHNER-DOLL (1986). Das

Probenmaterial wurde über eine Siebkaskade von 7 Sieben mit abnehmender Porengröße gesiebt. Hierzu stand eine Laborsiebeeinheit mit Nasssiebeeinrichtung (Analytical Sieve Shakers, Fa. Kurt Retsch GmbH & Co KG, Haan, Typ AS 200 Digit) zur Verfügung. Die Siebe hatten einen Durchmesser von 200 mm und eine Höhe von 50 mm. Die Siebporen waren quadratisch angeordnet mit einer Kantenlänge von 6,0; 4,0; 2,0; 1,18; 0,5; 0,125 und 0,063 mm. Von den aufgetauten Proben wurden pro Doppelbestimmung genau 40 g pro Parallele abgewogen, mit 400 ml destilliertem Wasser versetzt und eine Stunde eingeweicht. Nach dem Einweichen wurde jede Probe auf das oberste Sieb gebracht und für 12 Minuten, bei einem Wasserdurchlauf von ca. 2,9 l/min und einer Schwingungsamplitude von zwei, nass gesiebt. Eine standardisierte Sprüheinheit besprühte dabei das oberste Sieb mit Wasser, um eine gleichmäßige Wasserverteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die einzelnen Siebrückstände mit Hilfe von destilliertem Wasser in Faltenfilter (No 595 ½, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) überspült, deren Tara-Gewicht zuvor bestimmt wurde. Die Faltenfilter wurden für 24 Stunden bei 80°C getrocknet und nach einer Abkühlzeit von 12 Stunden zurückgewogen.

Die prozentuale Verteilung der retinierten Partikel auf den einzelnen Siebböden berechnete sich durch Division der retinierten Trockenmasse auf den einzelnen Sieben durch die Trockenmasse der Siebeeinwaage. Ein Mittelwert wurde aus den beiden Teilproben bestimmt. Die Masse der retinierten Trockensubstanz aller Siebböden, zusammen in Prozent der Trockenmasse der Siebeeinwaage ausgedrückt, als Differenz von 100, ergab den Anteil der löslichen Fraktion (< 0,063 mm) in Prozent. Des Weiteren erfolgte eine Zusammenfassung der retinierten Masse von bestimmten Siebfraktionen:

- Grob: retinierte Partikel auf Sieb 6,0; 4,0; 2,0 und 1,18 mm (> 1,18 mm).
- Fein: retinierte Partikel auf Sieb 0,5; 0,125 und 0,063 mm (> 0,063 – < 1,18 mm).
- Lösliche Fraktion: Flüssigkeit und feinste Stoffe, die das Sieb 0,063 mm passieren (< 0,063 mm).