

**INSTITUT FÜR TIERWISSENSCHAFTEN,
ABTEILUNG TIERERNÄHRUNG,
DER RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN**

**Untersuchungen *in vitro* zum Phosphor-Bedarf von
Mikroorganismen im Pansen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt am 19. April 2005

von Dipl.-Ing. agr. Johanna Wider
aus Troisdorf

Referent: Prof. Dr. Ernst Pfeffer

Korreferent: Prof. Dr. Karl Schellander

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2005

Johanna Wider (2005):

Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Tierernährung, Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn, 122 Seiten

Es wurden drei Versuche durchgeführt mit dem Ziel der Ableitung des P-Bedarfs von Pansenmikroorganismen.

In einem ersten Versuch wurden Bakterien aus flüssigem (LAB) und strukturiertem (SAB) Panseninhalt von Schafen isoliert. Die Bestimmung des N:P-Verhältnisses in LAB und SAB insgesamt und in deren Fraktionen Fett, Protein und Rest sollte Rückschlüsse auf den P-Nettobedarf der Pansenbakterien ermöglichen. Das N:P-Verhältnis lag bei den LAB bei 4,30 und bei den SAB bei 5,56. Daraus lässt sich ein P-Nettobedarf ableiten, der unter der Annahme eines mikrobiellen Proteinwachstums von 156 ± 24 g pro kg verdaulicher organischer Substanz (DOS; GfE 2003; 2001) auf 5,4 – 5,8 g/kg DOS für die LAB und 4,1-4,3 g/kg DOS für die SAB geschätzt wird. In den Fraktionen zeigte sich das weiteste N:P-Verhältnis in der Fraktion Protein (LAB 13,6; SAB 12,1). Das engste N:P-Verhältnis wurde in der Fraktion Rest bestimmt (LAB 0,55; SAB 0,83).

In Versuch II und III wurde der P-Bedarf unter dynamischen Bedingungen für das mikrobielle Wachstum und die mikrobielle Fermentationsleistung untersucht. Im Langzeitinkubationssystem RUSITEC (Versuch II) leitete sich aus der Verwendung von Pufferlösungen mit unterschiedlichen P_a -Konzentrationen (zwischen 17,5 und 0 mmol P_a /L) ein P-Bedarf von kleiner 0,73 mmol P_a /L Fermenterinhalt ab.

In Versuch III wurde mittels modifiziertem Hohenheimer Futterwerttests geprüft, ob der P-Bedarf für die mikrobielle Fermentationsleistung beim Abbau von Cellulose, Pektin oder Stärke nach 24 h unterschiedlich ist. Als Starterkultur diente der Überlauf eines RUSITEC-Versuches, der durch die Kombination mit Pufferlösungen unterschiedlicher P_a -Konzentrationen zu drei P-Stufen zwischen 3,84 und 0,90 mmol P_a /L Inkubationsgemisch führte. Die Synthese der VFA C_2 - C_5 aus dem Abbau von Cellulose bzw. Pektin wurde bereits bei einer P_a -Konzentration von 2,29 mmol/L bzw. 0,90 mmol/L Inkubationsmedium eingeschränkt. Die Gasbildung wurde bei allen Futtermitteln bei einer P-Stufe von 0,90 mmol P_a /L reduziert. Damit ist anzunehmen, dass zum Abbau von Cellulose und Pektin eine höhere P-Versorgung notwendig ist.

Johanna Wider (2005):

Institut for Animal Science, Department of Animal Nutrition, University of Bonn, 122 pages

Three experiments were conducted to estimate the Phosphorus (P) requirements of rumen microorganisms.

In experiment I liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria were isolated from the rumen of sheep. The N to P ratio of each of these microorganism types was determined and used to derive a daily P net requirement of 5,4 - 5,8 g P/kg digestible organic matter (DOS) for LAB and of 4,1 - 4,3 g P/kg DOS for SAB. This estimate is based on a production rate of 156 ± 24 g microbial protein ($N \cdot 6,25$) per kg of digestible organic matter (source: GfE 2003, 2001). Additional LAB and SAB were chemically separated into their fractions - lipids, protein and residuals - and the N to P ratio in the single fractions were analysed. The N to P ratio in the fraction protein was 13,6 for LAB and 12,1 for SAB, in the lipid fraction 1,09 for LAB and 1,55 for SAB and in the fraction residuals 0,55 and 0,83. It seems that the P containing compounds in LAB and SAB are different.

The efficiency of fermentation and growth were used to estimate P requirements under dynamic conditions. In experiment II different P concentrations in the buffer solution of long term rumen simulation techniques (RUSITEC) resulted in a P requirement of $< 0,73$ mmol/L, whereas the microbial growth was estimated by the use of ^{15}N as a marker. In experiment III a batch culture was used to assess if cellulolysis, amylolysis or pectinolysis require a different P supply. The overflow from RUSITEC were used as inoculum of Hohenheimer Futterwerttest (HFT). Cellulose, potato starch and pectin were used as substrates and incubated for 24 h. Three different P levels were tested (3,84 - 0,90 mmol P_a/L). Synthesis of volatile fatty acids (C_2-C_5) were reduced by lower P levels, but only after incubation of cellulose and pectin (cellulose 2,29 mmol/L; pectin 0,90 mmol/L). Incubation of starch had an adverse effect. Gas production after 24 h dropped down with a P supply of 0,90 mmol P_a/L , independent of substrate. It seems that the P requirements for cellulolysis and pectinolysis are higher than for the degradation of starch.

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Besonderheiten des P-Umsatzes bei Wiederkäuern	3
2.2	Mikroorganismengemeinschaft im Pansen.....	5
2.3	Chemische Zusammensetzung der Mikroorganismen.....	7
2.3.1	Stickstoffgehalt bzw. Proteingehalt.....	8
2.3.2	Fett-Gehalt	9
2.3.3	Kohlenhydrat-Gehalte.....	10
2.3.4	Rohasche-Gehalt.....	10
2.3.5	Einflüsse auf die chemische Zusammensetzung von Pansenbakterien ..	11
2.3.6	Mineralstoffgehalte in den Mikroorganismen	13
2.4	P-Bedarf der Pansenmikroorganismen	15
2.4.1	Ableitung des P-Bedarfs aufgrund des N:P-Verhältnisses	15
2.4.2	Ableitung des P-Bedarfs aus Untersuchungen <i>in vitro</i>	16
3	MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1	Versuch I: Fraktionierung der Pansenmikroben.....	26
3.1.1	Gewinnung der Referenzmikroben	26
3.1.2	Analysen.....	30
3.2	<i>In vitro</i> Versuche	37
3.3	Versuch II: Rumen Simulation Techniques (RUSITEC).....	38
3.3.1	Bedienung	39
3.3.2	Versuchsaufbau und -durchführung	40
3.3.3	Probenaufbereitung und Analytik.....	43
3.3.4	Berechnungen	48
3.3.5	Statistik.....	50

3.4	Versuch III: Hohenheimer Futterwerttest.....	51
3.4.1	Gestaltung des RUSITEC-Versuches	51
3.4.2	Versuchsaufbau und -durchführung.....	53
3.4.3	Probenaufbereitung und Analytik	56
3.4.4	Berechnungen.....	56
3.4.5	Statistik	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Versuch I: Fraktionierung der Pansenmikroorganismen	57
4.1.1	Gewinnung der Referenzmikroben	57
4.1.2	Ergebnisse der Analysen	57
4.2	Versuch II: RUSITEC.....	60
4.2.1	Ergebnisse der Analysen der Fermenterproben	60
4.2.2	Ergebnisse der Analysen der Überlaufproben	61
4.2.3	Ergebnisse der Analysen der Residuen.....	62
4.2.4	Ergebnisse der Analysen der Referenzmikroben.....	64
4.3	Versuch III: HFT aus RUSITEC-Überlauf.....	67
4.3.1	P _a -Konzentration des Inkubationsmedium	67
4.3.2	Einfluss von Futtermittel und P _a -Konzentration auf die Gasbildung und Produktion flüchtiger Fettsäuren	67
5	DISKUSSION	71
5.1	Fraktionierung der Pansenmikroorganismen	71
5.1.1	Fehlerbetrachtung.....	71
5.1.2	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben	73
5.2	Rumen Simulation Technique	80
5.2.1	Fehlerdiskussion	80
5.2.2	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben	82

5.3	Hohenheimer Futterwerttest.....	90
5.3.1	Fehlerdiskussion.....	90
5.3.2	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben	91
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	95
7	TABELLENANHANG	98
7.1	Fraktionierung der Pansenmikroorganismen	98
7.2	Rumen Simulation Technique (RUSITEC)	98
7.3	Hohenheimer Futterwerttest.....	101
8	LITERATURVERZEICHNIS	107

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: N-Gehalte von LAB und SAB in der Literatur	9
Tabelle 2: Übersicht über die in Langzeitinkubationssystemen verwendeten Rationen bei variiertem P-Versorgung über die Pufferlösung.....	21
Tabelle 3: Zusammensetzung der Futtermischung.....	41
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen.....	43
Tabelle 5: GC-Bedingungen	46
Tabelle 6: Rationszusammensetzung (g/d) mit entsprechendem N-Gehalt in mg N/d	52
Tabelle 7: P-Gehalte der Futterkomponenten	53
Tabelle 8: P-Gehalte der inkubierten Futtermittel	53
Tabelle 9: Überlauf : Puffer-Verhältnis, P_a -Konzentration der verwendeten Pufferlösungen und kalkulierte Endkonzentration des Inkubationsmediums	54
Tabelle 10: Gehalt an Rohprotein, Fett und Rohasche.....	57
Tabelle 11: P-Gehalt der Referenzmikroben.....	58
Tabelle 12: N-Gehalt der Referenzmikroben	59
Tabelle 13: Ergebnisse der Fermenterproben	64
Tabelle 14: Produktion der flüchtigen Fettsäuren C_2-C_5	65
Tabelle 15: Nährstoffabbau aus dem inkubierten Futter	66
Tabelle 16: P_a -Konzentration des Inkubationsmediums	67
Tabelle 17: Gasbildung nach 24 h	70
Tabelle 18: Flüchtige Fettsäuren C_2-C_5	70
Tabelle 19: Ableitung des P-Bedarfs aus dem N : P-Verhältnis in den LAB und LAB-Fraktionen	77
Tabelle 20: Ableitung des P-Bedarfs aus dem N:P-Verhältnis in den SAB und SAB-Fraktionen	77
Tabelle 21: N : P-Verhältnis in der Literatur und abgeleiteter P-Bedarf	78
Tabelle 22: Absenkung der P-Konzentration <i>in vitro</i> : Auswirkung auf Umgebungsmedium, Fermentation und Proteinsynthese.....	84

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Gemessene P-Konzentration im Pansensaft in Abhängigkeit von der P-Aufnahme mit dem Futter	4
Abbildung 2: Isolierungsschema der Referenzmikroben	29
Abbildung 3: Bild der modifizierten Soxhlet-Henkel-Anlage (Institut für Lebensmittelchemie; Universität Bonn)	33
Abbildung 4: Analysenschema zur Bestimmung der P- und N-Gehalte	36
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines RUSITEC-Fermenters	39
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Verlaufs Versuch II-RUSITEC	42
Abbildung 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs Versuch III- HFT	54
Abbildung 8: P-Abbau aus dem Futter (%) in Sammelphase 1 und 2	63

Tabellen im Anhang:

Tabelle A 1:	Bezugsquellen der Mikroorganismen	98
Tabelle A 2:	Spuren- und Vitaminvormischung aus Versuch II (RUSITEC).....	98
Tabelle A 3:	Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 1, Sammelphase 1.....	99
Tabelle A 4:	Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 1, Sammelphase 2.....	99
Tabelle A 5:	Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 2, Sammelphase 1.....	100
Tabelle A 6:	Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 2, Sammelphase 2.....	100
Tabelle A 7:	Komponenten des Kraftfutters im RUSITEC-Versuch (Versuch III)	101
Tabelle A 8:	Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Versuch A und Versuch B.....	101
Tabelle A 9:	Mittelwertsvergleich (SNK-Test) der Futtermittel bei signifikantem F-Wert.....	102
Tabelle A 10:	Mittelwertsvergleich (SNK-Test) der P_a -Konzentration im Inkubationsmedium bei signifikantem F-Wert.....	102
Tabelle A 11:	Multipler Mittelwertsvergleich - Gasbildung nach 8 h.....	103
Tabelle A 12:	Multipler Mittelwertsvergleich - Gasbildung nach 24 h.....	103
Tabelle A 13:	Multipler Mittelwertsvergleich – Essigsäure	103
Tabelle A 14:	Multipler Mittelwertsvergleich – Propionsäure.....	104
Tabelle A 15:	Multipler Mittelwertsvergleich – Buttersäure	104
Tabelle A 16:	Multipler Mittelwertsvergleich – Valeriansäure.....	104
Tabelle A 17:	Multipler Mittelwertsvergleich - VFA Gesamt (C_2 - C_5).....	104
Tabelle A 18:	Gasbildung nach 8 h (mL)	105
Tabelle A 19:	Mittelwert und Standardabweichung der flüchtigen Fettsäuren in $\mu\text{mol}/200\text{ mg}$ Einwaage von Versuch A	105
Tabelle A 20:	Mittelwert und Standardabweichung der flüchtigen Fettsäuren in $\mu\text{mol}/200\text{ mg}$ Einwaage von Versuch B	106

Abkürzungsverzeichnis:

Neben den Abkürzungen für Einheiten des Internationalen Einheitensystems und den Symbolen für chemische Elemente wurden folgende Abkürzungen verwendet.

ADF	Saure Detergentienfaser
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Deionisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
CCS	Continuous Culture System
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOS	Verdauliche Organische Substanz
edt. / eds.	editor / editors
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
IAEA	International Atomic Energy Agency
IE	Internationale Einheiten
LAB	Liquid Associated Bacteria
LAB-N	Stickstoff in LAB
Lsg.	Lösung
ME	Umsetzbare Energie
min	Minute
MW	Mittelwert
NDF	Neutrale Detergentienfaser
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff
OS	Organische Substanz
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P_a	Anorganisches Phosphat
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-N	N in der RNA
RUSITEC	Rumen Simulation Technique
SAB	Solid Associated Bacteria
SAB-N	Stickstoff in SAB
SD	Standardabweichung
T	Trockenmasse
TCA	Trichloressigsäure
u.a.	unter anderem
VFA	Flüchtige Fettsäuren (volatile fatty acids)
vgl.	vergleiche
vs.	gegenüber
XP	Rohprotein (N*6,25)
Y_{ATP}	Ertragskoeffizient des mikrobiellen Wachstums (g Zelltrockenmasse/Mol ATP)

1 Einleitung

Im letzten Jahrzehnt ist die Empfehlung zur Versorgung der Wiederkäuer mit Phosphor (P) herabgesetzt worden. Vergleicht man die Empfehlungen für eine Kuh in der Laktation (600 kg Lebendmasse, 30 kg Milch/d) von 1978 bzw. 1986 (GfE) mit den Empfehlungen von 1993 (GfE), so bedeutet dies eine Reduzierung der empfohlenen Versorgung von rund 20 %. Die Reduzierung der Versorgungsempfehlungen an P beruhte auf einer genaueren Kenntnis des tatsächlichen P-Bedarfs der laktierenden Wiederkäuer, die u.a. mittels faktorieller Bedarfsermittlung über die Jahre hinweg gesammelt wurden. Faktorielle Bedarfsermittlung bedeutet dabei, dass die Menge des entsprechenden Elements in den verschiedenen „Produkten“ (Ansatz während des Wachstums, intrauterine Einlagerungen, Milch) und in den unvermeidlichen Verlusten, d.h. den Verlusten mit den Faeces, die weder auf Homöostase noch auf nicht-abgebautes Futter zurückzuführen sind, zu einem Nettobedarf addiert werden. Die tatsächlich benötigte Menge des Elements im Futter ergibt sich dann als Bruttobedarf aus dem Nettobedarf und der Verwertbarkeit des Elements im Futter, also dem Anteil, der maximal in den Produkten oder als unvermeidliche Verluste erscheint (GfE, 2003; 2001; MÜSCHEN et al., 1988). Eine erweiterte Datengrundlage bezüglich unvermeidlicher Verluste, die seit 1993 (GfE) nicht mehr auf die Lebendmasse sondern auf die Futteraufnahme bezogen werden, sowie Versuchsergebnisse, die auf eine bessere Verwertbarkeit des Futter-P in Höhe von 70 % (GfE, 1993) statt 60 % (GfE 1978, 1986) schließen lassen, führten zu der oben genannten Reduzierung. Die geänderten Versorgungsempfehlungen der GfE von 1993 wurden in der Neuauflage der Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder (GfE) 2001 übernommen und sind in Teilen in die Empfehlungen des amerikanischen National Research Council (2001) eingeflossen.

Neben den von der GfE (2001) genannten „Produkten“ Ansatz, Föten und Milch könnte der Bedarf der im Vormagen mit dem Wiederkäuer symbiontisch lebenden Mikroorganismen als weitere Teilsumme des Nettobedarfs angesehen werden. So wird für Schwefel (S), der in Form von Sulfid im Vormagen vorkommt und beim Abbau und Einbau von S in schwefelhaltige Aminosäuren des Mikroorganismen-

proteins eine wichtige Rolle spielt (DURAND et al., 1986b; SMITH, 1984) von der GfE (2001) ausdrücklich eine Versorgungsempfehlung erwünscht, die aber aufgrund der ungenügenden experimentellen Datenlage bisher nicht gegeben werden kann (GfE, 2003). Von verschiedenen Autoren, die Auswirkungen einer nicht bedarfsdeckenden Versorgung an P an Schafen und Ziegen untersuchten, wird häufig angeführt, dass die beobachteten Reaktionen, wie der Rückgang der Futteraufnahme und der Verdaulichkeit der organischen Substanz und die geringere mikrobielle Effizienz, ursächlich auf einen P-Mangel der Mikroorganismen zurückzuführen seien (PAUEN, 1990; PETRI, 1987; BREVES und HÖLLER, 1987; BREVES, 1985; DURAND et al., 1982). Ziel der eigenen Untersuchung war es, den mikrobiellen P-Bedarf anhand der P-Gehalte in mikrobiellem Protein und Fett und in mikrobiellen Kohlenhydraten abzuleiten und durch den P-Bedarf zu ergänzen, der sich aufgrund von *in vitro* Untersuchungen aus der mikrobiellen Fermentations- und Wachstumsleistung ergibt.

2 Literaturübersicht

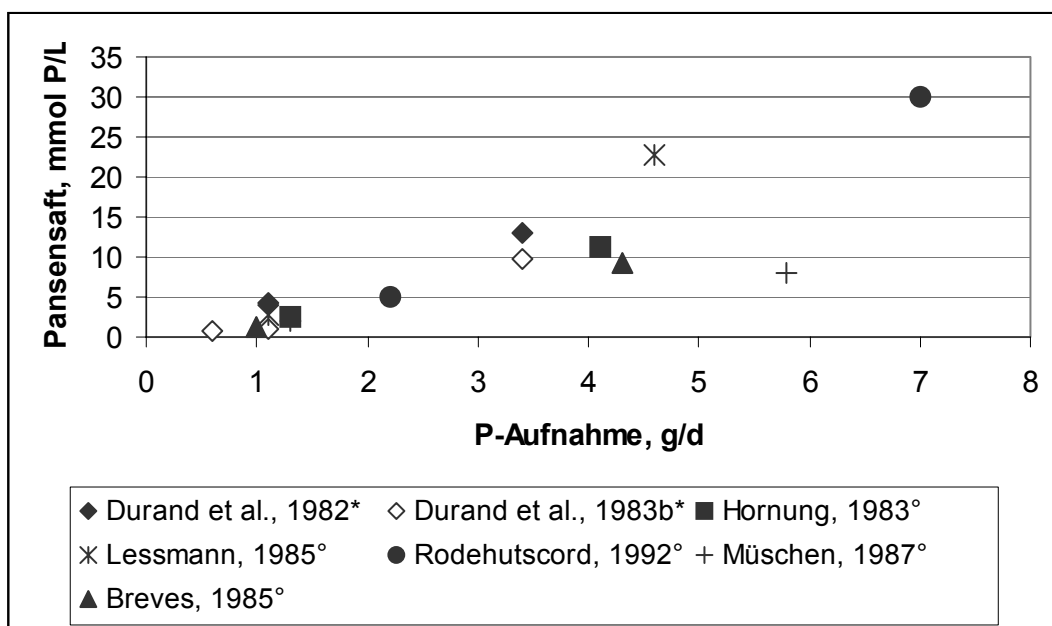
2.1 Besonderheiten des P-Umsatzes bei Wiederkäuern

Pflanzen machen etwa die Hälfte der gesamten Biomasse der Erde aus. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Evolution zu Tieren geführt hat, die in der Lage sind, sich die in diesen Pflanzen gespeicherte Sonnenenergie zunutzezumachen. Säugetiere verfügen nicht über die enzymatische Ausstattung, die Strukturkohlenhydrate der Pflanzenzellwände (Cellulose, Hemicellulosen, Pektin), in denen ein großer Teil der Energie gebunden ist, abzubauen. Der Wiederkäuer als reiner Pflanzenfresser ist daher auf Mikroorganismen angewiesen, die diese Nährstoffe für ihn nutzbar machen. Die Anpassung des Wiederkäuers vollzog sich mit der Entwicklung eines vierhöhligen Vormagensystems (Pansen, Netz-, Blätter- und Labmagen), in dem der Pansen als Gärkammer fungiert. Damit wird den Bedürfnissen der Mikroorganismen nach einem wässrigen Milieu mit recht konstantem pH-Wert, gleich bleibender Temperatur, Zufuhr von Nährstoffen, Abfluss von Fermentationsendprodukten und Zeit zur Besiedlung der strukturierten Nährstoffe (Futter) entsprochen (STEWART, 1991). Die Mikroorganismen bauen einen Teil der pflanzlichen Nährstoffe zu flüchtigen Fettsäuren, mikrobieller Zellmasse, Gasen und Fermentationswärme um. Die flüchtigen Fettsäuren – hauptsächlich Essig-, Propion- und Buttersäure – gelangen über die Pansenwand ins Blut und werden im Intermediärstoffwechsel des Wiederkäuers zur Energieversorgung herangezogen. Die mikrobielle Zellmasse gelangt mit dem Panseninhalt in den Labmagen und wird dort als Proteinquelle vom Wirtstier genutzt. Die entstehende Fermentationswärme und die Gase CO_2 und CH_4 stellen energetische Verluste dar.

Die Anpassung des Wirtstieres hat sich nicht nur rein anatomisch vollzogen, es gibt ebenfalls Besonderheiten des Stoffwechsels, wobei hier nur auf den endogenen Phosphat-Kreislauf des Wiederkäuers eingegangen werden soll. Täglich gelangen große Mengen anorganischer Phosphor-Verbindungen mit dem Speichel in den Vormagen. P dient dort als Bestandteil energiereicher Verbindungen (ATP) und als Puffer ($\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$). Der P aus dem Chymus wird im Dünndarm absorbiert und gelangt ins Blut. Die Speicheldrüsen können den im Blut befindlichen anorganischen

P (P_a) aufkonzentrieren und wieder über den Speichel ins Vormagensystem abgeben. Dabei steht die P_a -Konzentration des Speichels in einem festen Verhältnis zur Plasma- P_a -Konzentration des Blutes (BREVES, 1985; BREVES und HÖLLER, 1989). Ein rationsbedingter P-Mangel führt zu einem Absinken der Plasma- P_a -Konzentration im Blut und damit zu einem geringeren P-Fluss ins Vormagensystem.

Über die Auswirkungen eines P-Mangels auf den Pansenstoffwechsel von Wiederkäuern sind bereits Übersichtsarbeiten erschienen (BREVES und SCHRÖDER, 1991; BREVES, 1991), so dass hier nur zusammenfassend auf die zu erwartenden Auswirkungen einer nicht-bedarfsdeckenden P-Versorgung mit dem Futter eingegangen werden soll. In Abbildung 1 ist die von verschiedenen Autoren gemessene P-Konzentration im Pansensaft in Abhängigkeit von der P-Aufnahme mit dem Futter dargestellt.



* P_a -Konzentration im ultrafiltrierbaren Pansensaft

° Gesamt-P im partikelfreien Pansensaft

Abbildung 1: Gemessene P-Konzentration im Pansensaft in Abhängigkeit von der P-Aufnahme mit dem Futter

Es muss berücksichtigt werden, dass ein direkter Vergleich der Werte (Abbildung 1) nicht uneingeschränkt gilt, da die P-Konzentration nicht im gleich behandelten Pansensaft gemessen wurde und unterschiedliche P-Bestimmungsmethoden zum Einsatz kamen. Deutlich zu erkennen ist, dass die P-Konzentration im Pansensaft

nahezu linear mit der P-Aufnahme (g P/d) der Tiere ansteigt. Bei P-Konzentrationen im Pansensaft, die unter 7 mmol P/L lagen, konnten die Autoren folgende Auswirkungen beobachten:

- Eingeschränkte Futteraufnahme (MÜSCHEN, 1987)
- Absinken der P_a -Konzentration im Blutplasma (RODEHUTSCORD, 1992; PAUEN, 1990; MÜSCHEN, 1987)
- Absinken der P_a -Konzentration im Speichel (RODEHUTSCORD, 1992; BREVES et al., 1987; BREVES, 1985)
- Rückgang der Verdaulichkeit der organischen Substanz (Müschén, 1987)
- Rückgang der Synthese an mikrobiellem Protein (PETRI, 1987; LESSMANN, 1985; BREVES, 1985)
- Rückgang der mikrobiellen Effizienz (PAUEN, 1990; PETRI, 1987; BREVES und HÖLLER, 1987; BREVES, 1985; DURAND et al., 1982)

Dabei kann offensichtlich der physiologische Status der Versuchstiere – Laktation, Wachstum - Höhe und Grad der Auswirkungen eines P-Mangels beeinflussen. Aufgrund einer engen Abhängigkeit der P_a -Konzentration des Speichels mit der des Blutplasmas, liegt es nahe, die beobachtete eingeschränkte mikrobielle Proteinsynthese und Effizienz auf einen P-Mangel der Pansenmikroorganismen zurückzuführen.

2.2 Mikroorganismengemeinschaft im Pansen

Im Panseninhalt der Wiederkäuer findet man Bakterien, Protozoen und anaerobe Pilze. Die Gruppe der Bakterien macht mit 10^{11} Zellen/g Panseninhalt (HUNGATE, 1966) den größten Teil der mikrobiellen Population aus, die Zahl der Protozoen ist mit rund 10^5 Zellen/g Panseninhalt (CZERKAWSKI, 1986) wesentlich geringer. Die Gruppe der anaeroben Pilze ist erst in jüngerer Zeit untersucht worden, da eine Anzüchtung dieser Anaerobier schwierig war. Man nimmt an, dass die Pilze durch das Aufbrechen lignifizierter Strukturen Futterfasern für die Bakterien zugänglich machen, die sonst für diese wertlos wären (VAN SOEST, 1994). Über die Aufgabe und die unterschiedlichen Arten und Spezies an Bakterien und Protozoen finden sich zahlreiche detaillierte Beschreibungen u.a. in MAURUSCHAT (1996), RODEHUTSCORD (1992); STEWART und BRYANT (1988), CZERKAWSKI (1986), GIESECKE (1973) und

HARMEYER (1973). Eine ausführlichere Beschreibung der Arten und Aktivitäten der Pilze findet sich u.a. bei FONTY (1991) und ORPIN und HO (1991). Hier soll nur auf einige wichtige Eigenschaften eingegangen werden.

Eine Vielzahl an organischen Verbindungen kann von den Enzymen der Pansenbakterien aufgespalten werden. Dabei decken sie ihren Energiebedarf vorwiegend aus den Futter-Kohlenhydraten, die sie zu flüchtigen Fettsäuren (VFA) und Fermentationsgasen (CO_2 und CH_4) umsetzen. Futterprotein und andere Nicht-Protein-N (NPN) -Verbindungen werden von den Bakterien zu $\text{NH}_3\text{-N}$ abgebaut und an den Pansen- $\text{NH}_3\text{-N}$ -Pool abgegeben um dort als N-Quelle zur mikrobiellen Proteinsynthese zu dienen. Die einzelnen Bakterien ziehen je nach enzymatischer Ausstattung ein bestimmtes Substrat vor. Eine Einteilung nach diesen Substratvorlieben erscheint daher sinnvoll. YOKOYAMA und JOHNSON (1988) unterscheiden in Abhängigkeit des fermentierten Substrats elf Gruppen: cellulolytische, hemi-cellulolytische, amylolytische, pektinolytische, ureolytische, methanbildende, zuckerspaltende, proteolytische, lipolytische, Intermediärsäure verwertende und Ammonium bildende Bakterien. Überschneidungen kommen vor, da viele Bakterien mehrere Substrate fermentieren können. Die Einteilung und Zuordnung der Bakterien nach ihrer Substratspezifität setzt das Anzüchten von Bakterienkulturen auf Selektivmedien voraus. Da es sich um zumindest fakultativ anaerobe Mikroorganismen handelt, ist dieses Vorgehen sehr aufwändig.

Protozoen phagozytieren ihre Nahrung, die aus Futterbestandteilen und Bakterien besteht. Im Gegensatz zu Bakterien sind sie nicht fähig, den $\text{NH}_3\text{-N}$ -Pool im Pansen als N-Quelle zu nutzen (JOUANY, 1991). Sie decken ihren N-Bedarf vorwiegend durch Inkorporierung von Bakterien und kleineren Protozoen (BIRD, 1991; PRINS, 1991). Methanbildende Bakterien leben ecto- oder endosymbiontisch mit Protozoen, daher führt eine Abtötung der Protozoen im Pansen (Defaunierung) zu einer reduzierten Methanogenese und damit zu einer Reduktion des energetischen Verlusts während der Fermentation (SAUER und TEATHER, 1987). Eine Defaunierung scheint jedoch das Überleben des Wirtstieres nicht weiter negativ zu beeinflussen (PRINS, 1991), woraus geschlossen werden kann, dass Protozoen für die Fermentationsprozesse im Vormagen nicht unbedingt notwendig sind.

Für die Tierernährung von praktischem Interesse ist es, die Menge an Protein, die am Dünndarm des Wiederkäuers angeflutet wird, zu bestimmen. Neben dem unabgebauten Futterprotein stehen dem Wiederkäuer die mit dem Chymus anflutenden Mikroorganismen als Proteinquelle zur Verfügung. Markerstudien ermöglichen eine Abschätzung der mikrobiellen Masse bzw. des mikrobiellen Wachstums (MEKURIA, 1997; RODEHUTSCORD, 1992; PETRI, 1987). Allerdings setzen sie u.a. voraus, dass die Verteilung des markierten Elements in den isolierten und analysierten Mikroorganismen repräsentativ ist für alle im Pansen vorkommenden Mikroorganismen. Die Entnahme von Pansensaft ist relativ einfach und erfordert nicht zwingend invasive Methoden wie das Fistulieren der Tiere. Es erschien daher als zweckmäßig, die Mikroorganismen, die sich aus dem flüssigen Panseninhalt isolieren ließen und auch als liquid associated bacteria (LAB) bezeichnet werden, als repräsentativ für den gesamten Panseninhalt anzusehen. Allerdings vermutete SMITH (1975) bereits, dass dies nicht korrekt sei. MERRY und McALLAN (1983) isolierten und untersuchten Bakterien, die sie vom strukturierten Panseninhalt (angedaute Futterfasern) aus Ochsen ablösten und verglichen die chemische Zusammensetzung dieser als solid associated bacteria (SAB) bezeichneten Bakterien mit denen der LAB. Sie konnten nachweisen, dass sich die SAB hinsichtlich ihrer Zusammensetzung von den LAB signifikant unterscheiden.

2.3 Chemische Zusammensetzung der Mikroorganismen

Mit der „chemischen Zusammensetzung“ sind die Gehalte an Stoffgruppen (z.B. Rohasche) und Mengenelementen (z.B. P, S) gemeint, die durch chemische Analyse ermittelt wurden. Dieser Begriff soll sich absetzen von „Zellbestandteilen“, der eher funktionale Gruppen der Mikroorganismenzelle beschreibt (z.B. Zellwand, Ribosomen).

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung von SAB sind im Vergleich zu den Untersuchungen von LAB rar. Daher beschreibt die Mehrzahl der hier zitierten Arbeiten die Zusammensetzung der LAB.

2.3.1 Stickstoffgehalt bzw. Proteingehalt

Es ist notwendig, einige Begriffe im Zusammenhang mit dem Gehalt an Stickstoff (N) und Protein näher zu erläutern. Unter dem Begriff „Protein“ wird im Allgemeinen der bei der Weender Analyse gebrauchte Begriff „Rohprotein“ verstanden. Die Vorsilbe „Roh-“ verdeutlicht, dass der analysierte Stickstoff nicht nur aus Protein, sondern auch aus NPN-Verbindungen stammen kann (z.B. Harnstoff). In der Analyse wird der N-Gehalt der Probe ermittelt und der Rohprotein-Gehalt aus einem durchschnittlichen N-Gehalt im Protein von 16 % abgeleitet ($N \cdot 6,25$). Als „Reinprotein“ wird die N-Fraktion bezeichnet, die nach der Fällung mit einem Proteinspezifischen Reagenz verbleibt (LICITRA et al., 1996). Auch hier wird der N-Gehalt des Rückstands nach der Fällung der Probe mit 6,25 multipliziert um den Reinprotein-Gehalt einer Probe anzugeben. VAN SOEST (1994) gibt zu bedenken, dass bis zu $\frac{1}{3}$ des N in Mikroorganismen aus sogenannten NPN- Verbindungen wie Ribonukleinsäure (RNA), Desoxyribonukleinsäure (DNA) und N-haltigen Komponenten der Zellwand (z.B. Peptidoglykane) bestehen kann und somit die Angabe als Rohprotein recht ungenau sein kann. Außerdem läge der durchschnittliche N-Gehalt von bakteriellem Reinprotein bei 14 %. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass die N-Bestimmung nach unterschiedlichen Methoden durchgeführt wird und somit ein Vergleich der Werte nur bedingt möglich ist. Daher wird im Folgenden der N-Gehalt der Mikroorganismen angegeben.

Die gemessenen N-Gehalte variieren bei den LAB zwischen 52 (VAN NEVEL und DEMEYER, 1977) und 102,4 g N/kg T (STORM und ØRSKOV, 1983), für die SAB werden Werte zwischen 55 (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989) und 77,9 g N/kg T (OLUBOBOKUN et al., 1988) angegeben (vgl. Tabelle 1). Letztere beobachteten wie MERRY und McALLAN (1983) einen signifikant geringeren N-Gehalt bei den SAB als bei den LAB. VOLDEN und HARSTAD (1998) bestätigten dies nur bei einer gesteigerten Futteraufnahme der Rinder, welches im Gegensatz zu den Ergebnissen von RODRIGUEZ et al. (2000) steht, die bei Schafen keine Unterschiede bei höherer Futteraufnahme im N-Gehalt der LAB und SAB nachweisen konnten.

HVELPLUND (1986) schloss aus seinen Untersuchungen, dass etwa 70 % des N in Bakterien aus Aminosäuren-N stammt und damit Reinprotein darstellt.

Tabelle 1: N-Gehalte von LAB und SAB in der Literatur

Referenz	Proben- quelle	Methode	N, g/kg T		Sign.
			LAB	SAB	
RODRIGUEZ et al., 2000	Schafe	Kjeldahl	69,3 ¹ 71,3 ²	70,4 ¹ 73,2 ²	n.s. n.s.
VOLDEN und HARSTAD, 1998	Kühe	Kjeldahl	84 g/kg OS ¹ 91 g/kg OS ²	84 g/kg OS ¹ 85 g/kg OS ²	*
MARTIN-ORUE et al., 1998	Schafe	Kjeldahl	68,2	64,7	**
LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989	Kühe	Kjeldahl	66 ³ 71 ⁴	66 ³ 55 ⁴	n.s. *
OLUBOBOKUN et al., 1988	Ochsen	Kjeldahl	75,3 ³ 77,5 ⁵	77,9 ³ 71,8 ⁵	n.s. n.s.
KRAWIELITZKI und VOIGT, 1988	Kühe	Kjeldahl	74,3	x	
KOMISARCZUK et al., 1987a	<i>in vitro</i>	Kjeldahl	80,3	68,0	k.A.
BREVES, 1985	Schafe	Kjeldahl	71,7-77,4	x	
MERRY und McALLAN, 1983	Ochsen	colori- metrisch	80,2	70,1	**
STORM und ØRSKOV, 1983	Schafe, Kühe	Kjeldahl	102,4 ⁶	x	
VAN NEVEL und DEMEYER, 1977	Schafe	Kjeldahl	52-72	x	
SMITH und McALLAN, 1974	Schafe Kühe	colori- metrisch	71,6 70,7	x x	

¹ niedrige Futteraufnahme; ² hohe Futteraufnahme; ³ Heu-Kraftfutter-Ration; ⁴ Heu-Kraftfutter-Sojaöl-Ration; ⁵ nur Heu; ⁶ gesamter Panseninhalt von geschlachteten Kühen und Schafen; x nicht gemessen; n.s. nicht signifikant, k.A. keine Angaben; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Der N-Gehalt der Pansenbakterien scheint nicht konstant zu sein und Untersuchungen über den N-Gehalt im Reinprotein sind in der gesichteten Literatur rar.

2.3.2 Fett-Gehalt

Es wird vorwiegend die Fettbestimmung nach FOLCH et al. (1957) durchgeführt, daher wird bewusst der Begriff „Fett-Gehalt“ verwendet. Die Bestimmung des Fettgehaltes nach NAUMANN und BASSLER (1976) führt zu dem Begriff „Rohfett“.

In der Literatur schwanken die angegebenen Fett-Gehalte für die LAB zwischen 88 (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989) und 167 g/kg T (CZERKAWSKI, 1976) und die der SAB zwischen 154 und 244,5 g Fett/kg T (RODRIGUEZ et al., 2000; MERRY und

MCALLAN, 1983). Damit weisen in Übereinstimmung aller Autoren die LAB einen geringeren Fettgehalt auf als die SAB auf. Die Schwankung der Fettgehalte in der Literatur könnte neben den Einflüssen durch Mikroorganismengewinnung und unterschiedlichen Fettextraktionsmethoden durch die Rationszusammensetzung (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; CRAIG et al., 1987) bedingt sein. Laut VAN NEVEL und DEMEYER (1977) macht der P-Gehalt aus den Phospholipiden 21 % des P-Gehaltes der aus flüssigem Schafpanseninhalt isolierten LAB aus.

2.3.3 Kohlenhydrat-Gehalte

Bakterien können überschüssige Kohlenhydrate intrazellulär einlagern, wobei Bakterienkulturen mit einer langsam wachsenden Population mehr Kohlenhydrate einlagern als schnell wachsende Kulturen (THOMPSON und HOBSON, 1971). CZERKAWSKI (1976) ermittelte an LAB, die aus Schafpanseninhalt isoliert wurden, einen Kohlenhydratanteil von 76 bis 80 g/kg T in Form von Speicherkohlenhydraten, Zellwandbestandteilen und Nukleinsäuren-Zuckern. MCALLAN und SMITH (1974) analysierten in LAB, die aus dem Panseninhalt von Kälbern isoliert wurden, 190 g Kohlenhydrate pro kg T, vornehmlich Glucose. Durch die Zulage von Protein oder Harnstoff zur Ration konnte der Kohlenhydratanteil um knapp 70 % reduziert werden. Dabei fanden sie bei Schafen und Kühen mit einer vergleichbaren Ration (Heu-Krafftfutteranteil von 1:1) 70 g Kohlenhydrate/kg T. VOLDEN und HARSTAD (1998) analysierten einen Stärkegehalt von 15 bis 28 g/kg OS in LAB und SAB, wobei der Stärkeanteil in den LAB durch eine Erhöhung der Futteraufnahme stärker beeinflusst war als der der SAB. MERRY und MCALLAN (1983) konnten keine Unterschiede im Kohlenhydrat-Gehalt von LAB und SAB feststellen, der bei 57,5 und 49,4 g/kg T lag. Die Analyse der Kohlenhydrate ist bei den Autoren verschieden, so dass eine exakte Aussage über den Kohlenhydratgehalt von Pansenbakterien nicht ohne weiteres getroffen werden kann.

2.3.4 Rohasche-Gehalt

RODRIGUEZ et al. (2000), VOLDEN und HARSTAD (1998), LEGAY-CARMIER und BAUCHART (1989), MERRY und MCALLAN (1983) und STORM und ØRSKOV (1983)

bestimmten in ihren Untersuchungen den Gehalt an Rohasche der LAB und geben Werte zwischen 157 und 278 g/kg T an. LEGAY-CARMIER und BAUCHART (1989), CRAIG et al. (1987) sowie MERRY und McALLAN (1983) fanden für SAB signifikant niedrigere Werte als für LAB (86,6 – 207 g/kg T). MARTIN et al. (1994) und HSU und FAHEY (1990) geben allerdings zu bedenken, dass der Rohasche-Gehalt isolierter Zellen von der NaCl-Lösung beeinflusst sein kann, die während des Isolierungsprozesses der Mikroorganismen zum „Waschen“ eingesetzt wird. Die Anzahl der „Waschungen“ kann daher den Rohasche-Gehalt der Mikroorganismen beeinflussen.

2.3.5 Einflüsse auf die chemische Zusammensetzung von Pansenbakterien

Einfluss durch Tierart und Haltungsbedingungen

SMITH und McALLAN (1974) fanden bei einem Vergleich zwischen LAB, die aus Schaf- bzw. Kuhpanseninhalt gewonnen wurden, keine Unterschiede im N- und RNA-Gehalt. Kälber, die keinen Kontakt zu ausgewachsenen Wiederkäuern hatten, zeigten einen niedrigeren N-Gehalt der LAB als Kälber, die unter normalen Bedingungen (Kontakt zu ausgewachsenen Wiederkäuern) aufwuchsen.

Rationsbedingter Einfluss

VOLDEN et al. (1999) stellten eine Veränderung des Aminosäurenmusters bei LAB und SAB fest, wenn der Kraftfutteranteil in der Ration variiert wurde. Dies bestätigen die Ergebnisse von MARTIN-ORUE et al. (1998), die einen signifikant höheren N- und Purinbasen-Gehalt in LAB und SAB feststellten, wenn der Kraftfutteranteil in der Ration von 20 auf 80 % erhöht wurde. MARTIN et al. (1994) beobachteten den gleichen Effekt, allerdings nur bei den SAB. Die Zulage von Sojaöl erhöhte den Fettgehalt sowohl in LAB als auch in SAB (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989). Auch CZERKAWSKI (1976) beobachtete eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung der LAB in Abhängigkeit des Rohfütteranteils in der Ration.

Einfluss der Probenentnahme nach/vor der Fütterung

Ein Einfluss des Zeitpunktes der Entnahme von flüssigem Panseninhalt – vor oder nach der Fütterung – wird von SMITH und McALLAN (1974), MARTIN et al. (1994) und CZERKAWSKI (1976) berichtet, wobei CZERKAWSKI (1976) die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung hauptsächlich auf einen nach der Fütterung bis zu 10-fach höheren Polysaccharid-Anteil in den Bakterien (LAB) zurückführt. Diese Vermutung wird von CRAIG et al. (1987) und SMITH (1975) gestützt, die eine Akkumulation der Kohlenhydrate in den LAB eine bis acht Stunden nach der Fütterung analysierten.

Einfluss der Durchflussrate

RODRIGUEZ et al. (2000) zeigten, dass die Passagerate des Panseninhaltes ein Hauptfaktor war, der das Nukleinsäuren:Protein-Verhältniss in LAB und SAB und einige der Differenzen, die zwischen LAB und SAB festgestellt wurden, erklärten. ISAACSON et al. (1975) beobachteten in einem Continuous Culture System einen höheren N-Gehalt bei ansteigender Durchflussrate und vermuten einen Anstieg an ribosomaler RNA aufgrund einer erhöhten Wachstumsrate der Bakterien.

Einfluss der Isolierungstechnik

Ein Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit während der Bakterienisolierung (Differentialzentrifugation) wäre denkbar, konnte aber von HSU und FAHEY (1990) nicht bestätigt werden. CZERKAWSKI (1976) differenzierte zwischen großen Bakterien, die sich bei 1000*g abzentrifugieren ließen, und kleinen Bakterien, die nach der Beschleunigung auf 20000*g als Rückstand verblieben und fand Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung. HSU und FAHEY (1990) konnten keinen Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf die Zellinhaltsmenge feststellen.

STORM und ØRSKOV (1983) unterteilen die isolierten LAB-Bakterien anhand der Zentrifugationsdauer (8 und 22 Minuten), fanden aber keine grundlegenden Unterschiede in ihrer Zusammensetzung.

Ein weiterer Einfluss ist durch die verschiedenen Ablöseverfahren der Bakterien von den Futterfasern denkbar (MARTIN-ORUE et al., 1998; MERRY UND McALLAN, 1983), die die chemische Zusammensetzung der SAB beeinflussen könnten.

2.3.6 Mineralstoffgehalte in den Mikroorganismen

Schwefel

Schwefel ist einerseits für den Aufbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein notwendig, andererseits ist er an der Vitaminsynthese (Thiamin, Biotin) beteiligt (KOMISARCZUK-BONY und DURAND, 1991a; b). Die Zulage von Schwefel zu einer synthetischen Ration erhöhte die mikrobielle Fermentation (DURAND et al., 1986b). CZERKAWSKI (1976) ermittelte in der kohlenhydratfreien, lufttrockenen Substanz ein S:N-Verhältnis in den Protozoen von 0,03, in kleinen LAB von 0,06 und in großen LAB von 0,03. KOMISARCZUK, (unveröffentlicht, in KOMISARCZUK-BONY und DURAND, 1991b) analysierte höhere Werte (Protozoen S:N-Verhältnis von 0,07, LAB von 0,06 und SAB von 0,08), allerdings können die Werte aufgrund unterschiedlicher Schwefel-Bestimmungsmethoden variieren. SMITH (1984) gibt ein S:N-Verhältnis von 0,05-0,07 in gemischten Pansenbakterien an. Die analysierten Gehalte können aufgrund von Ration, Zeitpunkt der Probennahme und Bestimmungsmethode schwanken.

Magnesium

Magnesium ist als Aktivator zahlreicher mikrobieller Enzyme wie der Phosphorhydrolase und Phosphotransferase für die Mikroorganismen essentiell. Für die Cellulase von *Ruminococcus flavefaciens* wurde Magnesium ebenfalls als Aktivator identifiziert (DURAND und KOMISARCZUK, 1988). Angaben über die Gehalte an Magnesium sind rar, DURAND und KOMISARCZUK (1988) geben für Bazillen 6 g/kg T an.

Calcium

Calcium ist an der Bildung und Stabilisierung der Zellwände der Mikroorganismen beteiligt. DURAND und KOMISARCZUK (1988) gehen von 0,1-0,3 g Calcium/kg T Bazillen aus.

Phosphor

P ist ein elementarer Bestandteil von Nukleotiden, Coenzymen wie Flavinphosphat, Pyridoxalphosphat und Thiaminphosphat. Andere Zellkomponenten sind Teichonsäure in der Zellwand Gram-positiver Bakterien und Phospholipide, die hauptsächlich im Cytoplasma und der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommen (DURAND und KAWASHIMA, 1980). Anorganische Polyphosphate können als Energiereserven bei einem Überschuss an Energie angelegt werden. Diese Polyphosphate sind physiologisch wichtig, da sie eine Reserve für P und Energie darstellen und zur Bereitstellung von ATP nötig sind. In den Ribosomen findet man den größten Teil der zellulären RNA, während der ribosomale Inhalt der Bakterien proportional zu deren Wachstum ist. Veränderungen der Wachstumsrate resultieren also in einem veränderten P-Gehalt der Zelle (DURAND und KAWASHIMA, 1980). MERRY und McALLAN (1983) ermittelten einen P-Gehalt von 12,78 g/kg T bei LAB und 9,75 g/kg T bei SAB aus Ochsenpansen. Die von KOMISARCZUK et al. (1987a) analysierten P-Gehalte von 11,7 g/kg T LAB und 9,30 g/kg T SAB korrespondieren recht gut mit diesen Werten, obwohl sie aus einer Rumen Simulation Techniques (RUSITEC), also *in vitro*, isoliert wurden und unterschiedliche P-Bestimmungsmethoden genutzt wurden. CZERKAWSKI (1976) untersuchte die P-Gehalte von Protozoen, kleinen und großen Bakterien, die aus flüssigem Schafpanseninhalt isoliert worden waren, und gibt Werte von 13,8, 18,8 und 13,3 g/kg kohlenhydratfreier, lufttrockener Substanz an. VAN NEVEL und DEMEYER (1977) fanden P-Gehalte von 6,1 bis 8,6 g/kg T in Bakterien, die aus flüssigem Schafpanseninhalt über einen Zeitraum von zwei Jahren isoliert worden waren. In Inkubationsversuchen mit Pansensaft von Schafen und dem Einsatz radioaktiv markiertem P (^{32}P) wurde geschätzt, dass in wachsenden Pansenbakterien 75 % des mikrobiellen P in den Nukleinsäuren und 21 % in Phospholipiden zu finden sind. Dies stimmt überein mit den von MERRY et al. (1982) in ^{32}P -Inkubationsexperimenten gefundenen Ergebnissen, wonach $78,5 \pm 1,5$ % des gesamten P im Nukleinsäurenphosphor zu finden sind.

Ob ein P-Mangel der Mikroorganismen für die bei reduzierter P-Aufnahme mit dem Futter beobachteten subklinischen Auswirkungen der Wiederkäuer verantwortlich

sind, erfordert die Kenntnis des mikrobiellen P-Bedarfs. Bisher haben sich besonders die Arbeitsgruppe um Sylvie KOMISARCZUK-BONY und Michelle DURAND mit diesem Thema beschäftigt. Die bisher gesammelten Erkenntnisse sollen nun beschrieben werden.

2.4 P-Bedarf der Pansenmikroorganismen

2.4.1 Ableitung des P-Bedarfs aufgrund des N:P-Verhältnisses

Eine Möglichkeit den P-Bedarf der Mikroorganismen abzuschätzen ist die Verwendung des N:P-Verhältnisses in den isolierten Mikroorganismen. Geht man von der Annahme aus, dass dieses Verhältnis konstant ist, so kann von der ermittelten mikrobiellen Proteinsynthese auf den dafür benötigten P geschlossen werden und der P-Bedarf für mikrobielles Wachstum formuliert werden.

CZERKAWSKI (1976) untersuchte den N- und P-Gehalt von Protozoen und kleinen und großen Bakterien aus dem flüssigen Panseninhalt von Schafen und prüfte, ob sie durch unterschiedliche Heu:Krafftfutteranteile in der Ration und unterschiedliche Entnahmezeitpunkte des Pansensaftes (vor/nach der Fütterung) verändert wurden. Einflüsse beider Merkmale wurden festgestellt, die sich jedoch nahezu nivellierten, wenn die Gehalte auf die kohlenhydratfreie Substanz der Protozoen und Bakterien bezogen wurden. In der kohlenhydratfreien, lufttrockenen Substanz wurde ein N:P-Verhältnis der Protozoen von 7,10, der kleinen Bakterien von 3,96 und der großen Bakterien von 7,26 analysiert. Die Unterteilung „kleine“ und „große“ Bakterien wurde durch unterschiedliche Zentrifugationsgeschwindigkeiten des flüssigen Panseninhaltes von Schafen erreicht. Der Anteil der Protozoen, kleinen und großen Bakterien am gesamten flüssigen Panseninhalt gibt CZERKAWSKI (1976) aufgrund der Gewichtsanteile mit 3:5:1 an. Diese Verteilung zu Grunde legend errechnen DURAND und KAWASHIMA (1980) ein mittleres N:P-Verhältnis von 5,3.

VAN NEVEL und DEMEYER (1977) ermittelten aus insgesamt 40 Pansensaftproben, die sie über zwei Jahre aus dem flüssigen Panseninhalt von Schafen gewannen, ein durchschnittliches N:P-Verhältnis von $8,37 \pm 0,75$ g/kg T. MERRY und MCALLAN (1983) beobachteten bei ihren Untersuchungen an Bakterien, die sie aus dem

flüssigen (LAB) und strukturierten (SAB) Panseninhalt von getöteten Ochsen isolierten, unterschiedliche N:P-Verhältnisse. Die LAB wiesen ein N:P-Verhältnis von 5,99 und die SAB von 6,71 auf. SMITH (1984) geht von einem mittleren N:P-Verhältnis von 6,90 in gemischten Pansenbakterien aus. In Bakterien, die aus *in vitro* Langzeitinkubationssystemen (RUSITEC) isoliert wurden, bestimmten KOMISARCZUK et al. (1987a) ein N:P-Verhältnis in LAB zwischen 7,0 und 7,8, und in den SAB zwischen 6,70 und 11,4, MEKURIA (1997) in LAB ein Verhältnis zwischen 4,2 und 8,0. In beiden Untersuchungen war das N:P-Verhältnis unabhängig von der P-Versorgung über den kontinuierlich zugeführten Puffer.

Eine Erklärung für die weite Spanne der gefundenen N:P-Verhältnisse in LAB von 3,96-8,37 (CZERKAWSKI, 1976; VAN NEVEL und DEMEYER, 1977; MERRY und McALLAN, 1983; MERRY et al., 1982; KOMISARCZUK et al., 1987a; MEKURIA, 1997) und der SAB von 6,70-11,4 (MERRY und McALLAN; 1983; KOMISARCZUK et al., 1987a) könnten die bereits beschriebenen Einflussfaktoren auf die chemische Zusammensetzung sein. Einige Autoren gehen davon aus, dass die Zusammensetzung von wachsenden Mikroorganismen anders ist als von denen, die sich im Gleichgewicht zwischen Lyse und Wachstum, in einer Art stationären Phase befinden (DURAND et al., 1983a; VAN NEVEL und DEMEYER, 1977). Tatsächlich beobachteten VAN NEVEL und DEMEYER (1977) bei ihren *in vitro* Experimenten mit ^{32}P , dass sich während der Inkubation die Zusammensetzung der Mikroorganismen veränderte. Der P-Gehalt von neu-synthetisierter Zellmasse scheint geringer zu sein als der der Mikroorganismen, die zu Beginn der Inkubation im Inkubationsmedium vorhanden waren. Dies scheint an der Bildung von nicht-P-haltigen-Zellfraktionen zu liegen, vornehmlich Polysacchariden. In der gesichteten Literatur wurden keine Angaben über das N:P-Verhältnis in Protein, Fett oder Kohlenhydraten gefunden.

2.4.2 Ableitung des P-Bedarfs aus Untersuchungen *in vitro*

Die Notwendigkeit der Ziehung einer repräsentativen Probe des Panseninhaltes, der genauen Erfassung des Pansenabflusses und der Messung der Gasproduktion sowie der löslichen Fermentationsendprodukte, die den Pansen entweder über die Pansenwand oder den Ructus verlassen, erschweren Untersuchungen der

mikrobiellen Fermentationsleistung unter *in vivo* Bedingungen (TEATHER und SAUER, 1988). Daher wird auf *in vitro* Untersuchungsmethoden zurückgegriffen, die die Vorgänge im Pansen möglichst genau widerspiegeln sollen. Dennoch muss erwähnt werden, dass Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen nicht 1:1 auf *in vivo* Bedingungen umgesetzt werden können.

In der Arbeit von AIPLE (1993) werden die unterschiedlichen Inkubationssysteme ausführlich beschrieben, daher soll an dieser Stelle lediglich auf die wichtigsten Besonderheiten eingegangen werden.

Offene Inkuabtionssysteme, die im Gegensatz zu geschlossenen Systemen einen kontinuierlichen Zulauf von Pufferlösung sowie einen kontinuierlichen Abfluss der Fermentationsendprodukte gewährleisten, scheinen die Verhältnisse im Pansen am ehesten wiedergeben zu können (KOMISARCZUK et al., 1986). Zu den offenen Inkubationssystemen zählt das von MERRY et al. (1987) verwendete Continuous Culture System (CCS). Dieses ist gekennzeichnet durch eine stetige Futterzufuhr und einen kontinuierlichen Pufferlösungszulauf in den Fermenter. Es gibt keine Trennung zwischen inkubiertem Futter (fester Fermenterinhalt) und Inkubationsmedium (flüssiger Fermenterinhalt). Der Abfluss erfolgt auf zweifachem Wege: ein Teil der Flüssigkeit des Fermenters wird kontinuierlich verdrängt (Abfluss_{kont.}), ein anderer Teil der Flüssigkeit wird periodisch abgepumpt und dabei gefiltert (Abfluss_{period.}), womit eine Simulation der unterschiedlichen Passagezeiten von flüssigem und festem Fermenterinhalt erreicht werden soll. Das Futter ist in der Regel pelletiert.

Bei der von CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1977) entwickelten Rumen Simulation Techniques (RUSITEC) wird das Futter in permeablen Nylonsäckchen in den Fermenter gegeben und hin- und herbewegt. Somit wird eine stetige Durchmischung von Inkubationsmedium und Futter erreicht, die dennoch eine Trennung zwischen inkubiertem Futter und Inkubationsmedium erlaubt. Damit ist die Isolierung von LAB und SAB möglich. Aufgrund des periodisch zugeführten Futters wird dieses System als semi-kontinuierlich bezeichnet. Der Abfluss des flüssigen Fermenterinhalt erfolgt über kontinuierliche Verdrängung und wird als Überlauf bezeichnet. Als Starterkultur dient im Falle des CCS flüssiger Panseninhalt, im Falle des RUSITEC flüssiger und strukturierter Panseninhalt. Nach vier bis sieben Tagen werden Gleichgewichtsbedingungen (steady state) im Fermenter erlangt (MERRY et al., 1987;

CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE, 1979). Das System kann mehrere Wochen aufrecht erhalten werden (KOMISARCZUK et al., 1987a; CZERKAWSKI, 1986). Für die Untersuchungen der mikrobiellen Fermentationsleistung bieten beide Systeme den Vorteil, von der P_a -Konzentration des Pansensaftes, der als Starterkultur verwendet wird, unabhängig zu sein. Einzig der P-Eintrag über das Futter scheint nicht beliebig absenkbar zu sein, sofern noch wiederkäuergerechte Rationen zum Einsatz kommen sollen.

Ableitung des P-Bedarfs aufgrund optimaler mikrobieller Aktivität

Die Untersuchungen der mikrobiellen Fermentationsleistung bei unterschiedlichen P-Versorgungsniveaus sollen Aufschluss über den P-Bedarf der Mikroorganismen geben.

Die optimale mikrobielle Fermentationsleistung umfasst

- (1) die mikrobielle Proteinsynthese
- (1) die Bildung flüchtiger Fettsäuren (VFA)
- (2) die Verwendung von NH_3 -N zum Aufbau von mikrobiellen N-Verbindungen
- (3) die Verdaulichkeit der Nährstoffe (DURAND et al., 1983a) und
- (4) die Gasbildung (CO_2 , CH_4).

MEKURIA (1997) untersuchte im RUSITEC den Einfluss einer stark reduzierten P-Zufuhr über den Puffer (26 und 0,26 mmol P_a /L) auf das mikrobielle Wachstum und die mikrobielle Aktivität bei drei unterschiedlichen N-Niveaus (5,00, 2,50 und 1,00 mmol N/L Pufferlösung). Über das inkubierte Futter, welches aus Stroh und einem P-armen Kraftfutter bestand (1,5:1, (w/w)), gelangten 12 mg P und 200 mg N pro Tag in den Fermenter. Die veränderte P-Versorgung hatte Auswirkungen auf den pH-Wert, der unter P-Depletionsbedingungen bei einem N-Niveau von 2,50 mmol und 1,00 mmol/L Pufferlösung leicht sank. Der Autor führt dies auf eine gestiegene NH_3 -N-Konzentration im Überlauf zurück, die aus dem Rückgang der mikrobiellen Proteinsynthese resultierte. Eine P_a -Konzentration von 0,26 mmol/L Pufferlösung hatte ebenfalls einen reduzierenden Einfluss auf die Konzentration der VFA und die Verdaulichkeit der OS, konnte allerdings bei dem mittleren N-Niveau im

Mittelwertsvergleich nicht bestätigt werden. Ein Einfluss der P- und/oder N-Versorgung auf das N:P-Verhältnis wurde - wie bereits erwähnt - nicht beobachtet.

KOMISARCZUK et al. (1986; 1987b) untersuchten ein P_a -Versorgungsniveau von 0 oder 3,87 mmol/L Pufferlösung im RUSITEC. Über die Verwendung von mit ^{15}N markiertem Harnstoff konnte die Proteinsynthese der Bakterien aus dem flüssigen (LAB) und festen Fermenterinhalt (SAB) abgeschätzt werden. Es standen vier Fermenter zur Verfügung, von denen je zwei mit 3,87 mmol P/L Pufferlösung und zwei mit 0 P/L Pufferlösung kontinuierlich versetzt wurden. Über das Futter gelangten täglich 18 mg P und 150 mg N pro Tag in das System. Nach einer ersten elftägigen Sammelphase wurden die Pufferlösungen ausgetauscht (cross over), somit wurde sowohl eine P-Depletion als auch die Auswirkungen einer P-Repletion untersucht. Es wurde eine signifikante Reduzierung der mikrobiellen Proteinsynthese bei 0 P/L Pufferlösung beobachtet, von der die LAB stärker betroffen waren als die SAB. Bei ersteren kam es sogar zu einem signifikanten Rückgang des N-Gehaltes, wobei aber das N:P-Verhältnis von der P-Versorgung unbeeinflusst blieb. Interessanterweise konnten bei der anschließenden P-Repletion keine deutlichen Unterschiede in der mikrobiellen Proteinsynthese von LAB und SAB festgestellt werden. Die P-Depletion hatte weiterhin einen Einfluss auf die Verwendung von $\text{NH}_3\text{-N}$ durch die Mikroorganismen, die bei P-Depletion bei den LAB um 38 % und bei den SAB um 28 % sank. Die Auswirkungen auf die mikrobielle Proteinsynthese gingen einher mit einem Rückgang des Cellulose- und Hemicellulose-Abbaus, des Abbaus der OS und der Produktion an VFA.

DURAND et al. (1986a) untersuchten den Effekt einer P-Versorgung von 0 bzw. von 3,87 mmol P_a /L Pufferlösung auf die mikrobielle Fermentationsleistung in einem RUSITEC-System. Mit Natronlauge behandeltes Stroh wurde als ein Futtermittel mit niedrigem P- und N-Gehalt (13,7 mg P und 192 mg N pro Tag) verwendet. Zusätzlich zu einer reduzierten P-Versorgung sollten die Effekte einer Harnstoff-Zulage über die Pufferlösung (150 mg Harnstoff/L) geprüft werden. Die P-Depletion führte zu einem Abfall der Gasproduktion und Produktion an VFA, Rückgang der Verdaulichkeit der OS und Zellwandbestandteile (Hemicellulose, Cellulose). Die Zulage von Harnstoff führte zu ausgeprägteren Differenzen zwischen P-Depletion und ausreichender P-Versorgung (0 mmol P_a /L vs. 3,87 mmol P_a /L). Beim Vergleich der Fermentations-

leistung unter P-Depletionsbedingungen mit und ohne Harnstoffzulage erzielte eine höhere N-Versorgung keinen Effekt.

KOMISARCZUK et al. (1987b) reduzierten in einem Continuous Culture System schrittweise die P_a -Konzentration der kontinuierlich zugeführten Pufferlösung im Fermenter von 3,87 auf 0 mmol/L und erreichten damit P_a -Konzentrationen im Fermenter von 1,55, 0,90, 0,13 und unter 0,03 mmol/L Fermenterinhalt. Die P_a -Konzentration der Pufferlösung des Kontrollfermenters lag bei 1,65 mmol/L Fermenterinhalt und variierte nicht. Der Eintrag über das Futter lag konstant bei 25 mg P und 960 mg N pro Tag. Bereits ab einer P_a -Konzentration von 0,13 mmol/L Fermenterinhalt wurde die Produktion der VFA und die Umwandlung von Cellulose in Glucose eingeschränkt. Die Zusammensetzung der Bakterien, die aus dem gemischten Abfluss ($\text{Abfluss}_{\text{kont.}} + \text{Abfluss}_{\text{period.}}$) stammten, veränderte sich erst ab einer P_a -Konzentration von kleiner 0,03 mmol/L Fermenterinhalt. Daraus schlossen die Autoren, dass für einen maximalen Cellulose-Abbau P_a -Konzentrationen in Höhe von 0,16 bis 0,81 mmol/L Fermenterinhalt notwendig seien, wohingegen für die mikrobielle Proteinsynthese P_a -Konzentrationen von 0,16 mmol/L Fermenterinhalt als ausreichend angesehen werden können.

In einer vorherigen, ähnlichen Untersuchung hatten KOMISARCZUK et al. (1984) Fermenterkonzentrationen von 11,9 und ≤ 1 mmol P_a /L erreicht und festgestellt, dass neben einem Anstieg des pH-Wertes die Konzentration an $\text{NH}_3\text{-N}$ zunahm, wenn die P_a -Konzentration im Fermenter unter 1 mmol/L fiel. Außerdem nahm die Konzentration an VFA und ATP ab, die Anzahl der Protozoen ging zurück.

Tabelle 2 gibt die P_a -Konzentrationen in der Pufferlösung sowie die Rationszusammensetzung und den angegebenen täglichen Eintrag von N und P über das Futter bei den unterschiedlichen Untersuchungen an.

Tabelle 2: Übersicht über die in Langzeitinkubationssystemen verwendeten Rationen bei variiertem P-Versorgung über die Pufferlösung

P_a -Konzentration Pufferlösung	Ration	N- und P-Eintrag mit dem Futter	System und Referenz
0,26 und 26 mmol/L Puffer;	0,60 Stroh, 0,16 Kartoffelstärke, 0,145 Melasseschnitzel, 0,04 Haferspelzen, 0,07 Mineralstoff-VM 0,04 Spurenelement- Vitamin-VM	12 mg P/d 200 mg N/d	RUSITEC Mekuria (1997)
0 und 3,87 mmol/L Puffer;	0,50 Gerstenstroh, 0,29 Trockenschnitzel 0,21 Tapioca	18 mg P/d; 150 mg/d	RUSITEC Komisarczuk et al. (1986; 1987a)
3,87 und 0 mmol/L Puffer;	1,0 NaOH Stroh	13,7 mg P/d, 192 mg N/d	RUSITEC Durand et al. (1986a)
3,87 → 2,58 → 1,29 → 0 mmol/L Puffer;	0,49 Gerstenstroh, 0,29 Trockenschnitzel, 0,20 Tapioca, 0,02 Harnstoff	25 mg P/d, 960 mg/d;	CCS Komisarczuk et al. (1987b)
11,9 → 0 mmol P_a /L Fermenterinhalt;	0,49 Stroh, 0,29 Trockenschnitzel, 0,20 Tapioca, 0,02 Harnstoff	21 mg P/d, k.A. N/d	CCS Komisarczuk et al. (1984)

→ schrittweise Absenkung in einem Fermenter; RUSITEC Rumen Simulation Technique; CCS Continuous Culture System; k.A. keine Angaben

MEKURIA (1997), KOMISARCZUK et al. (1986; 1987a) und DURAND et al. (1986a) prüften lediglich die P_a -Konzentration von ausreichend zu mangelhaft. Es ist nicht ersichtlich, ob eine schrittweise Absenkung eine Adaptation der mikrobiellen Aktivität an eine geringere P-Versorgung ermöglicht, wie dies aus den Ergebnissen von KOMISARCZUK et al. (1987a) bezüglich der mikrobiellen Proteinsynthese vermutet werden könnte.

Als geschlossene Inkubationssysteme werden diejenigen bezeichnet, bei denen das zu inkubierende Futter mit einem Pansensaft-Puffergemisch in einem Inkubationsgefäß, meist einem Glasbehälter, für mehrere Stunden bei 39°C inkubiert wird. Ein Abfluss der Fermentationsendprodukte findet während der Inkubation nicht statt. Die Inkubationszeiten betragen in der Regel 1 h bis 48 h. Die geschlossenen Inkubationssysteme bieten aufgrund ihrer wesentlich einfacheren Handhabung die Möglichkeit, viele Futtermittel in kurzer Zeit zu prüfen. Der zeitliche Aufwand gegenüber den offenen Systemen ist deutlich reduziert.

Im Gegensatz zu den offenen Systemen wird die mikrobielle Aktivität bei der Fermentation einzelner Futtermittel geprüft. Merkmal der mikrobiellen Aktivität sind in erster Linie die Gasbildung, das mikrobielle Wachstum und die Bildung von flüchtigen Fettsäuren.

DURAND et al. (1983a) inkubierten unterschiedliche Kohlenhydrate mit einem Pansensaft-Puffer-Gemisch (1:1, (v/v)) für eine bis fünf Stunden bei 39°C. Der Pansensaft stammte von Schafen, die eine proteinfreie, synthetische Ration (Hauptbestandteil: Maisstärke, Cellulose, Cérélose) erhalten hatten. Es wurde der Einfluss unterschiedlich fermentierbarer Kohlenhydrate auf die mikrobielle Proteinsynthese, die Nutzung von $\text{NH}_3\text{-N}$ zur mikrobiellen Proteinsynthese, die Produktion der flüchtigen Fettsäuren Essig-, Propion-, Butter- und Milchsäure geprüft. Über den Einbau von ^{32}P in die Bakterien konnte auf das mikrobielle Wachstum geschlossen werden. Aus der anschließenden Regressionsanalyse wurde gefolgert, dass für einen maximalen P-Einbau und damit verbunden für ein maximales mikrobielles Wachstum eine P_a -Konzentration von $> 2,26 \text{ mmol P/L}$ Inkubationsmedium notwendig ist.

Dieser Wert fällt in den Bereich der von KOMISARCZUK et al. (unveröffentlicht, zitiert bei DURAND et al., 1989) für ein maximales Wachstum (24 h Inkubation) an einer Reinkultur des cellulolytischen Bakteriums *Ruminococcus flavefaciens* (grampositiv) angegeben wird und zwischen 0,48 und 3,23 mmol P_a/L Inkubationsmedium liegt. Für *Fibrobacter* (vormals *Bacteroides*) *succinogenes*, ein gramnegatives, cellulolytisches Bakterium, konnten die Autoren bis zu einer P_a -Konzentration von 0,48 mmol P/L Inkubationsmedium keine Einschränkung des bakteriellen Wachstums

feststellen. Dabei wurde die optische Dichte des Glucosemediums als Merkmal des mikrobiellen Wachstums angesehen. Weitere Experimente ergaben, dass der Celluloseabbau durch die beiden Bakterienkulturen mit einer P_a -Konzentration im Medium von 0,48 mmol/L noch nicht den Wert der Kontrolle erreicht hatte, deren Medium eine P_a -Konzentration von 3,23 mmol/L aufwies.

MILTON und TERNOUTH (1984) untersuchten die Veränderungen des pH-Wertes und des Abbaus der NDF-Fraktion (Verdaulichkeit der NDF) vor und nach der Inkubation von Gerstenstroh bei unterschiedlichen P-Gehalten. Es wurden 0,5 g Gerstenstroh mit 50 mL eines Puffer-Pansensaft-Gemisches in Inkubationskolben für 48 h bei 39°C inkubiert. Der Pansensaft wurde in zwei Versuchen zwei Schafen entnommen, die über einen längeren Zeitraum mit einer hoch Calcium/niedrig Phosphor-Ration gefüttert worden waren, und im dritten Versuch von einem Schaf, das zusätzlich zu der bereits erwähnten Ration 3 g P/kg d⁻¹ erhielt. Der Pansensaft wurde im Verhältnis von 1:3,6 (v/v) mit einer P-freien Pufferlösung gemischt und zusätzlich mit 4 mL einer P-haltigen Pufferlösung versetzt, über die die P-Konzentration im Inkubationsmedium eingestellt werden sollte. Aus den Autorenangaben lassen sich damit die Endkonzentrationen im Inkubationsmedium kalkulieren, die sich aus dem P-Eintrag über die Pufferlösung und den Pansensaft ergeben. In einem ersten Versuch wurden sechs P-Stufen zwischen 0,54 und 10,86 mmol P/L Inkubationsmedium geprüft. Der zweite Versuch unterschied sich vom ersten lediglich durch die Zulage von Harnstoff, Na₂SO₄ und Zucker zum Gerstenstroh. MILTON und TERNOUTH (1984) beobachteten, dass eine ansteigende P-Konzentration einen geringeren pH-Wert zur Folge hatte, wobei die absoluten Änderungen zwischen einem pH-Wert von 7,1 und 6,8 lagen. Eine höhere P-Konzentration im Inkubationsmedium hatte einen signifikant positiven Einfluss auf die Verdaulichkeit der NDF, der unabhängig von der Zulage von Harnstoff, Na₂SO₄ und Zucker war. Erst ab einer P-Konzentration von 1,55 mmol P/L (P-Stufe 2) führte die Zulage von Harnstoff, Na₂SO₄ und Zucker zu einer höheren Verdaulichkeit der NDF. Die Verdaulichkeit der NDF war mit Zulage höher als ohne die Zulage von Harnstoff, Na₂SO₄ und Zucker, unabhängig von der P-Konzentration. In einem dritten Versuch mit Pansensaft, der von einem Schaf stammte, welches ausreichend mit P über das Futter versorgt wurde, wurden keine Einflüsse der P-Konzentration auf pH-Wert oder NDF-Verdaulichkeit beobachtet. Die Autoren

schließen einerseits aus ihren Ergebnissen, dass der minimale P-Bedarf für eine optimale NDF-Verdaulichkeit zwischen 1,61 und 2,58 mmol P/L liegt, da sie keine Steigerung durch höhere P-Konzentrationen beobachten konnten.

KOMISARCZUK et al. (1988) kultivierten *Fibrobacter* (vormals *Bacteroides*) *succinogenes* unter anaeroben Bedingungen in einem flüssigen Kulturmedium, welches ausreichend (3,23 mmol P/L) oder mangelhaft mit P (0,16 mmol/L) versorgt war und als Substrat 0,3 % Cellobiose enthielt. In einem ersten Versuch stellten sie fest, dass die mikrobielle Proteinsynthese bei mangelhafter P-Versorgung um 65 % reduziert war. Es wurde vermutet, dass dies auf einen Mangel an Nukleinsäuren zurückzuführen ist, da ebenfalls die ATP-Konzentration im Medium gesunken war. ATP kann unter P-Mangelbedingungen als Ribose-Phosphat zur Synthese von Nukleinsäuren genutzt werden (CHAPMAN und ATKINSON, 1977 zitiert bei KOMISARCZUK et al., 1987b). In einem weiteren Versuch wurde ebenso der Abbau von mit Natronlauge behandeltem Stroh und Cellulose in Form von Filterpapier (Whatman Nr. 1) bei einer P-Zugabe von nur 0,16 mmol/L Medium eingeschränkt, die Reduktion des Abbaus war allerdings nicht so ausgeprägt wie die der Proteinsynthese.

Der P-Bedarf, der aus den geschlossenen Inkubationsversuchen abgeleitet wurde, scheint höher zu liegen, als der, der sich aus den Ergebnissen der offenen Inkubationssystemen ergibt.

3 Material und Methoden

Offene Fragestellungen:

Nach Durchsicht der Literatur ergeben sich einige offene Fragen zum Themenbereich des P-Bedarfs der Mikroorganismen des Pansens:

- Kann das N:P-Verhältnis in den Pansenmikroorganismen als konstant angesehen werden und führt die Kenntnis des N:P-Verhältnisses in den mikrobiellen Fraktionen Protein, Fett und Kohlenhydraten zu einer differenzierteren Abschätzung des P-Bedarfs der Pansenbakterien ?
- Führt die schrittweise Absenkung der P-Versorgung mit der Pufferlösung zu einer Adaptation der Mikroorganismen an eine knappe P-Versorgung ?
- Wie wird der Futter-P von den Mikroorganismen bei einer knappen P-Versorgung genutzt ?
- Ab welcher P_a -Konzentration im Inkubationsmedium schränken die Pansenmikroorganismen ihre fermentativen Leistungen ein ?
- Gibt es Unterschiede im P-Bedarf der cellulolytischen oder amylolytischen Bakteriengruppen im Pansen ?

Daraus ergaben sich für die eigenen Untersuchungen die folgenden Versuchsansätze:

Chemische Fraktionierung der Pansenbakterien

In einem ersten Versuch wurden die Referenzbakterien in die Fraktionen Fett, Protein und Rest aufgeteilt und der N- und P-Gehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt. Als Referenzbakterien wurden Pansenmikroben aus flüssigem (liquid associated bacteria = LAB) und aus strukturiertem (solid associated bacteria = SAB) Panseninhalt von Schafen isoliert. Der Begriff „Referenzmikroben“ unterstreicht, dass nicht die Gesamtheit der Mikroorganismen des Pansens untersucht wurde.

In vitro Versuche zum P-Bedarf

In *in vitro* Versuchen (offen und geschlossen) wurden dann die Auswirkungen einer unterschiedlichen P-Versorgung auf das mikrobielle Wachstum und die fermentativen Umsetzungen der Mikroorganismen geprüft und der P-Bedarf daraus abgeleitet.

3.1 Versuch I: Fraktionierung der Pansenmikroben

3.1.1 Gewinnung der Referenzmikroben

Sammlung des Panseninhaltes

Acht mit einer Pansenfistel versehene Schafe dienten in allen Versuchen als Spendertiere für flüssigen und strukturierten Panseninhalt. Die Spendertiere erhielten pro Tag 600 g Heu und 600 g Krafffutter, wobei $\frac{1}{3}$ der Ration morgens, $\frac{2}{3}$ abends verabreicht wurden. Sie wurden in Gruppen gehalten, ihnen stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Entnahme des Panseninhaltes erfolgte vor der Morgenfütterung. Für den flüssigen Panseninhalt wurde ein am Ende perforierter Metallstab, für den strukturierten Panseninhalt ein Plastikrohr ($\varnothing$ 1 cm) durch die Pansenfistel in den dorsalen Pansensack eingeführt, wobei Stab und Rohr an eine Vakuumpumpe angeschlossen waren. Der Panseninhalt wurde in eine 2 Liter fassende Glasflasche geleitet, die sich in einem mit 39°C warmem Wasser gefüllten Eimer befand. Der Panseninhalt von mindestens zwei Tieren wurde vereinigt um tierindividuelle Unterschiede zu vermeiden, dann unverzüglich ins Labor verbracht und dort je nach Verwendung (LAB- oder SAB-Isolierung) weiter verarbeitet.

Isolierung der Referenzmikroben aus dem flüssigen Panseninhalt

Die Bakterienfraktion der LAB wurde aus dem flüssigen Panseninhalt durch Differentialzentrifugation nach BRANDT und ROHR (1981) isoliert. Für die Gewinnung der LAB zur chemischen Fraktionierung wurde der flüssige Panseninhalt von sechs unterschiedlichen Sammeltagen verwendet. Um grobe Futterpartikel zu beseitigen wurde der Pansensaft vorab durch vier Lagen Mull gefiltert. Bis zur Zentrifugation wurden die Proben bei -18°C gelagert.

Die Differentialzentrifugation wurde wie folgt durchgeführt:

Um kleinere Futterreste und Protozoen zu entfernen, wurde die Probe für fünf Minuten bei 1500 *g in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und die Bakterien wurden aus dem Überstand innerhalb von 20 Minuten abgetrennt (4°C, 30.000 *g). Das Sediment dieses Schrittes wurde einem dreimaligen Waschen unterzogen und dafür zwei Mal mit NaCl-Lösung (0,9 %) und

ein Mal mit Aqua bidest aufgeschwemmt und jeweils 20 min bei 30.000 *g zentrifugiert. Dieses Verfahren liefert nach Angaben von BRANDT und ROHR (1981) ein Bakteriensediment von hohem Reinheitsgrad ohne Protozoen und mit nur kleinen Verunreinigungen durch Futterpartikel. Bis zur Gefriertrocknung wurden die Proben bei -18° aufbewahrt.

Isolierung der Referenzmikroben aus dem strukturierten Panseninhalt

Die Bakterienfraktion der SAB sollte durch die Kombination von Kneten und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung nach der bei MERRY und MCALLAN (1983) unter „Mechanical pummeling“ angegebenen Weise von den Fasern des strukturierten Panseninhaltes abgelöst werden.

Der strukturierte Panseninhalt aus zwei getrennten Sammlungen wurde durch vier Lagen Mull gepresst, dieses Filtrat wurde dem flüssigen Panseninhalt zugerechnet. Der im Mull verbliebene, strukturierte Panseninhalt wurde gewogen und in 100 g Portionen in einem Becherglas mit NaCl-Lösung versetzt (Verhältnis 1:3,2 (w/v)) und für 3 min mit einem Pürierstab (Typ 100, Fa. ESGE) homogenisiert. Das Homogenat wurde bis zum Kneten zwischen zwei Metallplatten (Stomacher, Fa. Kleinfeld Labortechnik; Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere, Universität Bonn) bei -18° gelagert. Nach dem Auftauen wurden etwa 100 mL der Probe in dickwandige Polyethylenbeutel (Bags 6141, Fa. Seward) und zusätzlich in Autoklavierbeutel (Katalognr. 1299811, Fa. Qualilab) gegeben und 5 min im Stomacher geknetet. Alle Proben wurden während der zeitaufwändigen Verarbeitung im Stomacher in Styroporkisten, die Kühlakkus enthielten, aufbewahrt. Nach dem Kneten im Stomacher wurde die homogenisierte und geknetete Probe erneut durch vier Lagen Mull gefiltert und die festen Rückstände dann einer Waschprozedur unterzogen. Dafür wurden sie gewogen, mit physiologischer NaCl-Lösung im Gewichtsverhältnis von 1:1 aufgeschwemmt und erneut durch vier Lagen Mull gefiltert. Die Waschprozedur wurde ein Mal wiederholt, anschließend wurde das Filtrat und die Waschlösung vereinigt und bis zur Differentialzentrifugation bei -18° in Plastikflaschen aufbewahrt.

Die Isolierung der Bakterien wurde prinzipiell wie für die LAB beschrieben durchgeführt, dabei wurde die Durchflusszentrifuge (Contifuge Stratos, Fa. Kendro)

des Instituts für pharmazeutische Biologie (Universität Bonn) benutzt. Die Abtrennung erfolgte bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $26.040 \times g$ mit einer Durchflussrate von 100 mL/min (4°C). Daran schloss sich ein jeweils halbstündiges Waschen mit einer Durchflussrate von 330 mL NaCl-Lösung (0,9 %) pro Minute bzw. 200 mL Aqua dest pro Minute an. Das Sediment wurde aus dem Abscheider herausgekratzt und bei -18°C bis zur Gefriertrocknung gelagert. Die gefriergetrockneten Referenzmikroben wurden dann im Mörser pulverisiert und in Plastikbechern bei Raumtemperatur aufbewahrt.

In Abbildung 2 ist das Vorgehen bei der Isolierung der Referenzmikroorganismen LAB und SAB schematisch dargestellt.

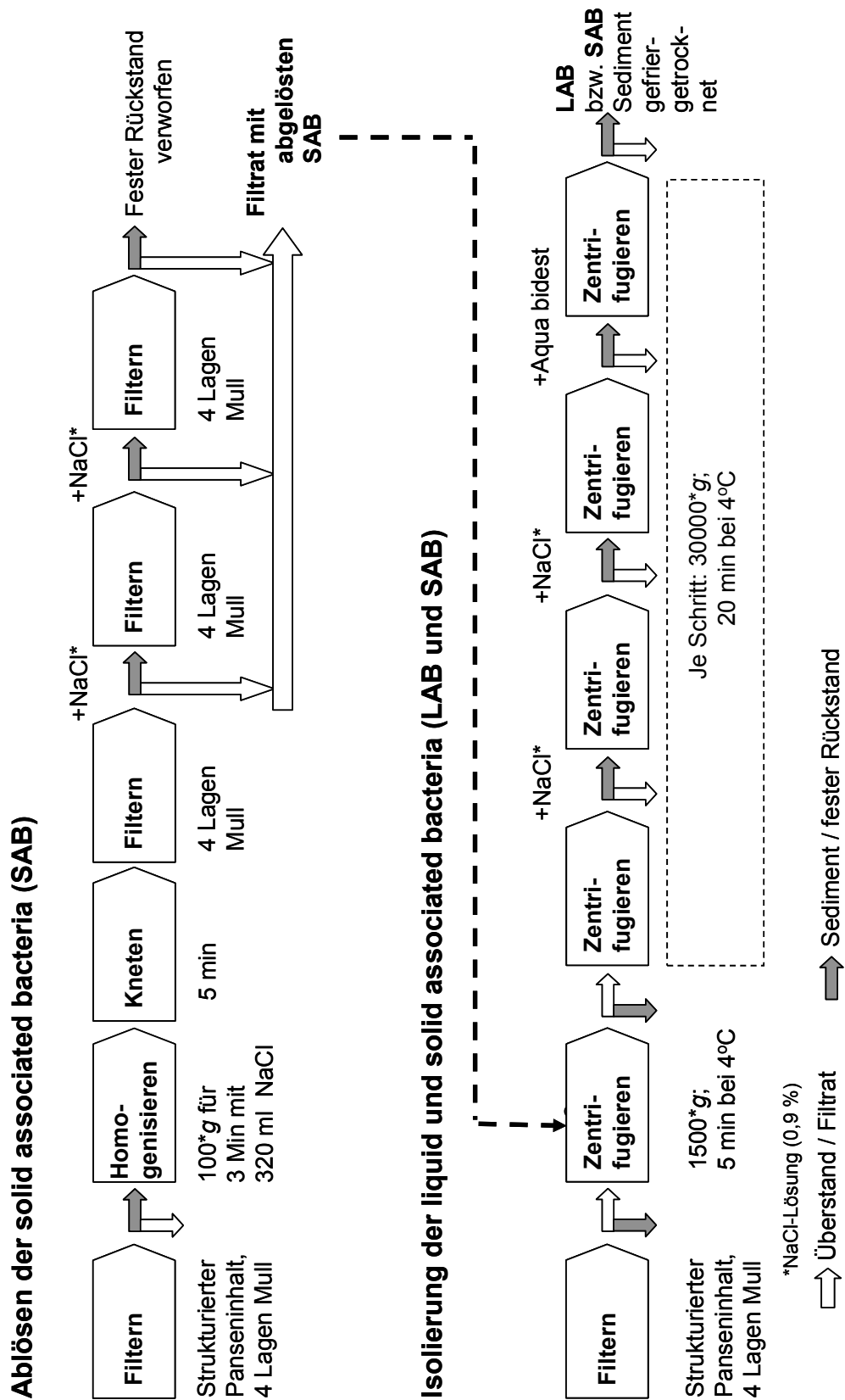


Abbildung 2: Isolierungsschema der Referenzmikroben

3.1.2 Analysen

Für alle Analysen wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt, bei der eine Abweichung bis zu 3 % toleriert wurde. Bei einigen Analysen stand nicht genügend Probenmaterial zur Wiederholung der Analysen zur Verfügung, so dass Abweichungen bis zu 5 % akzeptiert werden mussten.

3.1.2.1 Bestimmung der Gehalte an Trockenmasse, Rohasche, Stickstoff und Phosphor in den Referenzmikroben

Die Trockenmasse und Rohasche der Referenzmikroben wurde nach den Analysenvorschriften von NAUMANN und BASSLER (1976) bestimmt. Die N-Bestimmung wurde nach Dumas (Typ FP-328, Fa. Leco) durchgeführt.

Zur P-Bestimmung wurde auf die bei NAUMANN und BASSLER (1976) beschriebene Vanadat-Molybdat-Methode zurückgegriffen, wobei ein Spektralphotometer der Firma Beckmann (DU-62) bei einer Wellenlänge von 435 nm eingesetzt wurde. Die Erstellung der Messlösung erfolgte aus Aschelösungen, die nach folgendem Schema erstellt wurden:

Nach dem Auswiegen der Aschen wurden diese zwei Mal mit 5 mL verdünnter HCl (1:1 (v/v)) übergossen und im Sandbad eingedampft. Nach Zugabe von 5 mL verdünnter HNO₃ (1:1 (v/v)) und kurzem Erhitzen wurden die Lösungen über einen Weißbandfilter quantitativ in Messkolben überführt. Der Filter wurde anschließend mit heißem Aqua dest säurefrei gewaschen. Nach Erkalten wurde der Messkolben bis zum Eichstrich aufgefüllt. Aus den so erstellten Aschelösungen wurde nach Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung die Messlösung hergestellt.

3.1.2.2 Validierung der Fettextraktion und Fällung

In Vorversuchen sollte die Eignung der Analysenverfahren überprüft und das methodische Vorgehen festgelegt werden. Die Menge an gewonnenen Referenzmikroben war begrenzt, daher wurde bei der Validierung auf andere Mikroorganismen zurückgegriffen.

Für die Überprüfung der Fettextraktion und der P-Bestimmung im Fett wurde diese an den Stämmen *Halomonas elongata* (gramnegativ), einem Gemisch aus *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* (grampositiv) und an handelsüblicher Backhefe

(*Saccharomyces cerevisiae*) durchgeführt (vgl. Tabelle A 1). Alle Präparate waren gefriergetrocknet und lagen in pulverisierter Form vor. Als Maß der Eignung der Methode galt die Wiederfindung des Phosphors in den einzelnen Fraktionen, die in der Summe mindestens 90 % des P-Gehaltes der Mikroorganismen ausmachen sollten.

$$(1) \quad \text{Wiederfindung}_{\text{Fett}} [\%] = \frac{P_{\text{Fett}} [\text{g}] + P_{\text{Extraktionsrückstand}} [\text{g}]}{P_{\text{Total}} [\text{g}]} * 100$$

Die Eignung der bei LICITRA et al. (1996) beschriebenen Proteinfällung wurde anhand der Backhefe überprüft. Da die Proteinfällung an fettfreien Proben durchgeführt werden sollte, wird des Weiteren der Ausdruck „fällbarer Rückstand“ und „Filtrat“ statt Reinprotein-N und NPN verwendet. Auch hier galt eine P-Wiederfindung von über 90 % in der Summe der Fraktionen als Maßstab zur Eignung.

$$(2) \quad \text{Wiederfindung}_{\text{Proteinfällung}} [\%] = \frac{P_{\text{fällbarerRückstand}} [\text{g}] + P_{\text{Filtrat}} [\text{g}] + P_{\text{Fett}} [\text{g}]}{P_{\text{Total}} [\text{g}]} * 100$$

Diese Vorversuche führten zu der nun beschriebenen Durchführung der Analysen an den Referenzmikroben.

3.1.2.3 Unterteilung der Referenzmikroben in die Fraktionen Fett, fällbarer Rückstand und Filtrat

Fraktion Fett

Es sollte der P- und N-Gehalt des Fettes der Referenzmikroben ermittelt werden. Da die Zellmembran der Bakterien Phospholipide enthält (ANDERSSON, R.J., 1939; BUCHOLTZ UND BERGEN, 1973), wurde zunächst vermutet, dass dort ein größerer Anteil an P zu finden sei. Die Phospholipide sollten daher quantitativ extrahiert werden. Dazu wurde auf die Methode von FOLCH et al. (1957) zurückgegriffen.

Die Fettextraktion nach FOLCH et al. (1957) wurde in einer modifizierten Soxhlet-Henkel-Apparatur (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Bonn) vorgenommen.

Im Folgenden wird der Begriff „Fett“ für den Extrakt verwendet, der nach der Methode von FOLCH et al. (1957) gewonnen wurde.

Durchführung der Fettextraktion:

Es wurden zwischen 0,5 g und 3,0 g gefriergetrocknete Bakterien in gefaltete, aschefreie Filter eingewogen, dann in beschriftete Extraktionshülsen gegeben und diese an der Öffnung mit Watte verschlossen. 70-100 mL des Extraktionsgemisches (Dichlormethan:Methanol, 1:1 (v/v)) wurden in mit Glasperlen versehene und bei 100 °C getrocknete und nach dem Abkühlen gewogene Rundkolben (250 mL Volumen) gefüllt. Die Extraktionshülse wurde in die Extraktionseinheit der modifizierten Soxhlet-Henkel-Apparatur gegeben und vier Stunden extrahiert. Nach der vierstündigen Kochzeit wurde das Gemisch aus Extrakt und Extraktionsmittel durch einen Rotationsverdampfer (Vakuumpumpe, Fa. vacumbrand, Unterdruck 350-150 mbar; Wasserbad 45 °C) abgetrennt, so dass das Fett im Rundkolben verblieb. Der Rundkolben wurde für 30 min bei 100°C getrocknet und nach Erkalten zurückgewogen. Der in der Extraktionshülse verbliebene Rückstand wurde bis zur weiteren Analysen auf P und N im verschlossenen Becher aufbewahrt. Der Fettgehalt wurde wie folgt berechnet.

$$(3) \quad \text{Fett [g/kg]} = \frac{\text{Gewicht Rundkolben}_{\text{nach Trocknung}} [\text{g}] - \text{Gewicht Rundkolben}_{\text{leer}} [\text{g}]}{\text{Einwaage} [\text{kg}]}$$

In Abbildung 3 ist die verwendete modifizierte Soxhlet-Henkel-Analge des Instituts für Lebensmittelchemie (Universität Bonn) dargestellt.

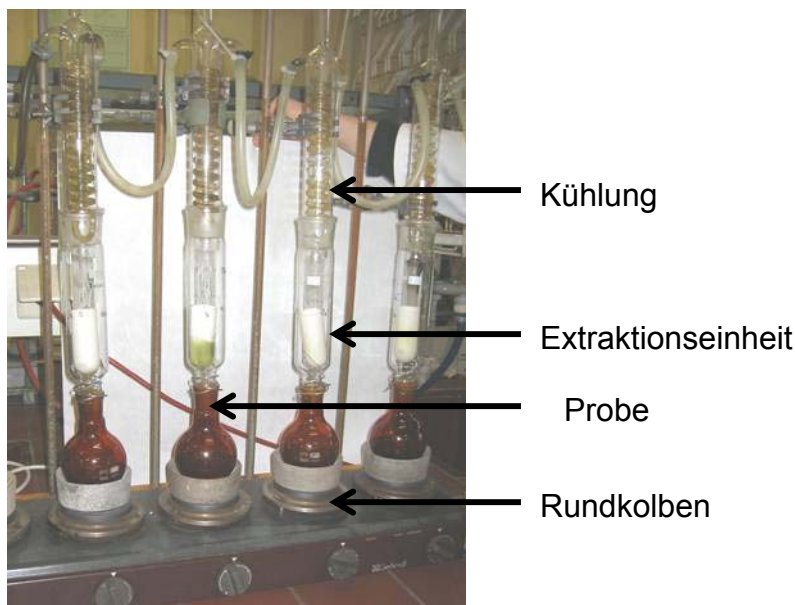


Abbildung 3: Bild der modifizierten Soxhlet-Henkel-Anlage (Institut für Lebensmittelchemie; Universität Bonn)

N- und P-Bestimmung im Fett der Referenzmikroben

Für die P-Bestimmung wurde das Fett, welches sich nach der Fettextraktion im Rundkolben befand, wieder mittels Extraktionslösung gelöst und quantitativ in einen Porzellantiegel überführt. Dazu wurde die Wand des Rundkolbens mit dem Dichlormethan-Methanol-Gemisch mehrere Male abgespült, dann das gelöste Fett mit einer Glaspipette vom Rundkolben in einen Porzellantiegel überführt. Um möglichen Tropfverlusten vorzubeugen wurde ein gewogenes, aschefreies Filterpapier beim Überführen unter die Glaspipette gehalten. Das Filterpapier wurde dann mit verascht. Die Erstellung der Aschelösung erfolgte wie unter 3.1.2.1 beschrieben, es wurden allerdings insgesamt 15 mL verdünnter HCl (1:1 (v/v)) verwendet, da in einem Schritt der Rand des jeweiligen Tiegels mit einem Wischer und verdünnter HCl (1:1 (v/v)) abgewischt wurde um am Rand befindliche Asche zu lösen.

Für die N-Bestimmung wurde das Fett wie oben beschrieben aus dem Rundkolben gelöst, auf ein Uhrglas getropft und über Nacht unter einem Abzug getrocknet. Dies wurde solange wiederholt bis das Fett quantitativ aus dem Rundkolben entfernt war.

Dann wurde ein ca. 3 x 5 cm großes Stück Alufolie zurechtgeschnitten, gewogen und das Fett mit einem kleinen Spatel vom Uhrglas abgekratzt und auf die Alufolie gegeben. Diese wurde erneut gewogen und die N-Bestimmung nach der Methode von Dumas (Typ FP-328, Fa. Leco) durchgeführt. Der so erhaltene N-Gehalt im Fett wurde auf den N-Gehalt in den Referenzmikroben bzw. der Hefe umgerechnet.

Fraktion Protein

Die Proteinfällung sollte nach der bei LICITRA et al. (1996) unter „Alternative determination of NPN using trichloroacetic acid (TCA)“ beschriebenen Methode durchgeführt werden. Allerdings erscheint die Verwendung des Begriffes „Protein“ und „Nicht-Protein-Stickstoff“ (NPN) in diesem Zusammenhang als nicht korrekt, da der fettfreie Extraktionsrückstand der Referenzmikroben mit TCA gefällt wurde und nicht wie bei LICITRA et al. (1996) das Rohprotein. Es soll daher der Begriff „fällbarer Rückstand“ (fR) die Fraktion beschreiben, die nach der Fällung mit TCA im Filter verbleibt, und „Filtrat“ (F) die Fraktion, die sich durch TCA nicht fällen lässt und somit im Filtrat nach der Fällung erscheint. Eine genauere Unterteilung dieser letzten Fraktion in Kohlenhydrate und andere Stoffe konnte nicht durchgeführt werden, da die Kohlenhydrate eine sehr heterogene Stoffgruppe sind. Eine weitere Trennung in Kohlenhydratgruppen und die P-Bestimmung in diesen Gruppen hätte den Rahmen dieser Arbeit überschritten.

Durchführung der Fällung:

Es wurden 0,5 g der gefriergetrockneten, fettfreien Referenzmikroben in ein Becherglas gegeben. Wenn der P-Gehalt der Fraktionen bestimmt werden sollte, wurde der Extraktionsrückstand über Nacht bei 100°C getrocknet und 0,5 g wurden direkt in das Becherglas eingewogen. Sollte der N-Gehalt in den Fraktionen bestimmt werden, wurden bereits zur Fettextraktion 0,5 g eingewogen, damit der Extraktionsrückstand lediglich vom Filterpapier quantitativ in das Becherglas überführt werden musste. Dadurch wurden die bei der Trocknung eventuell auftretenden N-Verluste umgangen. Die Probe wurde nun mit 50 mL Aqua dest übergossen und für 30 Minuten unter mehrmaligem Schütteln stehen gelassen. Dann wurden 10 mL 10

%ige TCA zugegeben, wieder 30 Minuten unter mehrmaligem Schütteln stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch durch einen N-freien Whatmanfilter (Macherey und Nagel, Nr. 54) in 100 mL Messkolben filtriert. Das Becherglas wurde mit Aqua dest ausgespült, der Filter ein Mal mit Aqua dest abgespült und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit Aqua dest aufgefüllt.

P- und N-Bestimmung im fällbaren Rückstand

Für die P-Bestimmung in der Fraktion fällbarer Rückstand wurde vor dem Veraschen eine Spatelspitze Kaliumoxalat ($K_2C_2O_4$) auf den fällbaren Rückstand gegeben um die Bildung von Pyrophosphaten zu vermeiden. Die Erstellung der Aschelösungen erfolgte wie unter 3.1.2.1 beschrieben. Die N-Bestimmung im fällbaren Rückstand erfolgte nach quantitativer Überführung des Filters mit dem Rückstand nach TCA-Fällung in einen Aufschlußkolben (NAUMANN und BASSLER, 1976).

P- und N-Bestimmung im Filtrat

Für die P-Bestimmung im Filtrat wurden insgesamt 60 mL Filtrat in einem Porzellantiegel bis zur Trockene auf dem Sandbad eingedampft. Die Aschelösungen wurden wie unter 3.1.2.1 erstellt, allerdings wurden wie bei der P-Bestimmung in der Fraktion Fett 15 mL verdünnte HCl verwendet. Eine Bestimmung des N-Gehaltes im Filtrat war nicht möglich, da bei der Destillation des Ammoniaks der Farbindikator zerstört wurde. Der N-Gehalt in der Fraktion Filtrat wurde wie folgt berechnet.

$$(4) \quad N_{\text{Filtrat}} = N_{\text{Gesamt}} - N_{\text{Fett}} - N_{\text{fällbarer Rückstand}}$$

In Abbildung 4 wird der Analysengang zur Fraktionierung der Referenzmikroben LAB und SAB in Fett, fällbarer Rückstand und Filtrat schematisch wiedergegeben. Dabei stellt der unausgefüllte Pfeil den Analysenpfad für P dar, der grau unterlegte den für N.

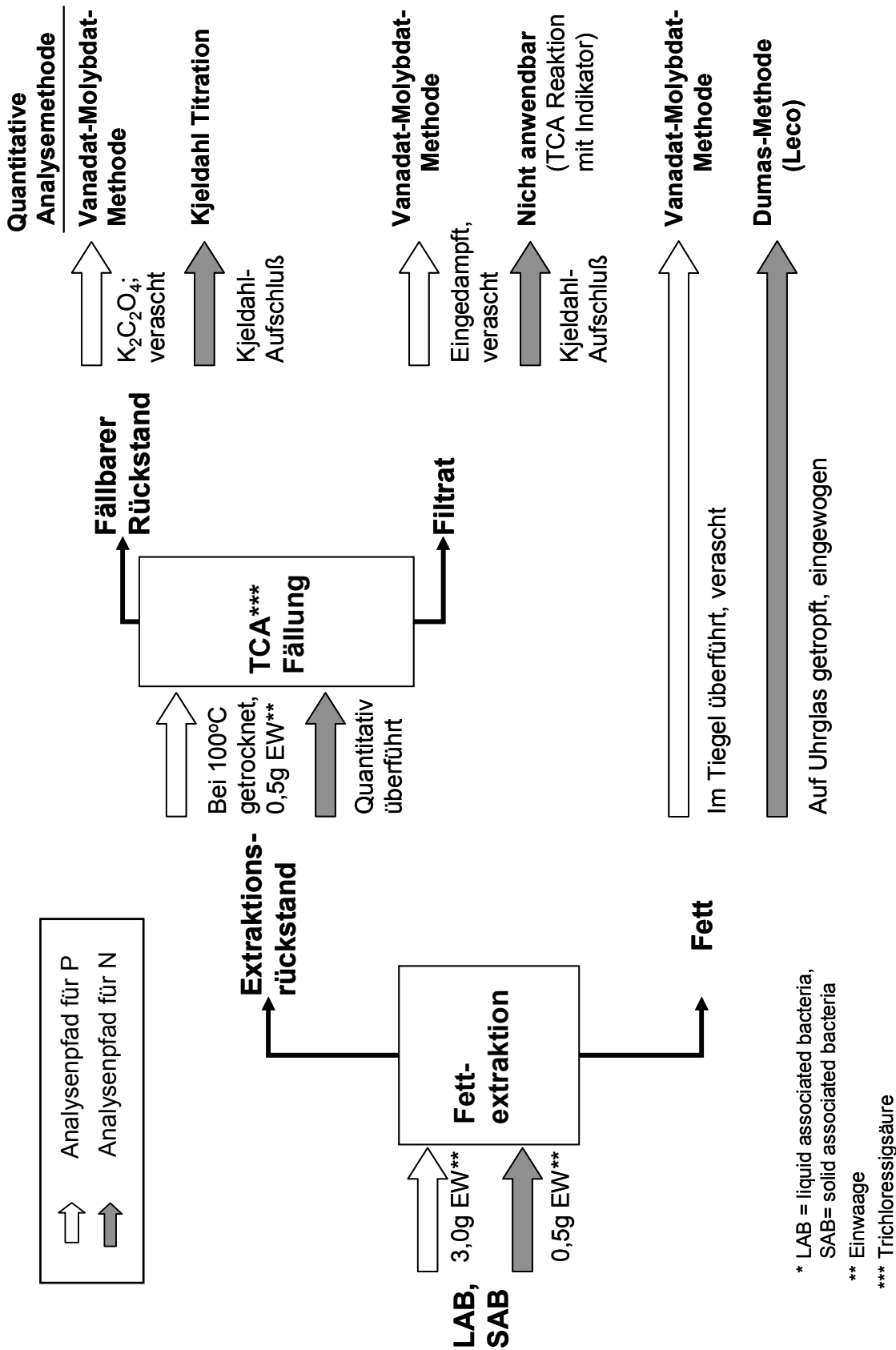


Abbildung 4: Analysenschema zur Bestimmung der P- und N-Gehalte

3.2 *In vitro* Versuche

Der P-„Leistungsbedarf“ der Pansenmikroben wurde nun näher eingegrenzt, wobei der Nährstoffabbau, die Fermentationsendprodukte und das mikrobielle Wachstum als Leistungsmerkmale untersucht wurden. Es sollte geprüft werden, ob und ab welcher P-Versorgung die Untersuchungsmerkmale wie z.B. die Bildung flüchtiger Fettsäuren und das mikrobielle Wachstum eingeschränkt werden.

Da es die endogene P-Sekretion über den Speichel schwierig macht, im Tier eine bestimmte P-Versorgung im Pansen zu erreichen, wurden die weiteren Untersuchungen an *in vitro* Systemen durchgeführt.

Für eine erste Abschätzung des P-Leistungsbedarfs kam die im Institut vorhandene Rumen Simulation Technique (RUSITEC) zum Einsatz. Diese von CZERKAWSKI und BRECKENRIDGE (1977) entwickelte semikontinuierliche Langzeitinkubationsmethode ermöglicht es, die Vorgänge im Pansen über einen längeren Zeitraum zu simulieren. Dabei kann der P-Eintrag über die Pufferlösung (Speichel) und über das Futter kontrolliert werden. Es ist möglich, den Nährstoffabbau und die Fermentationsendprodukte (flüchtige Fettsäuren, Fermentationsgase) zu erfassen und durch den Einsatz von markiertem N (^{15}N) im Puffer mit der Kombination aus Isotopenverteilungs- und -verdünnungsanalyse das mikrobielle Netto-Wachstum abzuschätzen.

In einem weiteren *in vitro* Versuch sollte darüber hinaus geprüft werden, ob der P-Bedarf der Mikroben zum Abbau von Cellulose bzw. von Kartoffelstärke und Pektin unterschiedlich ist. Dies wurde anhand des Hohenheimer Futterwerttests untersucht, wobei die Gasbildung nach 8 bzw. 24 h und die nach 24 h gemessenen flüchtigen Fettsäuren ($\text{C}_2\text{-C}_5$) als Untersuchungsmerkmale dienten.

3.3 Versuch II: Rumen Simulation Techniques (RUSITEC)

Ziel war es, den P-Eintrag über die kontinuierlich zugeführte Pufferlösung zu variieren und eine Futterration zu konzipieren, die einen möglichst geringen P-Gehalt aufwies, aber trotzdem aus wiederkäuergerechten Komponenten bestand.

Inkubationsanlage

Die verwendete Inkubationsanlage bestand aus sechs Fermentern aus Glas mit einem Fassungsvermögen von je 1,1 Liter. In jedem Fermenter, der aufrecht in einem auf 39°C temperierten Wasserbad (Einhängethermostat AT110, Fa. Heto Lab Equipment) fixiert war, bot ein gläserner Innenbehälter mit perforiertem Boden und Deckel, Platz für zwei Futterbeutel. Über eine Führungsstange war jeder Fermenter mit einer Hubplatte verbunden, die über einen Elektromotor die Auf- und Abwärtsbewegung des Innenbehälters (8 Hübe pro Minute) steuerte und somit die kontinuierliche Durchmischung der flüssigen und festen Phase (Futter) bewirkte. Ein Zulaufschlauch am Boden des Fermenters leitete die entsprechende Pufferlösung mit einer Rate von ca. 0,6 L pro Tag in den Fermenter. Der kontinuierliche Abfluss aus dem System, der im weiteren als Überlauf bezeichnet wird, wurde über eine Öffnung im Deckel des Fermenters über einen Schlauch in einen Erlenmeyerkolben (Überlaufgefäß) gedrückt. Der Überlauf eines Tages stellte somit eine repräsentative Probe des Fermenterinhaltes über 24 h dar. Eine weitere Öffnung im Fermenterdeckel war mit einem Drei-Wege-Hahn versehen, der eine Probenentnahme des Fermenterinhaltes bei laufendem System ermöglichte. Ein Drei-Wege-Hahn am Verschluss des Überlaufgefäßes diente zum Anhängen des Gasbeutels. Je drei Überlaufflaschen standen in einer Styroporkiste, in der Kühlakkus die Temperatur unter 10°C hielten um mikrobielle Aktivität im Überlaufgefäß zu unterbinden.

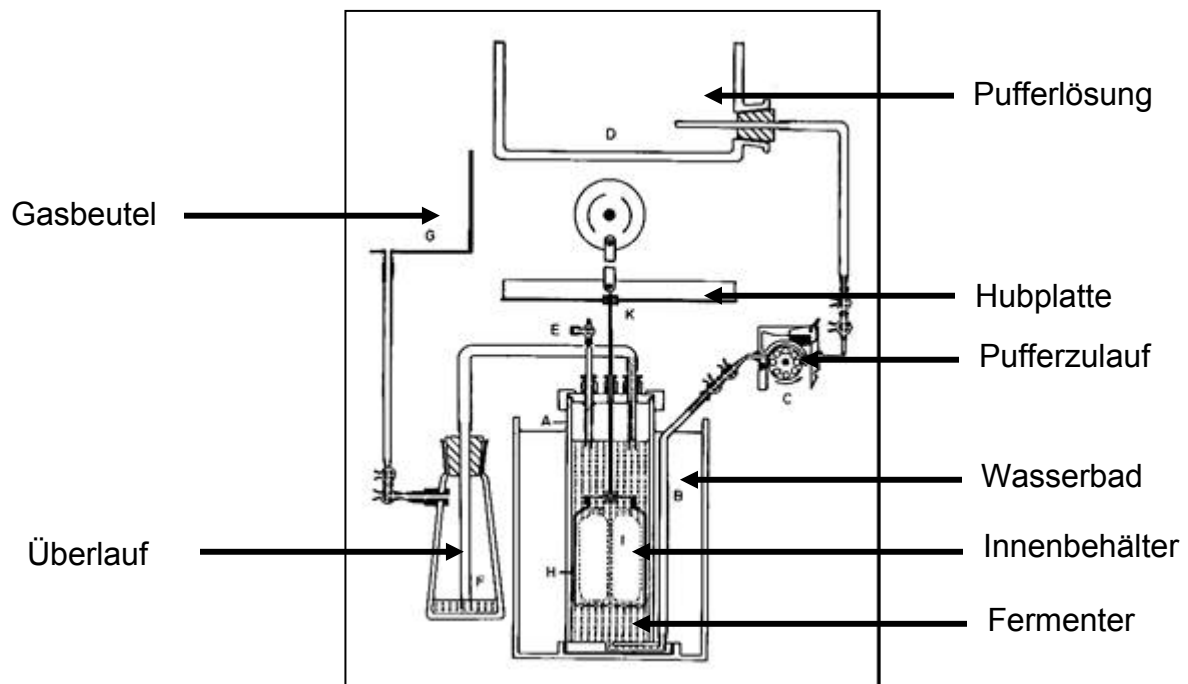


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines RUSITEC-Fermenters

3.3.1 Bedienung

Starttag

Schlauchpumpe und Hubmotor wurden 24 h vor dem eigentlichen Versuchsbeginn gestartet, um mittels Pufferlösung die Luft aus den dünnen Infusionsschläuchen des Pufferzulaufs zu verdrängen. Die Sammlung des flüssigen und strukturierten Panseninhaltes erfolgte am Starttag wie bereits unter 3.1.1 beschrieben.

Der Panseninhalt wurde durch zwei Lagen Mull gefiltert. Der am Mull zurückgebliebene, strukturierte Panseninhalt wurde ausgedrückt und zu je 80 g in sechs Nylonbeutel (Größe 10 x 5 cm; Porengröße 100 µm) gefüllt. Sowohl die gefüllten Nylonbeutel als auch der flüssige Panseninhalt wurden bis zur weiteren Verwendung in einem temperierten (39°C) Wasserbad gelagert, letzterer zusätzlich mit CO₂ begast. In jeden Innenbehälter eines Fermenters wurde ein Nylonbeutel mit strukturiertem Panseninhalt und ein Nylonbeutel mit Versuchsfutter gelegt. Der Fermenter wurde mit 600 mL des flüssigen Panseninhaltes und 500 mL temperierter Pufferlösung aufgefüllt. Durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen der Hubstange konnte ein Teil der eingebrachten Luft entfernt werden. Der Fermenter wurde nun ins

Wasserbad gesetzt, die Hubstange an der Hubplatte arretiert, das Überlaufgefäß angeschlossen und eine Minute mit N₂ begast. Nun wurde der Gasbeutel am Drei-Wege-Hahn des Überlaufgefäßes angeschlossen und das System damit gasdicht verschlossen. Der Elektromotor wurde nach der Arretierung des sechsten Fermenters in Bewegung gesetzt.

Tägliche Routine

Nach 24 stündiger Inkubation wurde pH-Wert und Redoxpotential (Digital-pH-Meter, Fa. Knick) anhand einer Probe (ca. 20 mL) aus dem Fermenterinneren überprüft. Dann wurde der Fermenter mit einem Liter N₂-Gas gespült um die Fermentationsgase in den Gasbeutel zu drücken, der Gasbeutel verschlossen, abgenommen und der Fermenter aus dem Wasserbad genommen. Der Innenbehälter wurde geöffnet und am 2. Versuchstag wurde der Beutel mit strukturiertem Panseninhalt durch einen Beutel mit Versuchsfuttermischung ausgetauscht. An den darauf folgenden Tagen wurde der 48 h inkubierte Futterbeutel (Residuum) entnommen und durch einen mit frischem Futter ersetzt. Das Residuum wurde zuvor zwei Mal mit 30 mL der entsprechenden, temperierten Pufferlösung übergossen und geknetet, ausgedrückt und die so entstandene Waschlösung wieder in den Fermenter gegeben. Nach dem Verschließen des Innenbehälters wurde durch ein Auf- und Abbewegen der Hubstange ein erstes Entweichen der Luft aus dem frischen Futterbeutel erreicht. Der Inhalt des Überlaufgefäßes wurde gewogen, in Probenflaschen abgefüllt und bis zur weiteren Analyse bei –18°C aufbewahrt. Das Überlaufgefäß wurde mit Aqua dest gespült und wieder mit dem Fermenter verbunden. Bevor die Gasbeutel angehängt wurden, wurde das System eine Minute mit N₂-Gas gespült um dann an der Hubplatte arretiert zu werden. Die beschriebene Vorgehensweise war für alle Fermenter gleich.

3.3.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Die Futtermischung war für jeden der sechs Fermenter gleich und bestand aus 7,5 g gehäckselter Maissilage und 7,5 g Kraftfutter. Die Maissilage wurde vor der Zerkleinerung in einer Mulinette 48 h bei 60°C getrocknet. Das Kraftfutter bestand zu

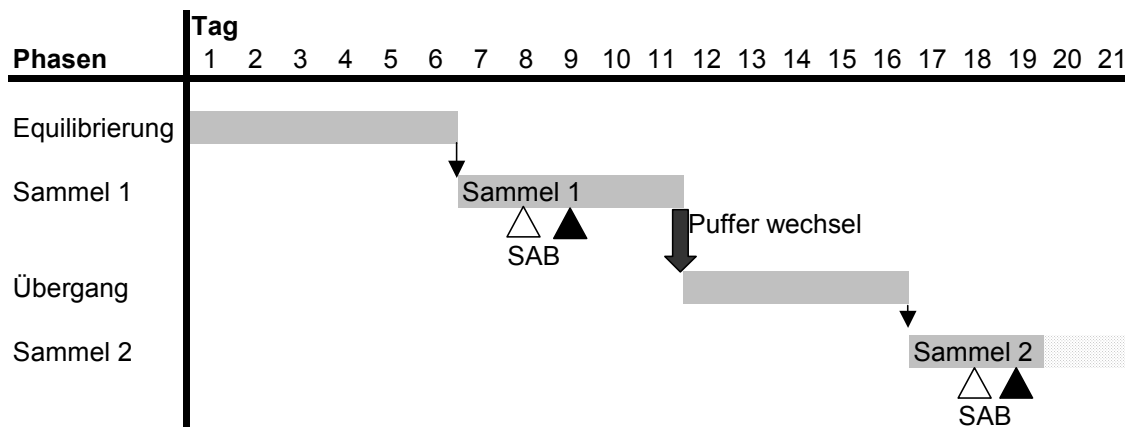
89 % aus schwach melassierten Trockenschnitzeln, 10 % aus Weizenkleber und zu 1 % einer P-freien Vitamin- und Spurenelementvormischung (Tabelle A 2). Bei einem P-Gehalt der Versuchsmischung von 1,7 g P/kg T und einem Rohprotein-Gehalt von 292 g XP/kg T bedeutete dies im Durchschnitt eine tägliche Versorgung mit 24 mg P und 320 mg N über das Futter.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Futtermischung

	Maissilage	Krafffutter
T (g/kg)	947	912
XP (g/kg T)	83,8	208
XA (g/kg T)	40,1	72,8
NDF (g/kg T)	446	463
ADF (g/kg T)	204	196
P (g/kg T)	2,46	0,94

Die Variation der P-Versorgung (0 bis 17,4 mmol P_a /L Puffer) wurde über den kontinuierlich infundierten Puffer erreicht, wobei in je zwei Fermenter die gleiche Pufferlösung geleitet wurde.

Es wurden zwei identische Versuchsdurchgänge durchgeführt mit einer Dauer von 19 bzw. 21 Tagen (vgl. Abbildung 6). An eine sechstägige Equilibrierungsphase schloss sich eine fünftägige erste Sammelphase an. Am darauf folgenden Tag wurde der Phosphoreintrag über die Pufferlösungen in jedem Fermenter um 8,7 mmol P_a /L reduziert und es wurde eine Übergangszeit von fünf Tagen bis zu steady state Bedingungen gewährt. Es folgte eine zweite, fünftägige Sammelphase, die im ersten Versuchsdurchgang auf Grund eines technischen Defektes nur drei Tage dauerte.



ausgefülltes Dreieck: SAB in Lauf 1, unausgefülltes Dreieck: SAB in Lauf 2

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Verlaufs Versuch II-RUSITEC

Die Messung der Überlaufmenge, des pH-Wertes, des Redoxpotentials, des Gasvolumens und die Zählung der Protozoen erfolgte täglich. Die Konzentration an flüchtigen Fettsäuren, $\text{NH}_3\text{-N}$, P_a sowie die ^{15}N -Anreicherung des $\text{NH}_3\text{-N}$ -Pools im partikelfreien Überlauf und die ^{15}N -Anreicherung der Referenzmikrobenfraktion der LAB erfolgte aus den gepoolten Überläufen (Aliquot) einer Sammelphase. Die ^{15}N -Anreicherung der Referenzmikrobenfraktion der SAB wurde am 8. (Lauf 1) bzw. 7. Tag (Lauf 2) der ersten Sammelperiode und am 19. (Lauf 1) bzw. 17. Tag (Lauf 2) der zweiten Sammelperiode aus den Residuen bestimmt.

3.3.2.1 Erstellung der Pufferlösungen

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen orientierte sich an der von McDOUGALL (1948) gefundenen Zusammensetzung des natürlichen (Parotis-) Speichels, wobei eine Verdünnung von $\frac{2}{3}$ zugrunde gelegt wurde (PRÜSTEL, 1994). In einer ersten Phase wurden drei P_a -Konzentrationen von 17,4 bis 8,7 mmol/L Puffer geprüft, daran schloss sich eine Depletion an, bei der der P-Eintrag eines jeden Fermenters um 8,7 mmol P_a/L Pufferlösung reduziert wurde. Dafür wurde Na_2HPO_4 gegen NaCl und NaHCO_3 ausgetauscht um Pufferkapazität und Osmolarität auf gleichem Niveau zu halten (KOMISARCZUK et al., 1987a). Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

P-Stufe, mmol/L	17,4	13,1	8,7	4,4	0
	g ad 1000 mL Aqua dest				
NaHCO ₃	6,53	7,07	7,60	8,14	8,67
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	6,20	4,65	3,10	1,55	0
NaCl	0	0,24	0,47	0,71	0,94
Na/K/Ca/Mg-Lsg.*			6,6 mL		
¹⁵ NH ₄ Cl**			1 mmol N/L		

*enthält 47,0 g NaCl, 57,0 g KCl, 5,3 g CaCl₂*6 H₂O; 12,8 g MgCl₂*6H₂O in 1000 mL Aqua dest

**enthält 13,375 mg NH₄Cl mit 13 % ¹⁵N-Überschuß in 1000 mL Aqua dest

Die Beigabe von ¹⁵N-angereichertem NH₄Cl im Puffer ermöglichte aus einer Kombination von Isotopenverdünnungs- und -verteilungsanalyse eine Abschätzung der mikrobiellen Proteinsynthese.

3.3.3 Probenaufbereitung und Analytik

3.3.3.1 Analysen der Pufferproben

P_a-Konzentration und ¹⁵N-Anreicherung im Puffer

Von jeder angesetzten Pufferlösung wurden 50 mL bei –18°C aufbewahrt. 25 mL der Pufferlösung wurden in einen Kjeldahlkolben eingewogen und N wurde bestimmt. Die Messung der ¹⁵N-Anreicherung erfolgte aus dem Kjeldahl-Destillat, welches zuvor in eine Vorlage aus verdünnter HCl destilliert worden war.

Die Bestimmung der P_a-Konzentration des Puffers erfolgte mit der Molybdat-Vanadat-Methode (NAUMANN und BASSLER, 1976). Zur Erstellung der Messlösung wurden 0,5-5 mL der jeweiligen Pufferlösung in einen 50 mL Messkolben pipettiert, dann mit 2,5 mL verdünnter HNO₃-Lösung (1:2, v/v) versetzt und kurz erhitzt. Anschließend wurden 15 mL VM-Reagenz zugegeben und nach Erkalten der Lösung

bis zum Eichstrich mit Aqua dest aufgefüllt. Die photometrische Bestimmung erfolgte wie unter 3.1.2.1 beschrieben.

3.3.3.2 Analysen der Proben aus dem Fermenterinneren

pH-Wert und Redoxpotential

Mit einer Einwegspritze wurde täglich vor dem Futterbeutelwechsel eine Probe des Fermenterinhalt (20 mL) gezogen, die Einwegspritze verschlossen und in einem Wasserbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Messung des pH-Wertes und des Redoxpotentials erfolgte mit einem digitalen pH-Meter (646) der Firma Knick.

Protozoenzählung

Die Zählung der Protozoen erfolgte nach Anfärbung mit Methylgrün (0,6 g Methylgrün, 8,0 g NaCL in 1000 mL Aqua dest) in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Während der Sammelphasen wurde jeder Fermenter täglich ausgezählt.

3.3.3.3 Messung der Fermentationsgase

Das Volumen der Gasbeutel wurde täglich gemessen, wobei das als Spülgas verwendete N₂ mit erfasst wurde. Es kam eine selbst konstruierte Apparatur zum Einsatz, die über das Prinzip der Wasserverdrängung eine Volumenbestimmung ermöglichte. Ein Messzylinder (2 L), an dessen Boden sich ein Drei-Wege-Hahn befand, wurde verkehrt herum so in einen mit Wasser gefüllten Behälter gestülpt, daß sämtliche Luft über den geöffneten Drei-Wege-Hahn entwich. Der zu messende Gasbeutel wurde an den Drei-Wege-Hahn angeschlossen, der Messzylinder aus dem Wasser gezogen und der so erzeugte Unterdruck führte zu einem Einströmen der Fermentationsgase aus dem Gasbeutel in den Messzylinder. Anhand der Skala des Messzylinders konnte das Volumen aufgrund des Wasserspiegels auf ± 100 mL abgelesen werden. Von den so ermittelten Werten wurden 1000 mL für das „Spülgas“ N₂ abgezogen.

3.3.3.4 Analysen aus dem Überlauf

Bestimmung der Überlaufmenge

Die Überlaufmenge wurde täglich während des Futterbeutelwechsels gravimetrisch ermittelt.

Analysen im partikelfreien Überlauf

Es wurden etwa 120 mL der gepoolten Überlaufprobe einer Sammelphase der Differentialzentrifugation nach BRANDT und ROHR (1981) unterzogen (vgl. 3.1.1). Nach der Abtrennung der Futterpartikel und Protozoen (1500*g) und der anschließenden Zentrifugation bei 30.000 *g wurde der Überstand, der als partikelfreier Überlauf bezeichnet wird, zur Analyse der P_a-, NH₃-N- und VFA-Konzentration herangezogen.

P_a-Konzentration des partikelfreien Überlaufs

Die Bestimmung der P_a-Konzentration des partikelfreien Überlaufs erfolgte mit der Molybdat-Vanadat-Methode (NAUMANN und BASSLER, 1976). Zur Erstellung der Messlösung wurden 0,5 mL des partikelfreien Überlaufs in einen 50 mL Messkolben pipettiert und wie unter 3.3.3.1 beschrieben fortgefahren.

NH₃-N-Konzentration des partikelfreien Überlaufs

Die NH₃-N-Bestimmung wurde nach Kjeldahl (NAUMANN und BASSLER, 1976) durchgeführt. Zur Messung der ¹⁵N-Anreicherung wurde die Probe nach der Titration erneut destilliert (Vapodest 2, Fa. Gerhardt), allerdings in eine Vorlage aus verdünnter HCl (2,5 %). In diesem Destillat wurde die ¹⁵N-Anreicherung gemessen (vgl. 3.3.3.7).

Bestimmung der Konzentration an flüchtigen Fettsäuren im partikelfreien Überlauf

Die flüchtigen Fettsäuren Essig-, Propion-, n-Butter- und n-Valeriansäure sowie iso-Butter- und iso-Valeriansäure wurden im partikelfreien Überlauf mittels Gaschromato-

graphen (AutoSystem XL mit Autosampler, Perkin Elmer) bestimmt. Die Probe (1 mL) wurde mit 0,1 mL Ameisensäure (Fa. Merck) versetzt. Es wurden je Probe zwei Einspritzungen à 1 µL durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit externen Standards.

Tabelle 5: GC-Bedingungen

Gerät	AutoSystem mit Autosampler, Perkin Elmer
Säule	Macherey und Nagel, Nr. 723341 PermaBond FFAP-DF 0,25 Länge 25 m Durchmesser innen 0,32 mm Filmdicke 0,21 µm
Detektion	FID (Flammenionisationsdetektor)
Injektion	Split; Splitverhältnis 1:50; Splitfluß 47 L/min
Injektionsvolumen	1 µL
Trärgas	Helium; Trärgasstrom 1 bar ; Vordruck 80 kPa
Temperatur	Injektor 250°C; Detektor 260°C;
Erhitzungsprogramm	102°C → 130°C, (8°C/min) 8 min isotherm → 180°C, (8°C/min) 2 min isotherm
Detektorgas	H ₂ -Fluss 31 mL/min; O ₂ -Fluss 400 mL/min

3.3.3.5 Analysen von Futter vor und nach der Inkubation (Residuen)

Maissilage und Kraftfutter sowie die gepoolten Residuen einer Sammelperiode wurden auf 1 mm vermahlen und nach den Analysenvorschriften von NAUMANN und BASSLER (1976) wurden Trockensubstanz, Rohasche, P, NDF und ADF, sowie N nach Kjeldahl bestimmt (Rohprotein = N*6,25). Ein Teil des Kjeldahl-Destillats der Residuen wurde für die Bestimmung der ¹⁵N-Anreicherung zurückbehalten. Die Residuen waren zuvor nach der Entnahme aus dem Fermenter in vorher gewogene Probenbecher gelegt und 24 h bei –18°C eingefroren worden. Daran schloss sich eine 48 h Trocknung bei 60°C mit anschließender Wägung nach Abkühlung an.

3.3.3.6 Isolierung und Aufbereitung der Referenzmikroben

Referenzmikroben der flüssigen Phase (LAB)

Die LAB-Referenzmikrobenfraktion wurde aus dem Sediment der Differentialzentrifugation (vgl. 3.3.3.4) gewonnen und nach der unter 3.1.1 beschriebenen Waschprozedur für mindestens 24 h bei -18°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Zur Bestimmung der ^{15}N -Anreicherung in den LAB wurde ein Teil des Kjeldahl-Destillats (NAUMANN und BASSLER, 1976) verwendet.

Referenzmikroben der festen Phase (SAB)

Die an den Futterfasern haftenden Mikroorganismen (SAB) wurden nach der bei MERRY und McALLAN (1983) unter „Mercuric chloride“ aufgeführten Weise von den Fasern gelöst. In der Sammelphase wurde an einem Tag das Residuum nicht eingefroren, sondern nach der Entnahme aus dem Fermenter in ein Becherglas gegeben und mit 90 mL einer temperierten (39°C) NaCl-Lösung (0,9 %) und 0,2 mL einer 10 %igen HgCl-Lösung übergossen und anschließend homogenisiert (Pürierstab Typ 100, Fa. ESGE). Das Homogenat wurde bei 39°C in einem Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Dann wurde es in einen Nylonbeutel (äquivalent mit Futterbeutel) gegeben, ausgedrückt und zwei Mal mit 45 mL angewärmter (39°C) NaCl-Lösung übergossen, geknetet und ausgepresst. Aus der gewonnenen Flüssigkeit wurde die SAB-Fraktion durch Differentialzentrifugation (BRANDT und ROHR, 1981) abgetrennt. Die Bestimmung der ^{15}N -Anreicherung erfolgte wie beim LAB-Sediment aus dem Kjeldahl-Destillat (NAUMANN und BASSLER, 1976).

3.3.3.7 Bestimmung der ^{15}N -Anreicherung

Zur Messung der ^{15}N -Anreicherung wurde das Kjeldahl-Destillat verwendet, welches nach der Titration in eine HCl-Vorlage (25 mL konz. HCl/L Aqua bidest) überdestilliert wurde. Die Probe wurde anschließend bei 65°C für zwei Stunden unter Vakuum (Savant Speed Vac, SPD 111V) eingengt. Die eigentliche Messung erfolgte emissionspektrometrisch (NOI-6PC, Fa. FAN), wobei aufgrund der leichten

Verschiebung der Spektrallinien die Erfassung der $^{14}\text{N}_2$ -, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ - und $^{15}\text{N}_2$ -Peaks ermöglicht wird. Die Peakhöhen geben die Intensität der Lichtemission wieder, die proportional zur relativen Häufigkeit der Isotope ^{14}N und ^{15}N sind.

Die absoluten ^{15}N -Werte werden als Atom% ausgewiesen (prozentualer Anteil von ^{15}N - an ^{14}N -Isotopen). Nach Abzug der natürlichen Anreicherung des N von 0,365 Atom% ^{15}N erhält man den ^{15}N -Überschuss. Die angegebenen Werte entsprechen jeweils dem ^{15}N -Überschuss.

3.3.4 Berechnungen

Nährstoffabbau (Verschwinden)

Unter Abbau wird hier die Summe der Nährstoffverluste zusammengefasst, die sich aus dem tatsächlichen mikrobiellen Nährstoffumbau und den rein mechanischen Auswaschungsverlusten der Nährstoffe ergeben. Der englische Begriff „disappearance“ scheint in diesem Zusammenhang sinnvoller, wird aber aus sprachlichen Gründen mit „Abbau“ gleichgesetzt und nur bei Abkürzungen verwendet z.B. Abbau der Organischen Substanz abgekürzt als dOS für disappeared Organische Substanz.

$$(5) \quad \text{Nährstoffabbau [\%]} = \frac{\text{Einwaage [g]} - \text{Rückwaage [g]}}{\text{Einwaage [g]}} * 100$$

Proteinsynthese bzw. Synthese N-haltiger Verbindungen

Die mikrobielle Proteinsynthese wurde aus einer Kombination von Isotopenverteilungs- und -verdünnungsanalyse abgeschätzt.

Verdünnungsanalyse heißt, dass sich durch hinzufügen unmarkierter Substanzen der ^{15}N -Überschuss im Pool und in den Abflüssen im Vergleich zum ^{15}N -Überschuss im Zulauf verringert.

In der Verteilungsanalyse kann aus dem Wissen der eingesetzten Markermenge (Zufluss) und den Konzentrationen in den möglichen Abflüssen aus dem Pool geschlossen werden, welche Mengen umgesetzt wurden. Zur Abschätzung der Proteinsynthese der SAB wird die Verdünnungsanalyse verwendet, die Proteinsynthese der LAB ergab sich aus der Isotopenverteilung.

Solid associated bacteria (SAB)

Der in den Residuen detektierte ^{15}N -Überschuss kann nur mikrobiellen Ursprungs sein, da der N im Futter unmarkiert ist. Über den ^{15}N -Überschuss in den Residuen und SAB und den N-Gehalt in den Residuen kann auf die tägliche Nettosynthese der SAB geschlossen werden.

$$(6) \quad N_{\text{SAB}} [\text{mgN/d}] = \frac{{}^{15}\text{N-Residuum} [\%]}{{}^{15}\text{N-SAB} [\%]} * N_{\text{Residuum}} [\text{mgN/d}]$$

Liquid associated bacteria (LAB)

Die ^{15}N -Menge, die täglich über den Puffer in das System gelangt, ist bekannt. Unterstellt man, dass es neben der ^{15}N -Menge im Überlauf und der ^{15}N -Menge in den SAB keine weiteren ^{15}N -Abflüsse aus dem System gibt, ergibt sich aus der Differenz der Zu- bzw. der Abflüsse und bei Kenntnis des ^{15}N -Überschusses in den LAB die tägliche Nettosynthese der LAB.

(7)

$$N_{\text{LAB}} [\text{mg N/d}] = \frac{{}^{15}\text{N-Puffer} [\mu\text{g } ^{15}\text{N/d}] - {}^{15}\text{N-Überlauf} [\mu\text{g/d}] - {}^{15}\text{N-SAB} [\mu\text{g/d}]}{{}^{15}\text{N-LAB} [\%]} \div 10$$

Die Proteinsynthese ergibt sich jeweils aus $N * 6,25$.

Gebrauch des NH_3 -N-Pools zur mikrobiellen Proteinsynthese

Der Anteil des LAB-N, der aus dem Ammonium des Überlaufs stammte, lässt sich wie folgt berechnen:

$$(8) \quad N \text{ aus } \text{NH}_3 [\%] = \frac{{}^{15}\text{N-LAB} [\%]}{{}^{15}\text{N-Überlauf} [\%]} * 100$$

Unabgebautes Futterprotein (UDP)

Der in den Residuen insgesamt analysierte N abzüglich des N, der mikrobieller Herkunft (SAB) ist, entspricht dem unabgebauten Futterprotein.

$$(9) \quad \text{UDP [g/d]} = N_{\text{Residuum}} [\text{g/d}] - N_{\text{SAB}} [\text{g/d}]$$

Proteinabbau bzw. NH_3 -N-Freisetzung aus dem Futter

Ein Maß für die mikrobielle Fermentationsleistung ist der Umbau von N-Verbindungen aus dem Futter bis zur Stufe des Ammoniums.

$$(10) \quad \begin{aligned} &\text{NH}_3 - \text{N aus dem Futter} = \\ &\left(1 - \frac{{}^{15}\text{N im Überlauf [\%]}}{{}^{15}\text{N im Puffer [\%]}} \right) * \text{NH}_3 - \text{N aus dem Puffer [mg/d]} \end{aligned}$$

3.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 10.0 und 11.0. Es wurde eine univariate Varianzanalyse mit dem Faktor P-Stufe durchgeführt. Die Mittelwerte der Sammelphasen wurden dabei getrennt betrachtet. Bei signifikanten Einflüssen auf die Varianz durch den Faktor P-Stufe wurden die Mittelwerte der ersten Sammelphase anhand eines Tuckey-Tests (gleiche Stichprobenlänge), die der zweiten Sammelphase mittels Student-Newman-Keuls-Test (ungleiche Stichprobenlänge) auf signifikante Unterschiede überprüft. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Hochbuchstaben kenntlich gemacht.

3.4 Versuch III: Hohenheimer Futterwerttest

Dieser Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob bei niedrigen P-Konzentrationen die Fermentationsleistung der Mikroorganismen beeinträchtigt ist und ob es Anzeichen dafür gibt, dass die vorwiegend cellulolytisch oder vorwiegend amylolytisch aktiven Pansenmikroben unterschiedlich auf eine knappe P-Versorgung reagieren. Als Merkmal der mikrobiellen Aktivität wurden die Gasbildung nach 8 und 24 h und die Bildung der flüchtigen Fettsäuren nach 24 h herangezogen.

Die Kurzzeitinkubationsmethode Hohenheimer Futterwerttest (HFT) von MENKE et al. (1979) kam zum Einsatz. Um eine möglichst niedrige P-Versorgung über das Inkubationsmedium zu erreichen, wurde anstelle des Pansensaftes der Überlauf eines RUSITEC-Versuches als Starterkultur verwendet.

Durch das Mischen des Überlaufs, der während eines separat laufenden RUSITEC-Versuches entnommen wurde, mit Pufferlösungen verschiedener P_a -Konzentrationen, wurden Endkonzentrationen im Inkubationsmedium zwischen 1,06 und 3,97 mmol P_a /L angestrebt. Der Überlauf stammte aus einem mit P-armen Komponenten „gefütterten“ RUSITEC-Versuch, in dem die unter 3.3.2.1 beschriebene Pufferlösung mit 0 mmol P_a /L als Speichellersatz verwendet wurde. Für die Durchführung dieses Versuches (HFT) musste der über 24 h gesammelte Überlauf aus drei Fermentern entnommen werden. Es wird daher in der folgenden Beschreibung des RUSITEC-Versuches nur auf die Rationen und Ergebnisse eingegangen, die sich auf diese drei Fermenter beziehen.

3.4.1 Gestaltung des RUSITEC-Versuches

Ziel des RUSITEC-Versuches war es, den Einfluss unterschiedlicher N-Quellen auf die mikrobielle Fermentationsleistung und Proteinsynthese zu untersuchen. Inkubationsanlage und Bedienung entsprachen dem unter 3.3 beschriebenen Versuch. Lediglich Pufferlösung und Rationsgestaltung unterschieden sich. Obwohl dem N das Hauptinteresse dieser RUSITEC-Versuchsreihe galt, wurde auf die Auswahl P-armer Rationskomponenten geachtet. Zu Maissilage, Trockenschnitzeln und einer P-freien Vormischung wurde in der einen Rationsvariante eine N-Quelle

aus NPN - Harnstoff, Variante H - gewählt, in der anderen wurde eine Protein-N-Quelle - Weizenkleber, Variante Wk - verwendet. Beide Rationsvarianten enthielten 7,5 g Maissilage pro Tag und 7,0 bzw. 7,5 g eines Kraftfutters, das aufgrund der N-Quelle unterschiedlich war. Die Höhe der N-Versorgung war mit 314 mg/d für beide Rationsvarianten gleich. Die Energieversorgung nach DLG-Futterwerttabelle (1997) lag bei der Variante H bei 0,14 MJ ME/d und bei der Variante Wk bei 0,24 MJ ME/d.

Tabelle 6: Rationszusammensetzung (g/d) mit entsprechendem N-Gehalt in mg N/d

Komponenten	Rationsvariante			
	Variante H		Variante Wk	
	g/d	mg N/d	g/d	mg N/d
Maissilage	7,50	101	7,50	101
Trockenschnitzel	6,71	116	6,68	115
Weizenkleber	-	-	0,75	98
Harnstoff	0,21	97	-	-
Vormischung	0,08	-	0,08	-
Gesamt	14,5	314	15,0	314

Mit der zufließenden Pufferlösung wurde kein Phosphor in das System eingetragen, so dass von einer im Vergleich zu Pansensaft geringen P_a -Konzentration des Überlaufs ausgegangen werden konnte. Über das Futter wurden täglich 23,8 mg P/d mit der Variante H, mit der Variante Wk 24,4 mg P/d in das System eingebracht. Eine Sammelphase dauerte fünf Tage.

Tabelle 7: P-Gehalte der Futterkomponenten

Komponente	P-Gehalt, g/kg T
Maissilage	2,46
Trockenschnitzel	0,80
Weizenkleber	0,75
Harnstoff	0
Vormischung	0

3.4.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Versuchsaufbau

Um eventuelle unterschiedliche Reaktionen bezüglich der Gasbildung oder der Bildung flüchtiger Fettsäuren der verschiedenen Mikroorganismengruppen aufzudecken, wurde ein für die Gruppen typisches Substrat, welches als Futtermittel bezeichnet wird, verwendet. Für die cellulolytischen Mikroorganismen reine Cellulose, für die amylolytischen wurde Kartoffelquellstärke und als weiteres Futtermittel Apfelpektin inkubiert. Diese Futtermittel zeichneten sich durch einen sehr niedrigen P-Gehalt von < 1 g P/kg T aus. Neben den Futtermitteln Cellulose, Stärke und Pektin wurde die Gasbildung und die flüchtigen Fettsäuren des Heu- und Krafffutterstandards, der auch bei den Routineuntersuchungen des Hohenheimer Futterwerttests verwendet wird (siehe NAUMANN und BASSLER, 1976), untersucht.

Tabelle 8: P-Gehalte der inkubierten Futtermittel

Futtermittel	P-Gehalt, g/kg T
Cellulose	0,02
Kartoffelstärke	0,76
Apfelpektin	0,12
Heu-Standard	3,59
Krafffutter-Standard	4,30

Es wurden zwei identische Versuche durchgeführt, wobei der Überlauf für Versuch A am 13. und für Versuch B am 16. Tag des parallel laufenden RUSITEC-Versuchs verwendet wurde.

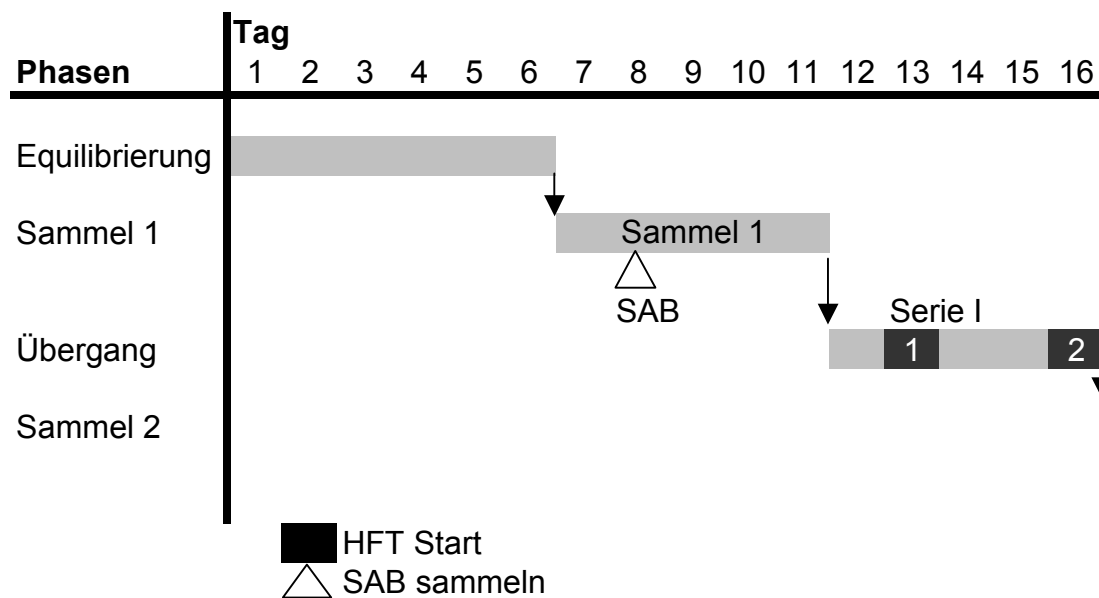


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs Versuch III-HFT

Das Verhältnis von Überlauf zu Pufferlösung war konstant und lag bei 5:1. Damit ergaben sich rechnerisch P-Stufen von 3,97, 2,52 und 1,06 mmol P_a /L Inkubationsmedium.

Tabelle 9: Überlauf : Puffer-Verhältnis, P_a -Konzentration der verwendeten Pufferlösungen und kalkulierte Endkonzentration des Inkubationsmediums

Überlauf: Puffer- Verhältnis	P_a -Konzentration	
	Puffer (mmol P_a /L)	Inkubationsmedium ¹ (mmol P_a /L)
5:1	17,4	3,97
5:1	8,71	2,52
5:1	0	1,06

¹ Mit der Annahme, dass der Überlauf eine P_a -Konzentration von 1,29 mmol P_a /L aufweist.

Pro Futtermittel und P-Stufe wurden drei Kolben inkubiert, außerdem wurden pro P-Stufe drei Kolben als Blindwerte (kein Futtermittel) mitgeführt.

Als Merkmale der mikrobiellen Fermentationsleistung wurden die Gasbildung nach 8 und 24 h und die Bildung der flüchtigen Fettsäuren Essig-, Propion-, Butter-, Iso-Butter-, Valerian- und Iso-Valeriansäure nach 24 h herangezogen.

Durchführung

Die Kolbenprober wurden mit 200 mg des entsprechenden Futtermittels bestückt. Pro P-Stufe wurden drei Kolbenprober als Blindwert mitgeführt. Zur Gewinnung des RUSITEC-Überlaufs wurden die Überlaufschläuche aus drei RUSITEC-Fermentern in eine zwei Liter fassende Glasflasche umgeleitet. Die Glasflasche befand sich in einem auf 39°C temperierten Wasserbad und war vor dem Anschluss der Schläuche mit N₂ begast worden um möglichst anaerobe Bedingungen zu schaffen. Nach 24 h Sammlung wurde die Glasflasche geschüttelt und jeweils auf drei Woulff'sche Flaschen verteilt. Die der P-Stufe entsprechende Pufferlösung wurde unter ständigem Rühren und CO₂-Begasung zugegeben. Vom reinen Überlauf und vom Inkubationsgemisch einer jeden P-Stufe wurden ca. 20 mL als uninkubierte Probe zur P-Bestimmung zurückbehalten. Dann wurden mittels eines Dispensers 30 mL des Inkubationsgemisches in die Kolbenprober gefüllt, Luftblasen entfernt und der Kolben in den Rotor des auf 39°C geheizten Wärmeschranks gesteckt. Nach 8 h wurde das gebildete Gasvolumen auf dem skalierten Kolbenprober abgelesen. Kolben, deren Gasvolumen bereits nach 8 h über 50 mL betrug, wurden geöffnet, entlüftet und auf 30 mL zurückgestellt. Nach 24 h wurde noch einmal das Gasvolumen abgelesen. Nun wurde der Kolbenprober kräftig geschüttelt und der Inhalt des Kolbens in 20 mL fassende Szintillationsgefäße gedrückt, die sofort in Eiswasser gekühlt wurden um die Fermentation direkt zu stoppen. Bis zur weiteren Analyse wurden die Probenflaschen bei -18° gelagert.

3.4.3 Probenaufbereitung und Analytik

Die aufgetauten Proben wurden mit 0,2 mL verdünnter HCl (HCl:H₂O, 1:1) versetzt und 15 min bei 30.000 * g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die flüchtigen Fettsäuren Essig-, Propion-, Butter-, Iso-Butter-, Valerian- und Iso-Valeriansäure mit dem Gaschromatographen, die P_a-Konzentration des RUSITEC-Überlaufs und der nicht-inkubierten Inkubationsmedien wurde photometrisch wie unter 3.3.3.4 analysiert. In den inkubierten Proben war auf Grund der Eigentrübung die Bestimmung der P_a-Konzentration nicht möglich.

3.4.4 Berechnungen

Die analysierten Werte für Gasbildung und VFA wurden auf 200 mg Einwaage standardisiert. Es wurde die Netto-Produktion der Analysenmerkmale betrachtet, d.h. der Mittelwert des Blindwertes einer P-Stufe wurde vom jeweiligen Wert nach 24 h abgezogen. Ergaben sich dann negative Werte, wurden diese auf Null gesetzt.

3.4.5 Statistik

Die einzelnen Versuche wurden getrennt varianzanalytisch ausgewertet. Dazu wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Futtermittel und P-Stufe sowie deren Interaktion durchgeführt. Bei signifikantem F-Wert wurde ein Mittelwertsvergleich (SNK-Test) vorgenommen, bei signifikanter Interaktion wurde ein multipler Mittelwertsvergleich (Tuckey-HSD) herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Versuch I: Fraktionierung der Pansenmikroorganismen

4.1.1 Gewinnung der Referenzmikroben

Insgesamt wurden in sechs Sammlungen etwa 11 Liter flüssiger Panseninhalt entnommen und daraus ca. 24,4 g T gefriergetrocknete LAB gewonnen. In zwei Sammlungen konnten 3,28 kg strukturierter Panseninhalt (Gewicht nach Auswringen) entnommen werden und 17,9 g T gefriergetrocknete SAB daraus gewonnen werden.

4.1.2 Ergebnisse der Analysen

Der Gehalt an Rohprotein (N*6,25), Fett und Rohasche der Referenzmikroben LAB und SAB ist in Tabelle 10 dargestellt. Der Trockenmasse-Gehalt der lebenden Pansenbakterien konnte nicht bestimmt werden, da eine Trocknung mit dem Verlust des Zellwassers verbunden ist und zum Absterben der Zelle führt.

Unterschiede zeigten sich lediglich im Fettgehalt und im Rohaschegehalt. Der Fettgehalt war bei den SAB mit 191 g/kg T um 22 % höher als bei den LAB, der Rohaschegehalt bei den LAB leicht höher als bei den SAB.

Tabelle 10: Gehalt an Rohprotein, Fett und Rohasche in g/kg T

	LAB g/kg T	SAB g/kg T
XP ¹	535	525
Fett	155	191
XA	156	138
Rest	154	146

¹ N*6,25

Der P-Gehalt (Tabelle 11) der LAB lag mit 19,9 g P/kg T um ein Viertel höher als bei den SAB (15,1 g P/kg T). Die Wiederfindung des P als Summe der einzelnen Fraktionen entsprach mit 93 % bei den LAB und mit 92 % bei den SAB den gesetzten Erwartungen.

Die Verteilung des P auf die einzelnen Fraktionen war nur bezüglich der Fraktion Fett gleich (6 bzw. 7 % des P). Dabei wich bei der Doppelbestimmung sowohl bei den LAB als auch bei den SAB der Wert für P im Fett um 5 % ab. Bei den LAB wurde mit 58 % der größte Teil des P in der Fraktion Filtrat analysiert. Bei den SAB verteilte sich der P zu gleichen Teilen auf die Fraktionen fällbarer Rückstand und Filtrat (je 42 % des P).

Tabelle 11: P-Gehalt der Referenzmikroben

	LAB, g/kg T	SAB, g/kg T
P - Gesamt	19,9	15,1
P im Fett	1,13	1,05
P im fällbaren Rückstand	5,76	6,39
P im Filtrat	11,5	6,41
Verlust	1,51	1,25

Der N-Gehalt der Referenzmikroben unterscheidet sich weder bezüglich seiner absoluten Höhe (N-Gehalt) noch bei der Verteilung auf die Fraktionen Fett und fällbarer Rückstand (Tabelle 12). Bemerkenswert ist, dass über 90 % des in den Mikroorganismen enthaltenen Stickstoffs mit TCA fällbar sind.

Tabelle 12: N-Gehalt der Referenzmikroben

	LAB g/kg T	SAB g/kg T
N - Gesamt	85,6	84,0
N im Fett	1,23	1,63
N im fällbaren Rückstand	78,1	77,1
N im Filtrat*	6,27	5,30

* berechnet aus N Gesamt – N im Fett - N im fällbaren Rückstand)

4.2 Versuch II: RUSITEC

Der Einfluss des P-Niveaus (P-Stufe) auf die Untersuchungsmerkmale pH-Wert, Redoxpotential, Anzahl an Protozoen, Gasvolumen, $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im Überlauf, Produktion flüchtiger Fettsäuren, Nährstoffabbau und mikrobielle Proteinsynthese wurden varianzanalytisch (ANOVA) ausgewertet. Dabei wurden die erste und die zweite Sammelphase getrennt betrachtet. Bei signifikanten Einflüssen auf die Varianzen durch die P-Stufe wurde ein Mittelwertsvergleich (Tuckey-Test für Daten der Sammelphase 1, SNK-Test für Daten der Sammelphase 2) durchgeführt. Dazu wurde jeweils der Mittelwert der Fermenter ($N = 4$) einer P-Stufe mit dem Mittelwert der übrigen P-Stufen innerhalb der Sammelphase ($n = 3$ bis 5 Tage) verglichen. Unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Spalte oder Zeile weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Werte nicht nach der zeitlichen Abfolge der Sammelphasen dargestellt, sondern nach aufsteigender P_a -Konzentration im partikelfreien Überlauf.

4.2.1 Ergebnisse der Analysen der Fermenterproben

pH-Wert

Mit abnehmender P_a -Konzentration in der Pufferlösung stieg der pH-Wert in den Fermentern von 6,32 auf 6,55 tendenziell an. Dieser Anstieg ist in der zweiten Sammelphase zwischen der niedrigsten und höchsten P-Stufe, trotz geringer Unterschiede, signifikant ($p \leq 0,05$).

Redoxpotential

Das Redoxpotential lag zwischen -209 und -252 mV und ließ keinen Einfluss durch P-Stufe oder Lauf erkennen.

Protozoen

Die Anzahl der Protozoen lag zwischen $1,58$ und $2,90 \cdot 10^4/\text{mL}$, wobei in der zweiten Sammelphase anscheinend weniger Protozoen vorhanden waren als in der ersten Sammelphase. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung konnte jedoch kein Einfluss durch die P-Stufen beobachtet werden.

Gasvolumen

Die gemessenen Gasvolumina lagen zwischen 1500 und 1900 mL pro Tag in der ersten Sammelphase und zwischen 1800 und 2100 mL pro Tag in der zweiten Sammelphase. Obwohl in der ersten Sammelphase bei einer Konzentration von $11,3$ mmol P_a/L Überlauf signifikant weniger Gas gebildet wurde als bei den übrigen P_a -Konzentrationen, wird dieser Einfluss als nicht bedeutend eingestuft. Im ersten Lauf wies ein Fermenter dieser P-Stufe ($11,3$ mmol P_a/L) an drei Tagen der fünftägigen Sammelphase Gasvolumina auf, die etwa 1000 mL weniger betrugen als die der anderen Fermenter der gleichen P-Stufe. In der zweiten Sammelphase konnte kein Einfluss der P-Stufe beobachtet werden.

4.2.2 Ergebnisse der Analysen der Überlaufproben

P_a - und $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im partikelfreien Überlauf

Die P_a -Konzentration im partikelfreien Überlauf lag zwischen $1,30$ und $15,2$ mmol/L (vgl. Tabelle 13), womit sich eine durchschnittliche Versorgung an P_a aus dem partikelfreien Überlauf zwischen $8,71$ und $4,27$ mmol P_a pro Tag in der ersten Sammelphase und $4,27$ und $0,73$ mmol P_a pro Tag in der zweiten Sammelphase ergab. Die gewünschten unterschiedlichen P-Stufen konnten realisiert werden.

Die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration zeigte keine Beeinflussung durch die unterschiedlichen P-Stufen. Sie lag in der ersten Sammelphase bei $6,9$ mmol $\text{NH}_3\text{-N/L}$ und in der zweiten Sammelphase bei $8,2$ mmol $\text{NH}_3\text{-N/L}$.

VFA-Konzentration (C₂-C₅) im partikelfreien Überlauf

Die produzierte Fettsäurenmenge (C₂-C₅) lag insgesamt zwischen 43,5 und 48,0 mmol/d (vgl. Tabelle 14). In der zweiten Sammelphase wurde bei einer Konzentration von 1,30 mmol P_a/L signifikant weniger Buttersäure gebildet als bei 4,40 mmol P_a/L und 7,70 mmol P_a/L. Bei den übrigen Fettsäuren (C₂, C₃, I-C₄, I-C₅ und n-C₅) konnte keine Abhängigkeit von der P_a-Konzentration beobachtet werden.

Molare Anteile der Fettsäuren an VFA-Produktion

Der molare Anteil der Essigsäure machte knapp 60 % der gesamten, gemessenen Fettsäurenmengen aus und lag im Mittel bei 27,2 mmol/d. Die Propionsäure stellte einen molaren Anteil von 21 % dar. Den nächst grössten molaren Anteil an der gemessenen Fettsäurenkonzentration stellte die Buttersäure mit 12 % dar, womit Essig-, Propion- und Buttersäure über 90 % der Fettsäurenproduktion ausmachten. Die Bildung der verzweigtkettigen Fettsäuren (Iso-Buttersäure, Iso-Valeriansäure) sowie n-Valeriansäure erreichte einen molaren Anteil an der Gesamtfettsäurenbildung von 9 %.

4.2.3 Ergebnisse der Analysen der Residuen

Beim Abbau des P aus den Residuen (dP) konnte eine klare Abhängigkeit von der P_a-Konzentration gezeigt werden (vgl. Tabelle 15). Mit abnehmender P_a-Konzentration wurde mehr P aus den Residuen gelöst.

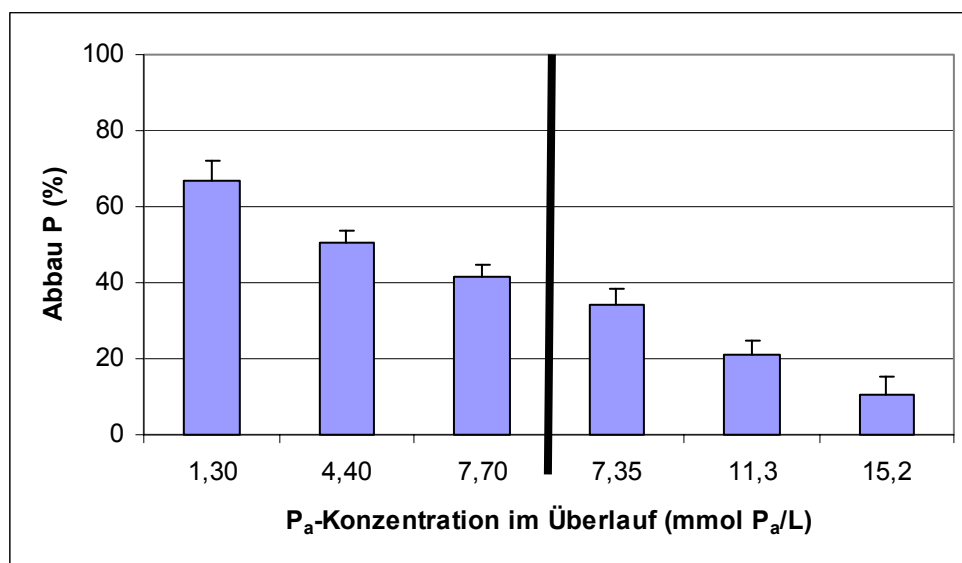


Abbildung 8: P-Abbau aus dem Futter (%) in Sammelphase 1 und 2

Der Abbau der Organischen Substanz (dOS) zeigte in der ersten Sammelphase keine Abhängigkeit von der P_a-Konzentration. Obwohl in der zweiten Sammelphase bei einer Konzentration von 4,40 mmol P_a/L mehr organische Substanz abgebaut wurde als bei 1,30 mmol/L und 7,70 mmol P_a/L, können diese Unterschiede als zufällig betrachtet werden. Bei der P-Stufe 7,70 mmol P_a/L waren die Ergebnisse aus Lauf 1 und 2 unterschiedlich: in Lauf 1 lag die dOS bei dieser P-Stufe nur bei 49 % gegenüber Lauf 2, wo sie 54 % betrug. Dies lag hauptsächlich an einem verminderten Abbau des Rohproteins bei Lauf 1. Trotz dieses Unterschieds wurden beim Rohprotein-Abbau keine signifikanten Differenzen beobachtet, er lag zwischen 49 % in der ersten Sammelphase und 52 % in der zweiten Sammelphase.

Der Abbau der Zellwandbestandteile NDF (dNDF) und ADF (dADF) ließ ebenfalls keinen Einfluss durch die P-Stufe erkennen. Sie wiesen in der ersten Sammelphase Werte um 31 % dNDF und 19 % dADF auf, in der zweiten Sammelphase lagen die Werte bei 34 % dNDF und 19 % dADF. Die Einzeldaten können dem Anhang (Tabelle A 3 bis Tabelle A 6) entnommen werden.

4.2.4 Ergebnisse der Analysen der Referenzmikroben

Über den Einbau von ^{15}N in die Referenzmikroben konnte die mikrobielle Proteinsynthese ($\text{N} \cdot 6,25$) wie unter 3.3.4 beschrieben berechnet und abgeschätzt werden. In der ersten Sammelphase wurden im Mittel 109 mg LAB-N (681 mg LAB-Protein) und 53,3 mg SAB-N (333 SAB-Protein), in der zweiten Sammelphase 95,3 mg LAB-N (596 mg LAB-Protein) und 54,3 mg SAB-N (339 mg SAB-Protein) pro Tag synthetisiert. Ein Einfluss durch die P_a -Konzentration konnte nicht beobachtet werden. So ergab sich bei der Annahme eines N-Gehaltes im Protein der Referenzmikroben von 16 % in der ersten Sammelphase eine mikrobielle Effizienz von 103 mg LAB- und 50 mg SAB-Protein pro g verschwundener OS und in der zweiten Sammelphase von 87 mg LAB- und 49 mg SAB-Protein pro g verschwundener OS.

Tabelle 13: Ergebnisse der Fermenterproben

Pa im Puffer, mmol/L Merkmal	Sammel 2			Sammel 1		
	0	4,38	8,70	8,58	13,1	17,5
pH-Wert	6,55 $\pm 0,016$	6,43 $\pm 0,047$	6,41 $\pm 0,034$	6,44 $\pm 0,051$	6,39 $\pm 0,084$	6,32 $\pm 0,084$
Redox, mV	-252 $\pm 7,6$	-242 $\pm 12,8$	-235 $\pm 23,6$	-221 $\pm 12,8$	-216 $\pm 10,8$	-209 $\pm 19,6$
Protozoen, * $10^4/\text{mL}$	1,58 $\pm 0,463$	1,67 $\pm 0,179$	1,58 $\pm 0,411$	2,44 $\pm 0,251$	2,44 $\pm 0,538$	2,90 $\pm 2,050$
Gasvolumen, mL	2853 ± 369	2844 ± 188	3026 ± 171	2947 ± 204	2489 ± 198	2916 ± 82
Überlauf, g	564 $\pm 13,1$	562 $\pm 16,7$	554 $\pm 13,8$	582 $\pm 20,7$	576 $\pm 20,6$	573 $\pm 23,6$
P_a Fermenter, mmol/L	1,30 $\pm 0,082$	4,40 $\pm 0,082$	7,70 $\pm 0,294$	7,35 $\pm 0,129$	11,3 $\pm 0,163$	15,2 $\pm 0,245$
$\text{NH}_3\text{-N}$, mmol/L	8,68 $\pm 0,492$	7,93 $\pm 1,195$	8,08 $\pm 0,236$	6,85 $\pm 0,705$	6,93 $\pm 0,171$	6,93 $\pm 0,613$

Tabelle 14: Produktion der flüchtigen Fettsäuren C₂-C₅ (VFA) in mmol/L

Pa im Puffer, mmol/L Merkmal	Sammel 2			Sammel 1		
	0	4,38	8,70	8,58	13,1	17,5
VFA Gesamt	48,0 ± 1,02	47,7 ± 2,45	46,5 ± 2,99	45,9 ± 1,29	43,5 ± 4,48	45,5 ± 3,69
Essigsäure	28,2 ± 0,67	27,9 ± 1,38	27,2 ± 1,73	26,8 ± 0,99	25,5 ± 2,46	26,7 ± 2,20
Propionsäure	9,88 ± 0,31	9,24 ± 0,52	8,96 ± 0,48	9,91 ± 0,33	9,29 ± 1,11	9,76 ± 0,89
Iso- Buttersäure	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,04
Buttersäure	5,07 ^b ± 0,37	6,22 ^a ± 0,62	5,85 ^a ± 0,62	5,01 ± 0,45	4,91 ± 0,79	4,92 ± 0,55
Iso- Valeriansäure	1,61 ± 0,09	1,69 ± 0,09	1,72 ± 0,17	1,56 ± 0,18	1,47 ± 0,24	1,53 ± 0,36
Valeriansäure	2,31 ± 0,10	2,39 ± 0,11	2,37 ± 0,18	2,25 ± 0,12	2,13 ± 0,28	2,25 ± 0,19

Unterschiedliche Hochbuchstaben innerhalb einer Sammelphase beruhen auf signifikanten Mittelwertsunterschieden ($p \leq 0,05$)

Tabelle 15: Nährstoffabbau aus dem inkubierten Futter

Pa im Puffer, mmol/L Merkmal	Sammel 2			Sammel 1		
	0	4,38	8,70	8,58	13,1	17,5
dP	67 ^a ± 5,5	50 ^b ± 3,2	42 ^c ± 3,3	34 ^a ± 4,3	21 ^b ± 3,7	11 ^c ± 4,6
dOS	51 ± 0,6	54 ± 1,1	51 ± 3,2	51 ± 0,5	51 ± 1,7	50 ± 1,7
dXP	53 ± 4,4	52 ± 2,9	52 ± 5,2	49 ± 1,9	48 ± 2,1	49 ± 2,7
dNDF	34 ± 1,3	35 ± 3,1	33 ± 2,9	31 ± 1,9	32 ± 2,9	29 ± 1,8
dADF	21 ± 1,9	18 ± 3,8	19 ± 1,3	18 ± 1,9	20 ± 4,5	18 ± 3,9

Unterschiedliche Hochbuchstaben innerhalb einer Sammelphase beruhen auf signifikanten Mittelwertsunterschieden ($p \leq 0,05$)

dP disappeared Phosphor; dOS disappeared Organische Substanz; dXP disappeared Rohprotein; dNDF disappeared Neutrale Detergentienfaser; dADF disappeared Saure Detergentienfaser

4.3 Versuch III: HFT aus RUSITEC-Überlauf

4.3.1 P_a-Konzentration des Inkubationsmedium

Die P_a-Konzentration des Überlaufs lag mit 1,26 mmol/L (Versuch B) etwas niedriger als angenommen, was wiederum zu geringfügig niedrigeren Endkonzentrationen im Inkubationsmedium führte. In Versuch A konnte die P_a-Konzentration der niedrigsten P-Stufe im Inkubationsmedium aufgrund von Eigentrübung nicht ermittelt werden. Da man aber konstante Bedingungen im RUSITEC voraussetzen kann und daher von einer gleichen P_a-Konzentration des Überlaufs ausgehen kann, zumal Versuch A und Versuch B nur drei Tage auseinander lagen, wird die in Versuch B analysierte niedrigste P_a-Konzentration ebenfalls für Versuch A angenommen. Abgesehen davon konnten die erwünschten P_a-Konzentrationen im Inkubationsmedium in beiden Versuchen realisiert werden.

Tabelle 16: P_a-Konzentration des Inkubationsmedien (mmol P_a/L)

kalkulierte P _a -Konz.	analysierte P _a -Konzentration	
	Versuch A	Versuch B
1,06	x	0,90
2,52	2,48	2,29
3,97	3,77	3,84

x konnte wegen Eigentrübung nicht gemessen werden

4.3.2 Einfluss von Futtermittel und P_a-Konzentration auf die Gasbildung und Produktion flüchtiger Fettsäuren

Alle aufgeführten Unterschiede beruhen auf signifikanten Mittelwertsunterschieden (SNK-Test oder Tuckey HSD) auf einem Niveau von $p \leq 0,05$.

Die Gasbildung nach 24 h und die Bildung der flüchtigen Fettsäuren C₂-C₅ (VFA) können der Tabelle 17 entnommen werden, die Ergebnisse der Varianzanalyse und der Mittelwertsvergleich sowie die Mittelwerte der übrigen Merkmale sind im Anhang (Tabelle A 8 bis Tabelle A 20) dargestellt.

Einfluss der inkubierten Futtermittel auf die Gasbildung und die Produktion flüchtiger Fettsäuren

Wie erwartet zeigten die Futtermittel eine unterschiedliche Gasbildung, deren Höhe und Reihenfolge in beiden Versuchen gleich war. Nach 8 h Inkubation wurde aus der Stärke $30,0 \pm 2,93$ mL, aus Pektin $18,5 \pm 7,55$ mL und aus der Cellulose $0,6 \pm 0,56$ mL Gas freigesetzt. Nach 24 h zeigte die Inkubation von Pektin mit $54,1 \pm 7,52$ mL die höchste Gasbildung, gefolgt von Stärke ($46,7 \pm 4,69$ mL) und Cellulose ($27,7 \pm 8,24$ mL).

Im Versuch B wurden im Mittel 32 % weniger flüchtige Fettsäuren C₂-C₅ gebildet als im Versuch A. Trotzdem war die Abhängigkeit vom inkubierten Futtermittel in beiden Versuchen gleich gerichtet. Die Inkubation von Pektin über 24 h führte zur Bildung von 1181 ± 120 µmol C₂-C₅/200 mg T, aus Stärke wurden 840 ± 377 µmol C₂-C₅/200 mg T gebildet und aus Cellulose 524 ± 150 µmol C₂-C₅/200 mg T.

Einfluss der P_a-Konzentration auf die Untersuchungsmerkmale innerhalb der Futtermittel

Im Versuch A konnten bei der Inkubation von Cellulose keine Effekte durch die P_a-Konzentration des Inkubationsmediums beobachtet werden. Nach 8 h war die Gasbildung bei der Inkubation von Pektin bei einer P_a-Konzentration im Inkubationsmedium von 2,48 mmol/L signifikant höher als bei 3,77 mmol/L. Beide P-Stufen unterschieden sich nicht zur Gasbildung nach 8 h bei einer P_a-Konzentration von 0,90 mmol/L. Nach 24 h ließ sich bei keinem der Futtermittel eine Abhängigkeit zur P_a-Konzentration absichern, obgleich bei der Analyse der Varianz der Gasbildung nach 24 h bei der Inkubation von Stärke ein signifikanter F-Wert ermittelt wurde. Die Bildung der flüchtigen Fettsäuren wurde weder bei Cellulose noch bei Pektin durch die P_a-Konzentration des Inkubationsmediums beeinflusst. Bei der Inkubation von Stärke wurden bei der niedrigsten P_a-Konzentration (0,90 mmol/L) mehr flüchtige Fettsäuren gebildet als bei den anderen P_a-Konzentrationen. Dabei beruhte dies hauptsächlich auf einer Erhöhung der Essigsäureproduktion, die eine Reduzierung der Buttersäurebildung überlagerte. Die Valeriansäureproduktion zeigte keine gerichtete Abhängigkeit der P_a-Konzentration, bei einer P_a-Konzentration von

2,48 mmol/L wurden die höchsten Werte gemessen, gefolgt von 3,77 mmol/L bis zu 0,90 mmol/L.

Im Versuch B konnte dann sowohl nach 8 h als auch nach 24 h Inkubation bei der niedrigsten P_a -Konzentration (0,90 mmol P_a /L) die geringste Gasbildung beobachtet werden. Auf die Bildung der flüchtigen Fettsäuren C_2 - C_5 wirkte eine P_a -Konzentration von 0,90 mmol P_a /L in beiden Versuchen stimulierend. Es wurden signifikant mehr flüchtige Fettsäuren als bei P_a -Konzentrationen von 2,48 und 3,77 mmol/L (Versuch A) bzw. 2,29 und 3,84 mmol P_a /L (Versuch B) gebildet. Der Anstieg ließ sich durch eine vermehrte Bildung von Essigsäure und - im Versuch B auch von Propionsäure - bei gleichzeitiger Reduzierung von Buttersäure und Valeriansäure erklären.

Bei der Inkubation von Cellulose und Pektin wurden im Versuch B ebenfalls bei der niedrigsten P_a -Konzentration von 0,90 mmol/L die geringste Gasbildung (24 h) beobachtet. Die Bildung der flüchtigen Fettsäuren C_2 - C_5 wurde bereits ab einer P_a -Konzentration von 2,29 mmol/L eingeschränkt. Dies ließ sich auf verminderte Essigsäurebildung und bei Cellulose ebenfalls eine verminderte Propionsäurebildung zurückführen.

Tabelle 17: Gasbildung nach 24 h (mL)

	P _a -Konz. (mmol/L)	Futtermittel						
Versuch		Cellulose		Stärke		Pektin		P-Stufe
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Versuch A	0,90*	33,0	1,0	40,6	1,6	53,1	0,4	n.s.
	2,48	33,7	1,9	45,3	1,5	56,6	3,1	n.s.
	3,77	34,4	1,8	43,2	1,2	53,0	3,5	n.s.
	FM	c		b		a		
Versuch B	0,9	11,5	0,6	46,2	1,3	44,7	2,2	c
	2,29	25,3	0,6	53,2	0,4	50,1	0,6	b
	3,84	28,2	0,5	51,7	1,3	67,0	6,1	a
	FM	c		b		a		

* Wert wurde von Versuch B übernommen; MW Mittelwert; SD Standardabweichung; FM Mittelwertsvergleich Futtermittel; P-Stufe Mittelwertsvergleich der P_a-Konzentration

Tabelle 18: Flüchtige Fettsäuren C₂-C₅ (μmol/200 mg T)

Versuch	P _a -Konz. (mmol/L)	Futtermittel						P-Stufe
		Cellulose		Stärke		Pektin		
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Versuch A	0,90*	673	18	1262	15	1205	83	x
	2,48	678	33	1066	175	1324	32	x
	3,77	613	24	1037	15	1290	66	x
	FM	c		b		a		
Versuch B	0,9	341	14	972	59	1028	74	a
	2,29	329	24	282	24	1074	59	c
	3,84	502	43	410	26	1198	56	b
	FM	c		b		a		

* Wert wurde von Versuch B übernommen; MW Mittelwert; SD Standardabweichung; FM Mittelwertsvergleich Futtermittel; P-Stufe Mittelwertsvergleich der P_a-Konzentration

5 Diskussion

5.1 Fraktionierung der Pansenmikroorganismen

5.1.1 Fehlerbetrachtung

Isolierung der Referenzmikroben

Es wurde nur zwischen den Referenzmikroben aus dem flüssigen Panseninhalt, welcher von CZERKAWSKI (1986) als Kompartiment 1 (LAB) bezeichnet wird, und den Referenzmikroben aus dem strukturierten Panseninhalt unterschieden, der als Kompartiment 3 (SAB) bezeichnet wird. Die Mikroorganismen, die lose am strukturierten Panseninhalt hafteten (Kompartiment 2, LAB und SAB), wurden den Referenzmikroben des Kompartiments 1 (LAB) zugerechnet. LEGAY-CARMIER und BAUCHART (1989) konnten in ihren Untersuchungen an Bakterienisolaten von Kühen, bei denen sie zwischen den LAB aus Kompartiment 1 und 2 unterschieden, keine Differenz bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung feststellen. Für die eigenen Untersuchungen wird daraus geschlossen, dass durch diese Vernachlässigung nur ein geringer Fehler entstanden ist. Wie in der gesichteten Literatur, bleiben die Bakterien, die direkt an der Pansenwand haften, völlig unberücksichtigt. Der Fehler, der sich dadurch ergibt, kann nicht abgeschätzt werden.

Zentrifugationsgeschwindigkeit

Die Abtrennung der LAB erfolgte bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $30.000 \times g$, die der SAB von $26.040 \times g$. Es könnte daher sein, dass im LAB-Isolat der Anteil der kleineren Bakterien größer war als bei den SAB. CZERKAWSKI (1976) hatte Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung von kleinen und großen Bakterien (LAB) gefunden. Allerdings war der Unterschied in der Zentrifugationsgeschwindigkeit wesentlich größer als in den eigenen Untersuchungen. Aus einer Gegenüberstellung der in der Literatur ermittelten N-Gehalte bei Pansenbakterien in Abhängigkeit der Zentrifugationsgeschwindigkeiten konnten keine Unterschiede im N-Gehalt bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit zwischen $25.000 \times g$ und $30.000 \times g$ beobachtet werden (RODRIGUEZ et al., 2000; LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989;

KRAWIELITZKI und VOIGT, 1988; KOMISARCZUK et al., 1987a; MERRY und McALLAN, 1983; VAN NEVEL und DEMEYER (1977); SMITH und McALLAN, 1974).

Chemische Fraktionierung

Bei der chemischen Fraktionierung der Referenzmikroben wurden verschiedene Analysenschritte durchgeführt, bei denen die Probe von einem Gefäß ins andere überführt wurde. Trotz großer Sorgfalt könnten dabei Verluste aufgetreten sein. Ein Teil der Verluste könnte auf die Überführung des Fettes vom Rundkolben in den Tiegel zurückzuführen sein. Es wurde darauf geachtet, das Fett quantitativ zu lösen und zu überführen, doch könnte ein Rest des Fettes an der Wand des Rundkolbens haften geblieben sein. Diese Verluste lassen sich für die SAB quantifizieren, da neben dem P in den Fraktionen Fett, fällbarer Rückstand und Filtrat ebenfalls im Extraktionsrückstand der P-Gehalt bestimmt wurde. Summiert man die P-Gehalte von Fett und Extraktionsrückstand, ergibt sich eine Differenz zum Gesamt-P-Gehalt in den SAB von 7 %. Damit wäre der Verlust von insgesamt 8 % P hauptsächlich beim Analysenschritt der Fettextraktion aufgetreten. Da die Analysengänge für die Fraktionierung der SAB und LAB gleich waren, bei den LAB aber keine P-Bestimmung des getrockneten Extraktionsrückstandes vorgenommen wurde und somit eine Quantifizierung nicht möglich ist, wird von einem ähnlichen Verlauf der P-Verluste ausgegangen. Trotz der verschiedenen Analysenschritte sind die Verluste als relativ gering anzusehen.

Eine unvollständige Überführung des Fettes aus dem Rundkolben in den Tiegel könnte auch der Grund dafür gewesen sein, dass bei der P-Bestimmung im Fett eine Abweichung von 5 % bei der Doppelbestimmung auftrat.

Aufgrund des geringen Probenmaterials wurden zwei unterschiedliche Methoden zur N-Bestimmung verwendet. Der Gesamt-N-Gehalt in den SAB und LAB wurde nach der Methode von Dumas, der N-Gehalt in den Fraktionen Fett und fällbarer Rückstand nach der Kjeldahl-Methode bestimmt. Bei der Methode von Dumas wird der N in den organischen und anorganischen Verbindungen verbrannt und N als elementarer N bestimmt. Bei der Kjeldahl-Methode ist ein nasser oxidativer Aufschluss erforderlich um den gebundenen N in NH_3 zu überführen (SIEGFRIED, 1989). Dabei werden NPN-Verbindungen nur teilweise oder gar nicht erfasst. Bei

einem Vergleich der N-Bestimmung nach diesen beiden Methoden an unterschiedlichen Futtermitteln fand SIEGFRIED (1989) jedoch, dass beim „manuellen“ Aufschluss die N-Gehalte in der Regel im Durchschnitt von 14 Futtermitteln 0,01 % über den N-Gehalten des Leco-Gerätes lagen. Dafür werden die personenbezogenen Einflüsse verantwortlich gemacht. Übertragen auf die eigenen Untersuchungen würde dies eine Überschätzung des N in den Fraktionen Fett und fällbarer Rückstand bedeuten, welches zu einer Unterschätzung des rechnerisch ermittelten N-Gehaltes in der Fraktion Filtrat geführt hätte. Da die von SIEGFRIED (1989) gefundenen Abweichungen nur sehr gering sind, wird der Fehler, der durch die unterschiedlichen N-Bestimmungsmethoden entstand, vernachlässigt.

Der N-Gehalt im Filtrat konnte nur rechnerisch ermittelt werden, so dass die Verluste, die während der Fraktionierung aufgetreten sind, nicht genau zugeordnet werden können. Da aber die übrigen Fraktionen (N im Fett und N im fällbaren Rückstand) in der Summe über 90 % des Gesamt-N ausmachten, kann von nur sehr geringen N-Verlusten während der Analyse ausgegangen werden.

5.1.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben

Gewinnung der Referenzmikroben

Die Menge an gefriergetrockneten LAB (2,2 g LAB-T/L), die aus dem Pansensaft gewonnen wurden, scheint im Vergleich zur Literatur eher gering (VAN NEVEL und DEMEYER, 1977) zu sein. Für die SAB lässt sich kein Vergleich finden, da die Gewichtsbestimmung des strukturierten Panseninhaltes im ausgewrungenen Zustand erfolgte.

Fett-Gehalt

In der Literatur schwanken die angegebenen Fettgehalte für die LAB zwischen 88 und 167 g/kg T (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; CZERKAWSKI, 1976) und die der SAB zwischen 154 – 244,5 g Fett/kg T (RODRIGUEZ et al., 2000; MERRY und McALLAN, 1983). Damit weisen die LAB einen geringeren Fettgehalt auf als die SAB, was in den eigenen Untersuchungen (155 g Fett/kg T bei LAB, 191 g Fett/kg T bei

SAB) ebenfalls beobachtet wurde. Man vermutet, dass das Vorkommen von flüchtigen Fettsäuren, vornehmlich Acetat, im Umfeld der Futterpartikel zu einer höheren de-novo-Synthese bei den SAB führt (BAUCHART et al., 1990; DEMEYER et al., 1978). Die Schwankung der Fettgehalte in der Literatur könnte neben den Einflüssen durch Mikroorganismengewinnung und unterschiedlichen Fettextraktionsmethoden durch die Rationszusammensetzung (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; CRAIG et al., 1987) bedingt sein.

Rohasche-Gehalt

Der Gehalt an Rohasche lag bei den eigenen Untersuchungen für die LAB bei 156 g/kg T und bei den SAB bei 138 g/kg T und damit in dem Bereich, der von anderen Autoren genannt wurde (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; VOLDEN und HARSTAD 1998; MERRY und McALLAN, 1983; STORM und ØRSKOV, 1983; CZERKAWSKI, 1976). Dabei wurden für die LAB höhere Werte ermittelt als für die SAB (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; MERRY und McALLAN, 1983), dies deckt sich mit den eigenen Beobachtungen. Dieser Unterschied zwischen LAB und SAB könnte in der eigenen Untersuchung auch durch Unterschiede bei der Isolierung der Bakterien beruhen, da die LAB einer zweimaligen, die SAB einer einmaligen Waschung mit NaCl-Lösung unterzogen wurden.

5.1.2.1 N- und P-Gehalt in den LAB und SAB und in deren Fraktionen Fett, fällbarer Rückstand und Filtrat

N-Gehalt

Der N-Gehalt der LAB und SAB lag in den eigenen Untersuchungen bei 85,6 und 84,0 g N/kg T und war damit etwas höher als die von RODRIGUEZ et al. (2000), VAN NEVEL und DEMEYER (1977) sowie von SMITH und McALLAN (1974) an Schafen ermittelten N-Gehalte. Im Gegensatz zu MERRY und McALLAN (1983) und MARTIN-ORUE et al. (1998) schienen sich LAB und SAB nicht hinsichtlich ihrer N-Gehalte zu unterscheiden, was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von RODRIGUEZ et

al. (2000), VOLDEN und HARSTAD (1998), LEGAY-CARMIER und BAUCHART (1989) und CRAIG et al. (1987) steht.

P-Gehalt

Die eigenen Ergebnisse eines P-Gehaltes von 19,9 g/kg T bei den LAB und 15,1 g/kg T bei den SAB liegen über denen in der Literatur genannten Gehalten von 6,1 – 18,2 g/kg T LAB und 9,3 – 9,75 g/kg T bei den SAB. Bei dem Vergleich der (absoluten) Analysenergebnisse ist allerdings zu beachten, dass unterschiedliche P-Bestimmungsmethoden angewendet wurden, so dass sie damit nicht direkt vergleichbar sind. Die eigenen Ergebnisse führten zu einem N:P-Verhältnis von 4,31 in den LAB und 5,58 in den SAB. Das Verhältnis liegt damit etwas unter denen, die aus der Literatur bekannt sind (vgl. Tabelle 21) und entsprechen den Werten, die DURAND und KAWASHIMA (1980) aus verschiedenen Arbeiten für das Verhältnis von Pansenbakterien *in vivo* ableiteten.

Fraktion Fett

Die eigenen Ergebnisse zeigten einen geringen Anteil P in der Fraktion Fett für beide Referenzmikroben (6 % des P in LAB, 7 % des P in SAB). Dies steht im Gegensatz zu den von VAN NEVEL und DEMEYER (1977) durchgeführten Inkubationsversuchen mit markiertem P (^{32}P), bei denen 21 % des Gesamt-P in den Phospholipiden der LAB lokalisiert waren. Ihre Werte liegen damit höher als die von BUCHOLTZ und BERGEN (1973) analysierten 19 g Phospholipid-P pro kg Gesamt-N, die übertragen auf die eigenen Arbeiten zu Gehalten von 1,63 g Phospholipid-P/kg T in den LAB geführt hätte. Der in der eigenen Arbeit analysierte P-Gehalt im Fett lag bei 1,13 g/kg T. Es wurde keine weitere Auftrennung der Fett-Fraktion in Phospholipide vorgenommen, daher ist ein Vergleich der Werte nicht möglich. Der N-Gehalt im Fett war mit 1 % bei den LAB bzw. 2 % bei den SAB gering und lässt sich wahrscheinlich durch N-haltige Phospholipide (STEWART und BRYANT, 1988) erklären.

P und N im fällbaren Rückstand und Filtrat

Interessant sind die Unterschiede zwischen LAB und SAB bezüglich ihres P-Gehaltes in den Fraktionen fällbarer Rückstand und Filtrat. Bei den LAB finden sich 29 % des gesamten P in der Fraktion fällbarer Rückstand und 58 % im Filtrat, bei den SAB sind es 42 % und 43 % in der jeweiligen Fraktion. Der hohe N-Gehalt im fällbaren Rückstand bei LAB und SAB deutet daraufhin, dass ein Großteil der N-Verbindungen gefällt wurde. TCA wird häufig zur RNA-Analyse genutzt. Der N im fällbaren Rückstand könnte zu einem Teil aus den Aminosäuren (Reinprotein) stammen und zu einem Teil aus dem N der Nucleobasen (FRIEDMANN et al., 1995, McALLAN und SMITH, 1969). GREENBERG und SHIPE (1979) zeigten, dass die Fällung verschiedener Proteine mit TCA zu Peptiden in der Lösung führten, die eine durchschnittliche Größe von 330-380 Dalton aufwiesen, d.h., dass die Peptide aus drei oder vier Aminosäuren bestanden. Dies erklärt eventuell die von SUTHERLAND und WILKINSON (1971) im Filtrat analysierten Phosphoproteine und Metaboliten der RNA-Hydrolyse, die sie bei Verwendung einer 7 %igen TCA zur Erstellung eines DNA-Prezipitats fanden. Die N-Gehalte in der Fraktion Filtrat waren mit maximal 8 % und 6 % des Gesamt-N bei LAB und SAB recht niedrig, so dass der Anteil des P im Filtrat, der auf kleinere Teilstücke von DNA oder RNA (z.B. m-RNA) zurückzuführen wäre, als eher gering angesehen wird. Möglicherweise wird bei der Hydrolyse der Nukleinsäuren der P der Nukleobase gelöst und ins Filtrat überführt. Die von einigen Autoren gefundenen höheren RNA-Gehalte in den LAB (VOLDEN und HARSTAD, 1998; LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989; MERRY und McALLAN, 1983) würden diese These unterstützen. Lösliche P-Verbindungen könnten einen weiteren Teil des P im Filtrat beitragen. RODRIGUEZ et al. (2000) vermuten einen höheren Anteil an gram-positiven Bakterien in der Gruppe der LAB, dann könnte die Teichonsäure, die mit Peptidoglykan in der Zellwand verbunden sein kann, ebenfalls als Ursache höherer P-Gehalte im Filtrat der LAB in Frage kommen. Aus welcher Verbindung letztlich der P stammte, konnte mit der eigenen Untersuchung nicht geklärt werden. Aber die Ergebnisse der chemischen Fraktionierung deuten auf grundsätzliche Unterschiede hin, die die P-haltigen Verbindungen im fällbaren Rückstand und Filtrat in den LAB

und SAB betreffen. Die Fraktion Fett scheint bei beiden Bakteriengruppen ähnliche P- und N-haltige Verbindungen aufzuweisen.

Schlußfolgerungen für den P-Bedarf

Die GfE (2001) geht in ihren Empfehlungen für Milchkühe und Aufzuchttrinder von einer mikrobiellen Proteinsynthese in Höhe von 156 ± 24 g/kg DOS aus, welches bei einem unterstellten N-Verhältnis im Rohprotein von 16 % rund 25 g/kg DOS entspräche. Diese Annahmen zu Grunde legend, kann der P-Bedarf für die einzelnen Fraktionen anhand des N:P-Verhältnisses berechnet werden (Tabelle 19 und Tabelle 20).

Tabelle 19: Ableitung des P-Bedarfs aus dem N : P-Verhältnis in den LAB und LAB-Fractionen

LAB-Fractionen	mikrobielle N-Verbindungen, g N/kg DOS	N : P-Verhältnis	P-Bedarf, g P/kg DOS
fällbarer Rückstand	22,8	15,6	1,5
Filtrat	1,8	0,6	3,6
Fett	0,4	1,1	0,3
Gesamt	25,0	4,3	5,4-5,8*

* Die Spanne ergibt sich aus den während der P-Analyse in den Fraktionen aufgetretenen P-Verlusten in Höhe von 8 % des Gesamt-P-Gehaltes.

Tabelle 20: Ableitung des P-Bedarfs aus dem N:P-Verhältnis in den SAB und SAB-Fractionen

SAB-Fractionen	mikrobielle N-Verbindungen, g N/kg DOS	N:P-Verhältnis	P-Bedarf, g P/kg DOS
fällbarer Rückstand	23,0	12,1	1,9
Filtrat	1,5	0,8	1,9
Fett	0,5	1,6	0,3
Gesamt	25,0	5,6	4,1-4,3*

* Die Spanne ergibt sich aus dem während der P-Analyse in den Fraktionen aufgetretenen P-Verlusten in Höhe von 8 % des Gesamt-P-Gehaltes

Die LAB hätten mit 5,4-5,8 g P/kg DOS einen insgesamt höheren P-Bedarf als die SAB mit 4,1-4,3 g P/kg DOS. VOLDEN und HARSTAD (1998), LEGAY-CARMIER und BAUCHART (1989) sowie MERRY und McALLAN (1983) fanden höhere RNA-Gehalte in den LAB und schlossen daraufhin auf eine höhere Wachstumsrate dieser Bakteriengruppe, die damit auch einen höheren P-Bedarf für Zellbestandteile und ATP hätte. Ein höherer Anteil an grampositiven Bakterien in dieser Bakteriengruppe (RODRIGUEZ et al., 2000) könnte ebenso zu einem höheren P-Bedarf der LAB führen.

Tabelle 21: N : P-Verhältnis in der Literatur und abgeleiteter P-Bedarf¹

Referenz	Proben- quelle	Bakterien	N : P	P-Bedarf, g/kg DOS
eigene Untersuchung	Schafe	LAB	4,31	5,14*
		SAB	5,58	
MEKURIA, 1997	RUSITEC	LAB	6,23	4,01
KOMISARCUK et al., 1987a	RUSITEC	LAB	6,86	3,53*
		SAB	7,31	
MERRY und McALLAN, 1983	Ochsen	LAB	6,28	3,73*
		SAB	7,19	
VAN NEVEL und DEMEYER, 1977	Schafe	LAB ²	8,37	2,99*
CZERKAWSKI, 1976	Schafe	große LAB ¹	7,26	5,55*
		kleine LAB ¹	3,95	

* unterstelltes Verhältnis im Pansen von LAB:SAB ist 1:1

¹ N- und P-Gehalte pro 100 mg kohlenhydratfreier, lufttrockener Substanz angegeben; ² Mittelwert aus 40 Proben, die über zwei Jahre gezogen wurden

Verfährt man mit den Literaturangaben ebenso, ergibt sich bei der Ableitung des mikrobiellen P-Bedarfs eine Spannbreite von 2,99 bis 5,55 (siehe Tabelle 21). Der P-Gehalt der Mikroorganismen scheint – zumindest *in vitro* - nicht durch die P-

Versorgung des Umgebungsmilieus beeinflusst zu sein (MEKURIA, 1997, KOMISARCZUK et al., 1987a), aber zahlreiche andere Einflussmöglichkeiten wie Rationszusammensetzung (LEGAY-CARMIER und BAUCHART, 1989), Isolierungstechnik (HSU und FAHEY, 1990), Wachstumsrate der Mikroorganismen (VAN NEVEL und DEMEYER, 1977) können zumindest auf den N-Gehalt der Pansenbakterien einen Einfluss haben. Die Annahme, dass das N:P-Verhältnis in den Pansenbakterien konstant ist und somit *per se* zur Ableitung des P-Bedarfs herangezogen werden kann, wird bezweifelt.

5.2 Rumen Simulation Technique

5.2.1 Fehlerdiskussion

Die Anzahl der Protozoen lag im ersten Versuchsdurchgang signifikant höher als im zweiten Versuchsdurchgang (t-Test, $p > 0,05$), so dass es nicht ganz gelungen ist, die Umweltbedingungen für beide RUSITEC-Versuchsdurchgänge vollständig gleich zu halten. Es könnte also sein, dass ein Fehler auf die an unterschiedlichen Tagen entnommenen Panseninhalte zurückzuführen ist, obwohl durch den Gebrauch mehrerer Spendertiere und die Verwendung des gleichen Futters für die Spendertiere dem entgegen gewirkt wurde.

Berechnung der Proteinsynthese mittels Isotopenverteilungs- und Verdünnungsmethode

Es kann zu einer Überschätzung der Proteinsynthese der LAB gekommen sein, weil im ersten Schritt der Differentialzentrifugation die Futterreste und Protozoen aus dem Überlauf entfernt und verworfen wurden. Protozoen ist es zwar nicht möglich, den $\text{NH}_3\text{-N}$ -Pool als N-Quelle zu nutzen (JOUANY, 1991), aber sie inkorporieren Bakterien und könnten so ^{15}N -haltige Bakterien in ihre Zellen aufgenommen haben. Die ^{15}N -Menge in den Protozoen wurde somit nicht erfasst und könnte zu einer Überschätzung der Proteinsynthese der LAB geführt haben.

Überschätzung der Proteinsynthese der SAB

Bei der Entnahme der 48 h inkubierten Futterbeutel (Residuen) wurden diese mit insgesamt 60 mL Puffer der jeweiligen P-Stufe gespült. Das ausgepresste „Spülwasser“ wurde in den Fermenter zurückgegeben, aber es ist davon auszugehen, dass noch Pufferlösung im Residuum verblieb. Durch die anschließende Trocknung der Residuen könnte es zu einer Antrocknung des ^{15}N aus dem Puffer gekommen sein. Unter der Annahme, dass die ausgequetschten Residuen nach der Pufferspülung einen T-Gehalt von 40 % aufwiesen, würde dies eine Antrocknung von 10 mL Pufferlösung bedeuten. Bei einer Anreicherung der

Pufferlösung mit ^{15}N in Höhe von 13 %, würden ca. $18,2 \mu\text{g } ^{15}\text{N}$, die an den Residuen haften, von der angetrockneten Pufferlösung stammen. Im Mittel wurde eine Konzentration von 0,128 % ^{15}N bei 161 mg N/d in den Residuen ermittelt. Dies würde einer Menge von $206 \mu\text{g } ^{15}\text{N/d}$ in den Residuen entsprechen. Zieht man die ^{15}N -Menge, die aus der angetrockneten Pufferlösung stammen könnte, von dieser Menge ab, käme man auf eine mikrobielle Proteinsynthese von 303 mg SAB/d ($\text{N} \cdot 6,25$) im Vergleich zu 333 mg SAB/d ohne Berücksichtigung der Pufferantrocknung. Die Antrocknung von 10 mL ^{15}N -haltigem Puffer könnte daher zu einer Überschätzung der Proteinsynthese der SAB im Mittel von 9 % geführt haben. Der Fehler war für alle Behandlungen gleich und wird daher nicht weiter berücksichtigt.

Überschätzung des P-Abbaus aus den Residuen

Bei der Abschätzung des P-Abbaus aus dem Futter (dP) kann es aus folgenden Gründen zu einer Überschätzung gekommen sein:

- a) zur Entnahme der Futterbeutel (Residuen) wurden diese mit insgesamt 60 mL Pufferlösung der jeweiligen P-Stufe gespült und
- b) mikrobiell gebundener P der Mikroorganismen, die an den Futterfasern hingen (SAB), wurde miterfasst.

Der Fehler, der sich aus der Antrocknung von 10 mL P-haltiger Pufferlösung (siehe Überschätzung der Proteinsynthese der SAB) für den P-Abbau ergibt, liegt unter 1 % der Futter-Einwaage und wird daher vernachlässigt.

Um den Fehler abzuschätzen, der durch den mikrobiell gebundenen P entstand, wurde von einem N:P-Verhältnis in den SAB von 5,58 ausgegangen, wie es im Versuch I dieser Arbeit ermittelt wurde. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die SAB vom lebenden Schaf stammten und dass sich dadurch eine gewisse Abweichung zu SAB, die aus einem RUSITEC-Fermenter stammten, resultieren könnte. Dabei ergibt sich für das niedrigste P-Niveau ein P-Abbau von 27 %, bei $4,35 \text{ mmol P}_a/\text{L}$ Pufferlösung 8,1 %, bei $8,71 \text{ mmol P}_a/\text{L}$ Pufferlösung 0 % und für die P-Niveaus der ersten Sammelphase ($8,71\text{-}17,4 \text{ mmol P}_a/\text{L}$ Pufferlösung) ergeben sich Werte, die die der Futtereinwaage übertreffen, womit kein Verschwinden stattgefunden

hätte. Unberücksichtigt bleiben die bereits erwähnten Auswaschungsverluste und die durch Protozoen gebundene P-Menge.

Das Redoxpotential lag mit -209 und -252 mV höher als bei MEKURIA (1997). Ein „unphysiologischer“ Fermenterinhalt wird nicht angenommen, da auch das direkt im Pansensaft gemessene Redoxpotential bei -240 mV lag (Messung vom 28.08.2000) und andere Merkmale wie Protozoenzahl und pH-Wert durchaus den Ergebnissen anderer Autoren entsprachen.

Die Futtermittelverluste, die durch Auswaschung entstanden, konnten nicht quantifiziert werden. Diese Verluste werden durch die Größe der Futterpartikel, die Porengröße und die Durchflussrate bestimmt. Die Auswaschungsverluste bei der verwendeten Maissilage sind als eher gering einzustufen, da die Silagepartikel größer als 1 cm waren. Das Kraftfutter könnte aufgrund seiner groben Körnung höheren Auswaschungsverlusten unterworfen gewesen sein. Die Porengröße wurde nach den Ergebnissen von CARRO et al. (1995) auf $100\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt, da sie bei dieser Porengröße mehr Protozoen im Vergleich zu geringeren Porengrößen ($40\text{ }\mu\text{m}$) und einen besseren Nährstoffabbau der NDF und T fanden als bei einer Porengröße von $200\text{ }\mu\text{m}$. Die Durchflussrate von $0,55$ in den eigenen Untersuchungen lag im Vergleich zu Literaturangaben eher niedrig (GODOY und MESCHY, 2001; MEKURIA, 1997; CARRO et al., 1995; KOMISARCZUK et al. 1986).

5.2.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben

In Tabelle 22 sollen die bereits im Literaturteil ausführlicher beschriebenen Ergebnisse der anderen Autoren dargestellt werden. Die Pfeile geben die beobachteten Veränderungen bei einer abgesunkenen P-Versorgung über die Pufferlösung an. Dabei gelten als Merkmale des Umgebungsmilieus der pH-Wert und die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im Fermenter, das täglich gebildete Gasvolumen und die Anzahl an Protozoen. Für die fermentative Leistung der Mikroorganismen wurde die Produktion der VFA, der Abbau der OS sowie der Zellwandbestandteile NDF und ADF herangezogen. Die Veränderung der mikrobiellen Proteinsynthese bei einer P-

Reduzierung sollte anhand der täglich synthetisierten LAB-N- und SAB-N-Menge, sowie die Verwendung des $\text{NH}_3\text{-N}$ -Pools zur mikrobiellen Proteinsynthese charakterisiert werden, die mikrobielle Effizienz wurde als zusätzliches Merkmal aufgeführt.

In den eigenen Untersuchungen wurden außer einer Erhöhung des pH-Wertes und eines Anstiegs der Buttersäurenkonzentration, die ohne Folgen für die gesamt gebildeten VFA und das Fettsäurenmuster blieb, keinerlei Veränderungen beobachtet. Die Diskussion soll daher eher der Frage folgen, warum – trotz vergleichbarer P_a -Konzentrationen in der Pufferlösung – keine Auswirkungen auf die mikrobielle Fermentationsleistung und Proteinsynthese beobachtet wurden.

Tabelle 22: Absenkung der P-Konzentration *in vitro*: Auswirkung auf Umgebungsmilieu, Fermentation und Proteinsynthese

Quelle Merkmal	RUSITEC				Continuous Culture	
	Eigene Arbeit	MEKURIA, 1997	KOMI-SARCZUK et al., 1986; 1987a	DURAND et al., 1986	KOMI-SARCZUK et al.; 1987b	KOMI-SARCZUK et al.; 1984
pH	↑	↓	↑	n.g.	↑	↑
NH ₃ -N	k.V.	↑	↑	k.A.	↑	↑
Gas	n.V.	n.V.	↓	↑	n.g.	n.g.
Protozoen	k.V.	k.V.	k.V.	k.A.	k.V.	↓
VFA	k.V.	↓	↓	↓	↓	↓
OS	k.V.	↓	↓	↓	↓ ¹	n.g.
NDF	k.V.	n.g.	↓	↓	↓ ²	n.g.
ADF	k.V.	n.g.	↓	↓	↓ ³	n.g.
LAB	k.V.	↓	↓	↓	↓ ⁴	n.g.
SAB	k.V.	n.g.	↓	n.g.	n.g.	n.g.
NH ₃ -N-Gebrauch	k.V.	↓	↓	k.A.	k.V.	n.g.
Mikrobielle Effizienz	k.V.	↓	↓	k.A.	k.V.	n.g.

k.V. keine Veränderung, ↓ gesunken, ↑ angestiegen, n.g. nicht gemessen, k.A. keine Angaben;
 NH₃-N NH₃-N im Fermenter; Gas Gasvolumen; VFA flüchtige Fettsäuren, OS organische Substanz;
 NDF Neutrale Detergenzienfaser; ADF Saure Detergenzienfaser;
 LAB liquid associated bacteria; SAB solid associated bacteria;
 NH₃-N-Gebrauch Verwendung des N aus NH₃-N-Pool zur mikrobiellen Proteinsynthese;
 Mikrobielle Effizienz gemessen als g Mikroorganismen-N/kg fermentierter OS

↓¹ Abbau der fermentierten OS aus VFA-Produktion berechnet;

↓² Abbau von Arabinose, Xylose;

↓³ Abbau von Cellulose-Glucose

↓⁴ gemessen als mikrobieller N-Fluß

5.2.2.1 Merkmale des Umgebungsmilieus

Als Merkmale von Veränderungen des Umgebungsmilieus bei einer P-Depletion scheinen der pH-Wert und die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration sensibel zu reagieren. Der in der eigenen Untersuchung festgestellte Anstieg des pH-Wertes bei P-Depletion wurde ebenfalls von KOMISARCZUK et al. (1984; 1986; 1987a; 1987b) beobachtet und könnte als erstes Anzeichen einer Veränderung des Fermentationsprozesses gewertet werden. Der bei MEKURIA (1997) berichtete pH-Wert-Abfall könnte eventuell auf eine veränderte Pufferkapazität der P-reduzierten Pufferlösung zurückzuführen sein, da Na_2HPO_4 nur gegen NaCl ausgetauscht wurde und das Puffersystem nicht wie bei KOMISARCZUK et al. (1984; 1986; 1987a; 1987b), DURAND et al. (1986) und in der eigenen Arbeit durch NaHCO_3 ersetzt wurde.

Ein Einfluss der P_a -Konzentration auf das Redoxpotential konnte auch von MEKURIA (1997) nicht festgestellt werden. Das Redoxpotential scheint als Maß für den Sauerstoffeintrag in ein System ein geeignetes Merkmal zur Überprüfung der anaeroben Verhältnisse zu sein, die aber eher auf methodische Fehler schließen lassen als auf Effekte der mikrobiellen Fermentationsleistung.

Die Anzahl der Protozoen war mit 1,58 bis $2,90 \cdot 10^4$ Zellen/mL höher als die von MEKURIA (1997) und niedriger als die von KOMISARCZUK et al. (1987a, 1987b) in der flüssigen Phase gezählten Protozoen. Die Protozoen der festen Phase wurden nicht berücksichtigt, zeigten sich aber bei KOMISARCZUK et al. (1987a) unbeeinflusst von der P_a -Versorgung und machten etwa 5 % der Anzahl der Protozoen aus, die im flüssigen Fermenterinhalt gezählt wurden. Bei KOMISARCZUK et al. (1984) sank die Protozoenanzahl in Abhängigkeit der P_a -Konzentration, welches von keinem weiteren Autor berichtet werden konnte (MEKURIA, 1997; KOMISARCZUK et al., 1987a; 1987b).

Das Gasvolumen zeigte ebenfalls keine Beeinflussung durch die P_a -Konzentration und lag etwas höher als die von MEKURIA (1997) berichteten Gasmengen pro Tag (mL/d). Ein möglicher Grund für die höheren Gasvolumina könnte der höhere Trockenschnitzelanteil in der eigenen Ration sein (CHUDASKE, 2000). DURAND et al. (1986a) dokumentierten eine Erhöhung der Gasmengen pro Tag bei reduzierter P_a -

Konzentration. Allerdings lagen die gemessenen Gasvolumina bei 0,5 L pro Tag, während sie in den eigenen Untersuchungen um 2,8 L pro Tag lagen. Unklar bleibt, wie DURAND et al. (1986a) das Gasvolumen maßen.

5.2.2.2 Auswirkungen auf mikrobielle Fermentationsleistung und Proteinsynthese

Bei Versuchen mit unterschiedlicher P-Versorgung wird häufig nur die P_a -Konzentration des Puffers genannt und die gegebenenfalls beobachteten Veränderungen der Fermentationsleistung und Proteinsynthese der Mikroorganismen auf diese P-Konzentration bezogen, ohne dass andere P-Quellen im System (Futter-P, mikrobiell gebundener P) berücksichtigt werden. Bei Untersuchungen an laktierenden Ziegen maßen KODDEBUSCH und PFEFFER (1988) bei einer knappen P-Versorgung eine Verwertbarkeit des Futter-P von 90 %. Die Ergebnisse von GODOY und MESCHY (2001) zeigen, dass in einem RUSITEC-System Phytin-Phosphor von den Mikroorganismen des Pansens als P-Quelle genutzt werden konnte. In der eigenen Untersuchung wurde deutlich, dass bei sinkender P-Versorgung mit der Pufferlösung mehr P aus dem Futter verschwand. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mikroorganismen bei knapper P-Versorgung einen Teil ihres P-Bedarfs mit dem Futter-P decken. Im Vergleich zu den Untersuchungen von MEKURIA (1997), KOMISARCZUK et al. (1986, 1987a) und DURAND et al. (1986) kam in der eigenen Untersuchung mehr P über das Futter in den Fermenter (vgl. Tabelle 2). Ein Vergleich zu den Ergebnissen aus den Continuous Culture Systemen (Komisarczuk et al. 1987b, 1984) erscheint nicht sinnvoll, da aufgrund der unterschiedlichen Verweilzeit des Futters im Fermenter die Möglichkeit der mikrobiellen Ausnutzung des Futter-P verschieden sein wird.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass aufgrund mikrobieller Lyse P freigesetzt werden kann, der dann ebenso zur Deckung des mikrobiellen P-Bedarfs herangezogen würde. Die Abschätzung der mikrobiellen Proteinsynthese mittels ^{15}N gibt die Netto-Synthese wieder, die Brutto-Synthese (Zellwachstum und –lyse) ist nicht bekannt.

Die Durchflussrate könnte ein weiterer Einflussfaktor auf die Auswirkungen einer P-Depletion auf die mikrobielle Proteinsynthese sein. Sie war bei MEKURIA (1997) mit $0,75 \text{ d}^{-1}$ und bei DURAND et al. (1986a) mit $1,0 \text{ d}^{-1}$ deutlich höher als in den eigenen Versuchen ($0,56 \text{ d}^{-1}$). Mit steigender Wachstumsrate steigt auch der Ertragskoeffizient Y_{ATP} (g Zelltrockenmasse/Mol ATP) an, welches von ISAACSON et al. (1975) an einem Continuous Culture System gezeigt werden konnte. Bei höheren Durchflussraten und damit höheren Wachstumsraten wird mehr P für die Bildung von ATP und Nukleinsäuren benötigt, der P-Bedarf läge demnach höher als in Systemen mit niedrigerer Durchflussrate.

Sowohl LAB als auch SAB scheinen bei einer P-Reduzierung den Gebrauch von $\text{NH}_3\text{-N}$ als N-Quelle einzuschränken, was aber überwiegend auf die reduzierte mikrobielle Proteinsynthese zurückzuführen war (MEKURIA, 1997; KOMISARCZUK et al. 1987a, 1987b). MEKURIA (1997) beobachtete ebenfalls einen Anstieg der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration im Überlauf der mit einer reduzierten Proteinsynthese der LAB einherging, welches übereinstimmt mit den von KOMISARCZUK et al. (1987b) an einem Continuous Culture System gefundenen Ergebnissen. Der Anteil des $\text{NH}_3\text{-N}$ im Überlauf, der aus dem Futterabbau stammte, war bei KOMISARCZUK et al. (1987a) 4 % Punkte geringer als in den eigenen Untersuchungen (10-16 %).

In den eigenen Versuchen, die keine Einschränkung der mikrobiellen Proteinsynthese zeigten, stammten immerhin rund 56 % des mikrobiellen N (LAB 57 %, SAB 54 %) aus dem NH_3 -Pool. MEKURIA (1997) konnte bei einem N-Angebot in der Pufferlösung von 1 mmol N/L, welches dem des eigenen Versuchs entsprach, eine negative, additive Wirkung einer reduzierten P- und N-Versorgung auf die mikrobielle Proteinsynthese feststellen. Dass im eigenen Versuch selbst bei der niedrigsten P-Versorgungsstufe keine Auswirkungen auf die mikrobielle Proteinsynthese beobachtet werden konnte, kann u.a. an der höheren N- und P-Versorgung über das Futter liegen (eigene Untersuchung $0,322 \text{ g N/d}$ und $0,024 \text{ g P/d}$, vgl. Tabelle 2).

Bei KOMISARCZUK et al. (1987a) finden sich Hinweise, dass die schrittweise Absenkung der P_a -Konzentration im RUSITEC-Fermenter zu einer besseren Anpassung der Mikroorganismen an eine knappe P-Versorgung führen kann. Es wurden zwei Fermenter mit einer P_a -Konzentration von $3,87 \text{ mmol/L}$ Pufferlösung und zwei

Fermenter mit einer P-freien Pufferlösung infundiert. Beim Start der RUSITEC-Fermentation mit einer P-freien Pufferlösung wurden geringere N-Gehalte in den LAB analysiert als beim Start mit einer P_a -Konzentration von 3,87 mmol/L. Nach einem cross over der Pufferlösungen konnte kein Unterschied zwischen ausreichender und reduzierter P_a -Versorgung beobachtet werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Proteinsynthese der SAB, die vor dem cross over bei reduzierter P_a -Versorgung geringer war, nach dem cross over konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden P-Versorgungsniveaus festgestellt werden. In der eigenen Untersuchung wurde jeweils die P_a -Konzentration in der Pufferlösung um ca. 8,7 mmol/L abgesenkt und es ist nicht auszuschließen, dass die Absenkung von 8,58 auf 0 mmol P_a /L Pufferlösung den Mikroorganismen eine Möglichkeit zur Anpassung an geringere P_a -Konzentrationen gegeben hat. Daher wäre eine zusätzliche qualitative Überprüfung der Mikroorganismenpopulation wünschenswert, um eine Verschiebung in den Bakterienspezies aufdecken zu können.

Die mikrobielle Effizienz, die als mikrobiell inkorporierter N (g) pro fermentierter OS (kg) angegeben wird, war ebenfalls bei einer P-reduzierten Pufferlösung (MEKURIA, 1997; KOMISARCZUK et al., 1987a) signifikant erniedrigt. KOMISARCZUK et al. (1987a) berechneten die fermentierte OS nach einer Formel von VAN NEVEL und DEMEYER (1977), die aus der Produktion der VFA auf die Anzahl an fermentierten Hexosen schließt. Dahinter steht die Überlegung, dass die C-Atome in den VFA Essig-, Propion- und Buttersäure aus der Fermentation der Glucose stammen, so dass ein Mol Glucose in zwei Mol Essig-, zwei Mol Propion- oder in ein Mol Buttersäure umgewandelt wird. Im eigenen Versuch änderte sich weder der Abbau der OS noch die Produktion der flüchtigen Fettsäuren. Damit war eine Auswirkung auf die mikrobielle Effizienz nicht zu erwarten.

Die Produktion an VFA insgesamt wurde in der eigenen Arbeit nicht vom P_a -Niveau der Pufferlösung beeinflusst. Obwohl bei einer P-Versorgung von 0 mmol/L Pufferlösung signifikant weniger Buttersäure (6,04 mmol/d vs. 5,07 mmol/d) gebildet wurde, konnte weder eine signifikante Verschiebung der molaren Anteile noch eine negative Auswirkung auf die gesamt gebildeten VFA beobachtet werden. Zusammen

mit dem pH-Wert-Anstieg könnte dies aber ein erstes Indiz für eine veränderte Fermentation bei P-Mangel sein. Eine Veränderung der fermentativen Leistung unter P-Depletionsbedingungen wurde sowohl von MEKURIA (1997), KOMISARCZUK et al. (1987a; 1987b; 1984) als auch von DURAND et al. (1986a) beobachtet. KOMISARCZUK et al. (1987b) beobachteten im Continuous Culture System, dass die Konzentration der VFA bereits bei einer P_a -Konzentration im Fermenter eingeschränkt wurde, die noch ausreichend zu sein schien für die mikrobielle Proteinsynthese. Daraus schließen die Autoren, dass der P-Bedarf für uneingeschränkte mikrobielle Fermentationsleistung höher ist, als der für uneingeschränkte mikrobielle Proteinsynthese. Mit durchschnittlich 46,2 mmol VFA/d wurden in der eigenen Untersuchung etwas höhere Produktionsraten erreicht, als von MEKURIA (1997) und DURAND et al. (1986a) jeweils für die Kontrolle berichtet wurde. Dies ist zu einem Teil auf die geringere Durchflussrate und die damit verbundene höhere Akkumulation der Fermentationsendprodukte im Überlauf zu erklären. Bei DURAND et al. (1986) könnte der im Vergleich zur eigenen Arbeit geringere Abbau der OS auf eine geringere Fermentierbarkeit deuten und damit zu einer geringeren Produktion an VFA geführt haben.

Residuen

Während von anderen Autoren negative Einflüsse auf den Nährstoffabbau von OS, NDF und ADF in Abhängigkeit sinkender P_a -Konzentration in der Pufferlösung berichtet wurden (MEKURIA, 1997, KOMISARCZUK et al., 1987a; DURAND et al., 1986a), unterblieben diese in der eigenen Arbeit. Die Höhe des Abbaus der OS lag bei 51 % und war damit vergleichbar mit dem von MEKURIA (1997) und KOMISARCZUK et al. (1987a) ermittelten Nährstoffabbau der OS (51 % und 55 %) bei ausreichender P-Versorgung. Der von DURAND et al. (1986a) für mit Natronlauge behandeltes Stroh gemessene Abbau der OS lag mit max. 40 % deutlich darunter. Der von KOMISARCZUK et al. (1987a) und von DURAND et al. (1986a) berichtete Abbau der Hemicellulosen lag bei 40 % und damit etwas niedriger als die in der eigenen Untersuchung (im Mittel bei 47 %). Ein Einfluss durch die P-Versorgung konnte im Gegensatz zu den zitierten Experimenten nicht gefunden werden.

5.3 Hohenheimer Futterwerttest

5.3.1 Fehlerdiskussion

Durch die Kombination der *in vitro* Inkubationssysteme RUSITEC und HFT können sich additive Fehler ergeben haben. Da als Inkubationsmedium für den HFT eine Menge von ca. 1,6 L Überlauf benötigt wurde, war es notwendig, den Überlauf aus insgesamt drei Fermentern zu sammeln. Der Überlauf stammte aus einem RUSITEC-Versuch, der die Auswirkungen unterschiedlicher N-Quellen auf die Fermentationsmerkmale und die mikrobielle Proteinsynthese prüfen sollte. Es wurden neben einer Basisration zwei Rationen geprüft, die sich lediglich in ihrer N-Quelle unterschieden. Aus diesen Fermentern wurde der Überlauf über 24 h zusammengeführt und als Starterkultur für den HFT-Versuch genutzt. Dies könnte zur Entwicklung einer spezifischen Mikroorganismenpopulation geführt haben. In den Fermentern aufgetretene Unterschiede, z.B. in der mikrobiellen Proteinsynthese, könnten ein Hinweis darauf sein. Andererseits wurde durch das Vereinigen der drei Überläufe eine gute Durchmischung erreicht. Die Anfangsbedingungen innerhalb eines HFT-Versuches müssten für alle Kolben gleich gewesen sein. Eine P-Versorgung, die bei den RUSITEC-Rationen zwischen 23,8 und 24,4 mg P/d lag, kann nach den Ergebnissen des Versuch II dieser Arbeit als ausreichend angesehen werden. Daher werden Auswirkungen auf die mikrobielle Fermentationsleistung und Proteinsynthese aufgrund eines P-Mangels im RUSITEC-System weitestgehend ausgeschlossen.

Die Veränderungen, die sich während des Sammelns des Überlaufs über 24 h bei 39°C ereigneten, können nicht abgeschätzt werden. Ohne die Zufuhr von Substrat könnte eine erhöhte mikrobielle Lyse stattgefunden haben. Das im HFT nach 24 h gebildete Gasvolumen der inkubierten Standards entsprach nur 55,3 % der Heu- und 65,7 % der Kraftfutter-Standardgasbildung des HFT nach VDLUFA-Methode (NAUMANN und BASSLER, 1976). Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Mikroorganismenpopulation im Pansensaft zahlreicher ist als im RUSITEC, damit könnten die geringeren Gasbildungswerte theoretisch auf eine geringere Mikroorganismenzahl zurückgeführt werden. Das Inkubationsmedium bestand aus einem Gemisch aus Überlauf und Pufferlösung, wobei die Mischung unter CO₂-

Begasung stattgefunden hatte. Trotzdem könnte es zu einem Sauerstoffeintrag beim Umschütten gekommen sein, der die überwiegend fakultativ anaeroben Mikroorganismenpopulation beeinflusst haben könnte. Die Verwendung von Resazurinlösung, wie dies beim HFT nach VDLUFA-Methode (NAUMANN und BASSLER, 1976) vorgenommen wird, hätte dies eventuell verhindern können. Der Einfluss über einen möglichen Sauerstoffeintrag ist nicht abschätzbar. Dazu müssten noch weitere Versuche dieser Art durchgeführt werden – mit und ohne Resazurin-zusatz.

Im Versuch B wurden nach 24 h Inkubation im Mittel 32 % weniger VFA gemessen als im ersten Versuch. Die pH-Werte der Inkubationsmedien vor Inkubationsbeginn unterschieden sich lediglich bei der niedrigsten P-Stufe (6,57 im Versuch A und 6,84 im Versuch B), die niedrigeren VFA-Werte wurden allerdings bei allen P-Stufen beobachtet. Die Gasbildung beim Heu- und Kraftfutterstandard entsprach im Versuch B nur 48 % bzw. 61 % des Standardgasbildungswertes und lag damit niedriger als bei Versuch A. Ob dies auf Tagesschwankungen des RUSITEC-Systems bezüglich Mikroorganismenpopulation zurückzuführen ist oder andere Einflussfaktoren dies bedingten, bleibt unklar. Festzustellen bleibt, dass sich die Auswirkungen einer unterschiedlichen P_a -Versorgung auf die Gasbildung und die VFA bei der Inkubation von Cellulose und Pektin nur in Versuch B zeigten und dass in diesem Versuch die cellulolytischen Bakterien (gemessen am Heu-Standard) eine stärkere Depression der Gasbildungswerte aufwiesen als die amylolytischen (gemessen am Kraftfutter-Standard). Möglicherweise ist diese Reaktion auf (geringe) unterschiedliche P_a -Konzentrationen zurückzuführen, da im Versuch B bei der mittleren P-Stufe eine P_a -Konzentration von 2,29 mmol/L erreicht wurde, bei Versuch A hingegen 2,48 mmol/L. Eventuell lag im Versuch B bei dieser P-Stufe bereits eine Einschränkung der mikrobiellen Aktivität aufgrund eines P-Mangels vor.

5.3.2 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben

OWEN et al. (1991) zeigten bereits bei der Verwendung von RUSITEC-Überlauf zum Start der zweistufigen *in vitro* Verdaulichkeitsmethode von TILLEY und TERRY (1963),

dass von einer guten Übereinstimmung zur Verwendung von Pansensaft in Bezug zur Verdaulichkeit der Trockenmasse ausgegangen werden kann.

Die Abstufung der Futtermittel bezüglich Gasbildung war wie erwartet: Pektin zeigte vor Stärke und Cellulose die höchsten Gasbildungswerte. Diese Rangierung wiederholte sich beim Vergleich der Bildung der VFA. Eine Abhängigkeit zur P_a -Konzentration des Inkubationsmediums wurde in beiden Versuchen beobachtet. In Versuch A war allerdings die Bildung der VFA nur bei der Inkubation von Stärke beeinflusst. Die Gasbildung nach 24 h zeigte im Versuch B einen positiven Einfluss durch die P_a -Konzentration, der im Versuch A nicht beobachtet werden konnte.

Im Versuch B zeigte sich bei der Inkubation von Cellulose bereits bei einer Reduzierung der P_a -Konzentration im Inkubationsmedium von 3,87 auf 2,29 mmol/L eine Einschränkung der Produktion der VFA, die sich hauptsächlich auf Essig- und Propionsäure bezog. Zur Bildung von Essigsäure wird das Coenzym Thiaminpyrophosphat benötigt, dessen Synthese bei P-Mangel eingeschränkt wird. Damit fällt Acetyl-CoA in größeren Mengen an, welches nach Kondensation von zwei Mol Acetyl-CoA zu einem Mol Buttersäure umgewandelt wird (MEKURIA, 1997). Propionsäure kann nach Reduktion zu Lactat über Acrylyl-CoA oder nach Carboxylierung zu Oxalacetat über Succinat und Methylmalonyl-CoA gebildet werden. Allerdings müssen gleichzeitig Ferredoxine aus dem Abbau von Pyruvat zu Essigsäure frei werden (MENKE und HUSS, 1987). Eine reduzierte Essigsäurebildung kann demnach eine reduzierte Propionsäuresynthese zur Folge haben.

Die Inkubation von Pektin führte in Versuch B wie bei der Cellulose zu einem Rückgang der Essigsäurebildung, die allerdings bei der niedrigsten P-Stufe einen Anstieg der Propionsäurebildung übertraf und insgesamt ebenfalls bei einer P_a -Konzentration im Inkubationsmedium von 2,29 zu einem Rückgang der VFA führte. Beim Abbau von Pektin scheint es demnach nur zu einem Rückgang der Essigsäurebildung gekommen sein.

Bei der Inkubation von Stärke zeigte sich eine umgekehrte Abhängigkeit zur P_a -Konzentration im Inkubationsmedium: in beiden Versuchen wurde bei der niedrigsten P_a -Konzentration (0,90 mmol/L) mehr VFA gebildet als bei höheren P_a -Konzentrationen (2,48 und 3,77 mmol/L im Versuch A bzw. 2,29 und 3,87 mmol/L im

Versuch B), wobei dies überwiegend auf eine Reduzierung der Essigsäurebildung bei 0,90 mmol/L zurückzuführen ist. Bei *in vitro* Untersuchungen von RAAB (1980) wurde bei der Inkubation von Stärke mit einem Pansensaft-Puffer-Gemisch beobachtet, dass die gebildete Gasmenge bis sechs Stunden nach Inkubationsbeginn stark anstieg und nach acht Stunden geringer wurde. Die aus der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration abgeschätzte mikrobielle Proteinsynthese stieg ebenfalls zunächst stark an um nach einem Maximum bei acht bis neun Stunden nahezu linear abzufallen. Bei Übertragung der Ergebnisse von RAAB (1980) auf die eigene Untersuchung würde dies eine geringere Wachstumsrate der Mikroorganismen nach $\frac{1}{3}$ der Fermentationszeit bedeuten, die wiederum mit einer höheren Energieaufwendung für den Erhaltungsbedarf einherginge (HESPELL und BRYANT, 1979). Nach HVELPLUND (1991) wird in Situationen mit einer geringen Effizienz der mikrobiellen Synthese die Bildung der VFA erhöht, da den Mikroorganismen aufgrund des eingeschränkten Zellaufbaus mehr Substrat zur Fermentation zur Verfügung steht. Die Ergebnisse von DURAND et al. (1983), die eine gute Übereinstimmung der Inkorporation von ^{32}P und damit dem mikrobiellen Wachstum mit der Bildung der VFA zeigten, stellen keinen Widerspruch dar, weil sie aus Inkubationen stammen, die nur drei Stunden dauerten. Die Energie in Form von Stärke ist für die Mikroorganismen relativ leicht zu Glucose abbaubar, weshalb die Wachstumsrate der Mikroorganismen zu Beginn der Fermentation recht hoch ist. Ob das Abfallen der Wachstumsrate auf das Erschöpfen des Substrats oder des Mangels von N oder anderer Einflussfaktoren zurückzuführen ist, vermag hier nicht geklärt zu werden.

Damit läge der P-Bedarf der cellulolytischen Bakterien über dem der amylolytischen Bakterien, die pektinolytischen scheinen wie die cellulolytischen Bakterien sensibel auf eine reduzierte P-Versorgung zu reagieren, allerdings in einem schwächeren Ausmaß. FRANCIS et al. (1978) beobachteten einen direkten stimulierenden Effekt auf die Cellulase-Aktivität durch die Zugabe von P. Sie vermuten, dass Natriumphosphat Inhibitoren der extracellulären Cellulase im Pansensaft deaktiviert und zusätzlich die Cellulase-Aktivität stimuliert. Somit wäre der höhere P-Bedarf der cellulolytischen Bakterien ursächlich auf die enzymatische Aktivität zurückzuführen. Studien an Reinkulturen der beiden wichtigen cellulolytischen Bakterien *Ruminococcus*

flavefaciens und *Fibrobacter succinogenes* (KOMISARCZUK et al., unveröffentlicht, zitiert bei DURAND et al. 1989) weisen aber zusätzlich auf einen unterschiedlichen P-Bedarf der Bakterien hin. *Ruminococcus flavefaciens* (grampositiv) benötigte für maximales Wachstum eine höhere P_a -Konzentration im Medium. KOMISARCZUK et al. (unveröffentlicht, zitiert bei DURAND et al. 1989) vermuten als Ursache die in den Zellwänden der grampositiven Bakterien enthaltene Teichonsäure, die bis zu 4 % des mikrobiellen P ausmachen kann (DURAND und KAWASHIMA, 1980).

Die Ergebnisse von KOMISARCZUK et al. (1987b), die in einem Continuous Culture System gewonnen wurden, bestätigen die These, dass für die Cellulolyse mehr P benötigt wird als für die Amylolyse.

Die ermittelten P_a -Konzentration, bei denen eine Einschränkung der cellulolytischen Aktivität bzw. der fermentativen Leistung gegenüber der Kontrolle festgestellt wurden, liegen bei den Autoren sehr weit auseinander (eigene Arbeit, KOMISARCZUK et al., 1987b; unveröffentlicht, zitiert bei DURAND et al., 1989). Dafür kann es mehrere Gründe geben:

- Offene und geschlossene Systeme sind aufgrund der unterschiedlichen Verweilzeit des Futters und des Abflusses bzw. der Akkumulation der Fermentationsendprodukte nicht vergleichbar.
- Die verwendeten Cellulose-Substrate variieren hinsichtlich ihres Kristallisierungsgrades und der Länge der Fibrillen, was die Rate der Cellulolyse beeinflusst (FRANCIS et al., 1978).
- Unterschiedliche P-Bestimmungsmethoden können zu unterschiedlichen Konzentrationsangaben führen.

Die Ergebnisse der Cellulose-Inkubation stehen im Einklang mit den von DURAND und KAWASHIMA (1980) aus verschiedenen *in vitro* Experimenten gefolgerten Schlüssen, dass im Mittel 3,23 mmol verfügbaren P/L Inkubationsmedium ausreichend seien um optimales mikrobielles Wachstum und cellulolytische Aktivität zu gewährleisten.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden drei Versuche durchgeführt mit dem Ziel der Ableitung des P-Bedarfs von Pansenmikroorganismen, wobei die unterschiedlichen Bakteriengruppen des Pansens einerseits aufgrund ihres Habitats – flüssige Phase (LAB) oder feste Phase (SAB) im Pansen – und andererseits aufgrund ihrer Substratspezifität – cellulolytische, amylolytische oder pektinolytische Bakterien – berücksichtigt werden sollten.

In einem ersten Versuch wurde über die Bestimmung des N:P-Verhältnisses in den Pansenbakterien von Schafen der P-Bedarf abgeschätzt werden. Legt man zu Grunde, dass im Pansen 156 ± 24 g/kg DOS Mikrobenprotein ($N \cdot 6,25$) pro Tag (GfE 2001, 2003) gebildet werden, ergibt sich für die LAB ein täglicher P-Nettobedarf von 5,4-5,8 g P/kg DOS und für die SAB von 4,1-4,3 g P/kg DOS.

Daneben sollte durch eine Fraktionierung der Pansenbakterien in Fett, Protein (fällbaren Rückstand) und Rest (Filtrat) und die Bestimmung des N:P-Verhältnisses in diesen Fraktionen eine grobe Ableitung des P-Bedarfs für diese Fraktionen vorgenommen werden.

Das N:P-Verhältnis in der Fraktion Fett scheint bei LAB und SAB ähnlich zu sein. Unterschiede zeigen sich in der Fraktion fällbarer Rückstand und Filtrat, aus denen geschlossen werden kann, dass zumindest die P-haltigen Verbindungen der beiden Mikroorganismengruppen verschieden sind. Der Reinprotein-Anteil der LAB und SAB liegt über 90%. Unterstellt man die oben genannten Annahmen, ergibt sich für die LAB der höchste P-Bedarf für die Verbindungen, die sich im Filtrat befinden (3,6 g P/kg DOS), gefolgt von den Verbindungen, die sich im fällbaren Rückstand wieder finden (1,5 g P/kg DOS). Bei den SAB leitet sich für die Verbindungen beider Fraktionen ein P-Bedarf von 1,9 g P/kg DOS ab. Der P-Bedarf für die Verbindungen der Fraktion Fett ist mit 0,3 g P/kg DOS gering und für beide Bakteriengruppen gleich.

Aus den eigenen Ergebnissen und nach Durchsicht der Literatur wird ein konstantes N:P-Verhältnis in den Bakterien und ihren Fraktionen Fett, Protein und Rest bezweifelt. Das N:P-Verhältnis kann zur Ableitung des P-Bedarfs herangezogen

werden, wenn es unter den exakten Versuchsbedingungen ermittelt wurde. Die Allgemeingültigkeit dieser Aussagen ist allerdings fraglich.

In einem zweiten Versuch wurde mittels einer Pansensimulationstechnik (RUSITEC) geprüft, wie hoch der P-Bedarf unter dynamischen Bedingungen für das mikrobielle Wachstum und die mikrobielle Fermentationsleistung ist. Aus den eigenen Untersuchungen und vergleichbaren Arbeiten anderer Autoren konnte geschlossen werden, dass es zwischen dem P-Bedarf für mikrobielles Wachstum (LAB und SAB) und mikrobielle Fermentationsleistung *in vitro* wahrscheinlich keine Unterschiede gibt. Da in der eigenen Untersuchung keine Auswirkung einer P-freien Pufferlösung auf die mikrobielle Proteinsynthese und Fermentationsleistung gefunden wurde, wird der P-Bedarf auf kleiner 0,73 mmol/L Inkubationsmedium geschätzt. Ob die Durchflussrate, die Verwertbarkeit des Futter-P und/oder eine Adaptation der Mikroorganismenpopulation die Auswirkungen einer reduzierten P-Versorgung beeinflussen, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Eine Modifikation des Hohenheimer Futterwerttests gab darüber Aufschluss, ob der P-Bedarf für die mikrobielle Fermentationsleistung - gemessen als Gasbildung und Produktion flüchtiger Fettsäuren (VFA C₂-C₅) – beim Abbau von Cellulose, Pektin oder Stärke unterschiedlich ist. Als Starterkultur diente der Überlauf eines RUSITEC-Versuches mit geringer P-Versorgung. Durch das Mischen des RUSITEC-Überlaufs mit einer Pufferlösung, die unterschiedliche P_a-Konzentrationen aufwies, konnten drei P-Stufen zwischen 3,84 und 0,90 mmol P_a/L Inkubationsgemisch geprüft werden. Dabei zeigte sich, dass für die Synthese der VFA C₂-C₅ aus dem Abbau von Cellulose und Pektin ein höherer P-Bedarf notwendig war als aus dem Abbau von Stärke, da die Bildung der flüchtigen Fettsäuren bei der Inkubation von Cellulose und Pektin bereits bei einer P_a-Konzentration von 2,29 mmol/L bzw. 0,90 mmol/L Inkubationsmedium eingeschränkt wurde. Die Gasbildung wurde bei allen Futtermitteln bei einer P-Stufe von 0,90 mmol P_a/L reduziert. Der Rückgang der Gasbildung, die als Maß der Energieausnutzung eines Futtermittels angesehen werden kann, würde bedeuten, dass der P-Bedarf für Inkubationen über 24 h in einem geschlossenen System höher läge ($\leq 2,29$ mmol P_a/L Inkubationsmedium), als für Langzeitinkubationen mit einem offenen System ($\leq 0,73$ mmol P_a/L).

Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich neue Fragestellungen, die in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden sollten.

- Eine quantitative und qualitative Überprüfung der Mikroorganismenpopulation *in vivo* und *in vitro* könnte Aufschlüsse über eine mögliche Veränderung der aktiven Mikroorganismenpopulation unter P-Mangelbedingungen geben.
- Eine genauere chemische Analyse der Fraktionen Fett, fällbarer Rückstand und Filtrat könnte die Zugehörigkeit zu einzelnen Zellbestandteilen - wie z.B. Komponenten der Zellwand - klären.
- Kenntnisse über die Veränderung der Zellbestandteile bzw. der P-haltigen Verbindungen bei unterschiedlichen Wachstumsraten könnten zu einer differenzierteren Ermittlung des mikrobiellen P-Bedarfs führen.
- Die Verwendung des RUSITEC-Überlaufs als Starterkultur für den Hohenheimer Futterwerttest sollte in weiteren Versuchen überprüft werden.
- Die Überprüfung der Verwertbarkeit des Futter-P in Abhängigkeit der Verweilzeit im Pansen könnte weitere Aussagen über den Gebrauch des Futter-P durch die Mikroorganismen bei knapper P-Versorgung ermöglichen.

7 Tabellenanhang

7.1 Fraktionierung der Pansenmikroorganismen

Tabelle A 1: Bezugsquellen der Mikroorganismen

Mikroorganismus	Bezugsquelle	Handelsname
<i>Halomonas elongata</i>	Institut für Mikrobiologie, Universität Bonn	
<i>Bacillus licheniformis</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	Fa. Biochem GmbH, Lohne	BioPlus 2B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stüssgen Handelskette, Bonn	Wieninger Hefe. Die gute bayrische

7.2 Rumen Simulation Technique (RUSITEC)

Tabelle A 2: Spuren- und Vitaminvormischung aus Versuch II (RUSITEC)

	Zusatzstoffe je kg
Vitamin A	200000 IE
Vitamin D ₃	20000 IE
Vitamin E	1700 IE
Eisen	4500 mg
Zink	4500 mg
Mangan	4500 mg
Kupfer	800 mg
Jod	50 mg
Kobalt	10 mg
Selen	10 mg

Tabelle A 3: Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 1, Sammelphase 1

Probe	P _a -Konzentration im Puffer Fermenter	mmol/L	8,60		13,3		17,5	
			3	6	2	5	1	4
Fermenter- inhalt	pH		6,43	6,37	6,36	6,29	6,24	6,35
	Redox	mV	-220	-206	-223	-207	-211	-223
	Protozoen	x 10 ⁴ /mL	2,1	2,4	1,7	2,4	2,4	1,4
	Gasvolumen	mL/d	3084	3020	2708	2335	2808	2916
	Überlauf	mL/d	599	600	588	589	590	590
partikelfreier Überlauf	P _a im Fermenter	mmol/L	7,2	7,3	11,5	11,1	15,4	15,4
	NH ₃ -N	mmol/L	7,0	6,0	7,0	6,7	7,1	6,3
	VFA	mmol/d	46,5	44,0	36,9	46,8	50,2	41,2
	Essigsäure	mmol/d	27,2	25,4	21,8	27,0	29,3	24,0
	Propionsäure	mmol/d	10,3	10,02	7,94	10,66	11,09	9,26
	Iso-Buttersäure	mmol/d	0,3	0,3	0,24	0,29	0,3	0,24
	Buttersäure	mmol/d	4,79	4,50	3,88	4,71	5,01	4,13
	Iso-Valeriansäure	mmol/d	1,74	1,68	1,35	1,83	2,01	1,59
	Valeriansäure	mmol/d	2,22	2,1	1,71	2,3	2,48	2,01
Futter und Residuen	LAB	mg N/d	127	136	91	129	77	124
	Einwaage	g T/d	13,95	13,95	13,95	13,95	13,95	13,95
	Rückwaage	g T/d	7,11	7,11	7,11	7,11	7,11	7,11
	P verschwunden	mg/d	8,3	6,7	4,4	4,4	2,8	1,1
	OS verschwunden	g/d	6,7	6,7	6,6	6,9	6,5	6,5
	XP verschwunden	g/d	0,99	0,93	0,92	0,97	0,98	0,96
	NDF verschwunden	g/d	1,98	2,09	1,84	2,24	1,72	1,93
	ADF verschwunden	g/d	0,56	0,51	0,52	0,73	0,42	0,6
	SAB	mg N/d	52	53	42	61	43	63

Tabelle A 4: Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 1, Sammelphase 2

Probe	P _a -Konzentration im Puffer Fermenter	mmol/L	0,02		4,33		8,73	
			3	6	2	5	1	4
Fermenter- inhalt	pH		6,57	6,56	6,38	6,4	6,41	6,45
	Redox	mV	-253	-262	-236	-256	-237	-257
	Protozoen	x 10 ⁴ /mL	1,7	0,9	1,5	1,9	2,1	1,1
	Gasvolumen	mL/d	3127	2967	2753	3127	3020	3133
	Überlauf	mL/d	573	577	558	564	544	563
partikelfreier Überlauf	P _a im Fermenter	mmol/L	1,3	1,4	4,3	4,5	8,1	7,4
	NH ₃ -N	mmol/L	8,6	8,7	6,5	8,7	8,1	8,4
	VFA	mmol/d	49,0	46,7	44,2	49,5	46,2	46,4
	Essigsäure	mmol/d	29,5	28,0	26,0	29,3	27,4	27,7
	Propionsäure	mmol/d	10,32	9,81	8,59	9,75	8,81	9,01
	Iso-Buttersäure	mmol/d	0,34	0,35	0,33	0,34	0,33	0,34
	Buttersäure	mmol/d	4,87	4,67	5,47	5,97	5,6	5,41
	Iso-Valeriansäure	mmol/d	1,66	1,5	1,56	1,75	1,69	1,69
	Valeriansäure	mmol/d	2,29	2,42	2,23	2,42	2,39	2,31
Futter und Residuen	LAB	mg N/d	92	88	90	84	87	81
	Einwaage	g T	13,95	13,95	13,95	13,95	13,95	13,95
	Rückwaage	g T	7,11	7,11	7,11	7,11	7,10	7,11
	P verschwunden	mg/d	15,8	14,2	11,8	11,1	9,8	9,0
	OS verschwunden	g/d	6,81	6,74	6,92	7,18	6,33	6,43
	XP verschwunden	g/d	1,04	0,96	1,01	0,98	0,97	0,94
	NDF verschwunden	g/d	2,18	2,2	1,99	2,42	1,85	2,03
	ADF verschwunden	g/d	0,57	0,66	0,37	0,61	0,51	0,48
	SAB	mg N/d	58	70	60	68	X	64

Tabelle A 5: Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 2, Sammelphase 1

Probe	P _a -Konzentration im Puffer Fermenter	mmol/L	8,56		12,8		17,4	
			3	6	2	5	1	4
Fermenter- inhalt	pH		6,48	6,47	6,41	6,49	6,27	6,43
	Redox	mV	-220	-237	-207	-228	-181	-221
	Protozoen	x 10 ⁴ /mL	3040	2644	2604	2308	3008	2932
	Gasvolumen	mL/d	564	563	546	583	540	572
	Überlauf	mL/d	2,5	2,7	2,9	2,8	5,9	1,9
partikelfreier Überlauf	P _a im Fermenter	mmol/L	7,4	7,5	11,3	11,3	15,1	14,9
	NH ₃ -N	mmol/L	6,7	7,7	7,1	6,9	7,7	6,6
	VFA	mmol/d	46,3	46,8	45,6	44,8	45,6	44,8
	Essigsäure	mmol/d	27,2	27,6	26,9	26,2	27,2	26,4
	Propionsäure	mmol/d	9,81	9,52	9,22	9,21	9,29	9,39
	Iso-Buttersäure	mmol/d	0,34	0,34	0,33	0,35	0,32	0,29
	Buttersäure	mmol/d	5,3	5,46	5,57	5,48	5,35	5,21
	Iso-Valeriansäure	mmol/d	1,35	1,46	1,31	1,4	1,19	1,32
	Valeriansäure	mmol/d	2,31	2,37	2,29	2,21	2,27	2,23
Futter und Residuen	LAB	mg N/d	109	101	107	109	107	88
	Einwaage	g T/d	13,92	13,92	13,92	13,92	13,92	13,92
	Rückwaage	g T/d	6,98	6,97	6,97	6,97	6,97	6,97
	P verschwunden	mg/d	9,6	8,8	5,5	6,5	3,9	2,4
	OS verschwunden	g/d	6,69	6,54	6,40	6,81	6,84	6,33
	XP verschwunden	g/d	1,03	1,00	1,00	1,02	1,08	0,97
	NDF verschwunden	g/d	1,9	1,8	1,86	2,03	1,96	1,82
	ADF verschwunden	g/d	0,48	0,44	0,46	0,48	0,6	0,4
	SAB	mg N/d	57	51	56	55	55	51

Tabelle A 6: Einzeldaten der Fermenter: Versuchsdurchgang 2, Sammelphase 2

Probe	P _a -Konzentration im Puffer Fermenter	mmol/L	0		4,43		8,67	
			3	6	2	5	1	4
Fermenter- inhalt	pH		6,53	6,54	6,45	6,48	6,37	6,43
	Redox	mV	-244	-249	-227	-247	-202	-246
	Protozoen	x 10 ⁴ /mL	2268	3052	2752	2744	3248	2848
	Gasvolumen	mL/d	549	559	543	583	541	569
	Überlauf	mL/d	1,8	1,9	1,6	1,7	1,5	1,6
partikelfreier Überlauf	P _a im Fermenter	mmol/L	1,3	1,2	4,4	4,4	7,7	7,6
	NH ₃ -N	mmol/L	9,3	8,1	9,1	7,4	7,9	7,9
	VFA	mmol/d	48,7	47,6	48,1	49,2	50,3	43,0
	Essigsäure	mmol/d	29,2	28,5	27,9	28,4	29,0	24,9
	Propionsäure	mmol/d	9,77	9,61	9,07	9,57	9,58	8,42
	Iso-Buttersäure	mmol/d	0,33	0,34	0,33	0,35	0,38	0,34
	Buttersäure	mmol/d	5,49	5,25	6,74	6,71	6,77	5,63
	Iso-Valeriansäure	mmol/d	1,7	1,57	1,68	1,75	1,95	1,54
	Valeriansäure	mmol/d	2,19	2,35	2,44	2,45	2,6	2,16
Futter und Residuen	LAB	mg N/d	109	101	107	109	107	88
	Einwaage	g T/d	13,92	13,92	13,92	13,92	13,92	13,93
	Rückwaage	g T/d	6,97	6,97	6,97	6,97	6,97	6,98
	P verschwunden	mg/d	17,7	17,7	13,4	13	11,4	10,5
	OS verschwunden	g/d	6,85	6,67	7,16	7,23	7,13	7,05
	XP verschwunden	g/d	1,14	1,15	1,09	1,11	1,17	1,1
	NDF verschwunden	g/d	2,25	2,05	2,13	2,32	2,21	2,24
	ADF verschwunden	g/d	0,59	0,53	0,46	0,53	0,57	0,53
	SAB	mg N/d	40	46	48	55	43	45

7.3 Hohenheimer Futterwerttest

Tabelle A 7: Komponenten des Kraftfutters im RUSITEC-Versuch (Versuch III)

Komponenten, g/kg	Rationsvariante	
	Variante H	Variante Wk
Trockenschnitzel	959	890
Weizenkleber	-	100
Harnstoff	30	-
Vormischung	11	10
Einwaage, g/d	7,0	7,5

H Harnstoff; Wk Weizenkleber

Tabelle A 8: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Versuch A und Versuch B

Parameter	Signifikanz des F-Wertes					
	Versuch A			Versuch B		
	FM	P-Stufe	FM*P-Stufe	FM	P-Stufe	FM*P-Stufe
Gasbildung 8 h	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000
Gasbildung 24 h	0,000	0,003	n.s.	0,000	0,000	0,000
C ₂	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
C ₃	n.s.	n.s.	n.s.	0,000	0,000	0,000
I-C ₄	0,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C ₄	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I-C ₅	n.s.	0,002	n.s.	nicht möglich		
C ₅	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C ₂ -C ₅	0,000	n.s.	0,010	0,000	0,000	0,000

FM Futtermittel; P-Stufe P_a-Konzentration im Inkubationsmedium; n.s. nicht signifikant; nicht möglich Iso-Valeriansäure-Bildung war geringer als die des Blindwertes; C₂ Essigsäure, C₃ Propionsäure; I-C₄ Iso-Buttersäure; C₄ Buttersäure; I-C₅ Iso-Valeriansäure; C₅ Valeriansäure

Tabelle A 9: Mittelwertsvergleich (SNK-Test) der Futtermittel bei signifikantem F-Wert

Parameter	Mittelwertsvergleiche Futtermittel					
	Versuch A			Versuch B		
	Cellulose	Stärke	Pektin	Cellulose	Stärke	Pektin
Gasbildung 8 h	c	a	b	c	a	b
Gasbildung 24 h ml	c	b	a	c	b	a
C ₂	c	b	a	c	b	a
C ₃	x	x	x	b	c	a
I-C ₄	a	b	b	x	x	x
C ₄ μmol	b	a	b	c	a	b
I-C ₅	x	x	x	nicht möglich		
C ₅	b	a	b	c	a	b
C ₂ -C ₅	c	b	a	c	b	a

C₂ Essigsäure, C₃ Propionsäure; I-C₄ Iso-Buttersäure; C₄ Buttersäure; I-C₅ Iso-Valeriansäure; C₅ Valeriansäure; x nicht durchgeführt

Tabelle A 10: Mittelwertsvergleich (SNK-Test) der P_a-Konzentration im Inkubationsmedium bei signifikantem F-Wert

Parameter	Mittelwertsvergleiche Futtermittel					
	Versuch A			Versuch B		
	0,90*	2,48	3,77	0,90	2,29	3,84
Gasbildung 8 h	n.s.	n.s.	n.s.	b	a	a
Gasbildung 24 h ml	n.s.	n.s.	n.s.	c	b	a
C ₂	a	b	b	a	c	b
C ₃	x	x	x	a	c	b
I-C ₄	x	x	x	x	x	x
C ₄ μmol	c	a	b	b	b	a
I-C ₅	b	a	b	nicht möglich		
C ₅	c	a	b	c	b	a
C ₂ -C ₅	x	x	x	a	c	b

C₂ Essigsäure, C₃ Propionsäure; I-C₄ Iso-Buttersäure; C₄ Buttersäure; I-C₅ Iso-Valeriansäure; C₅ Valeriansäure; x nicht durchgeführt; * nicht gemessen

Es folgen die multiplen Mittelwertsvergleiche, die bei signifikanter Wechselwirkung der beiden Faktoren Futtermittel und P-Stufe durchgeführt wurden. Unterschiedliche Buchstaben in Zeilen und Spalten bedeuten signifikante Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Futtermitteln und zwischen P-Stufen ($p \leq 0,05$).

Tabelle A 11: Multipler Mittelwertsvergleich - Gasbildung nach 8 h

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	D	A	BC	0,90	D	B	C
2,48	D	A	B	2,29	D	A	C
3,77	D	A	C	3,84	D	A	C

* nicht gemessen

Tabelle A 12: Multipler Mittelwertsvergleich - Gasbildung nach 24 h

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	x	x	x	0,90	F	C	D
2,48	x	x	x	2,29	E	B	BC
3,77	x	x	x	3,84	E	B	A

* nicht gemessen

Tabelle A 13: Multipler Mittelwertsvergleich – Essigsäure

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	C	A	A	0,90	E	C	C
2,48	C	B	A	2,29	E	F	B
3,77	C	B	A	3,84	D	E	A

* nicht gemessen

Tabelle A 14: Multipler Mittelwertsvergleich – Propionsäure

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	x	x	x	0,90	C	C	A
2,48	x	x	x	2,29	C	D	B
3,77	x	x	x	3,84	B	D	B

* nicht gemessen

Tabelle A 15: Multipler Mittelwertsvergleich – Buttersäure

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	C	B	C	0,90	G	C	D
2,48	C	A	C	2,29	H	B	E
3,77	C	A	C	3,84	F	A	D

* nicht gemessen

Tabelle A 16: Multipler Mittelwertsvergleich – Valeriansäure

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	D	C	D	0,90	E	C	D
2,48	D	A	D	2,29	E	B	E
3,77	D	B	D	3,84	E	A	D

* nicht gemessen

Tabelle A 17: Multipler Mittelwertsvergleich - VFA Gesamt (C₂-C₅)

	Versuch A				Versuch B		
P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin	P _a -Konz.	Cellulose	Stärke	Pektin
0,90*	C	A	A	0,90	EF	C	BC
2,48	C	B	A	2,29	EF	F	B
3,77	C	B	A	3,84	D	E	A

* nicht gemessen

Tabelle A 18: Gasbildung nach 8 h (mL)

Versuch	P _a -Konz. (mmol/L)	Futtermittel					
		Cellulose		Stärke		Pektin	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
Versuch A	0,90*	0,6	0,3	30,7	1,0	25,9	0,2
	2,48	0,8	0,3	30,6	0,9	27,0	3,2
	3,77	1,5	0,6	29,6	0,5	23,8	2,0
Versuch B	0,9	0,0	0,0	24,4	1,4	11,1	1,9
	2,29	0,3	0,3	33,1	0,7	11,9	1,2
	3,84	0,3	0,3	31,8	1,0	11,2	1,5

* nicht gemessen

Tabelle A 19: Mittelwert und Standardabweichung der flüchtigen Fettsäuren in $\mu\text{mol}/200 \text{ mg}$ Einwaage von Versuch A

FM	P-Stufe		C2	C3	I-C4	C4	I-C5	C5	C2-C5
Stärke	0,90*	MW	983	211	0	47	0	21	1262
		SD	65	40	0	8	0	8	15
	2,48	MW	688	222	0	109	6	41	1066
		SD	88	77	0	10	5	3	175
	3,81	MW	735	164	0	103	0	35	1037
		SD	23	5	0	3	0	2	15
Cellulose	0,90*	MW	434	205	4	26	0	4	673
		SD	20	3	0	2	0	0	18
	2,48	MW	423	212	4	30	4	5	678
		SD	22	9	0	3	0	2	33
	3,81	MW	399	187	3	24	0	0	613
		SD	11	12	2	2	0	0	25
Pektin	0,90*	MW	957	221	0	23	0	4	1205
		SD	61	17	0	5	0	4	84
	2,48	MW	1052	230	0	34	0	8	1324
		SD	15	15	0	0	0	2	32
	3,81	MW	1020	235	0	31	0	4	1290
		SD	39	24	0	3	0	0	66

* nicht gemessen; C2 Essigsäure; C3 Propionsäure; I-C4 Iso-Buttersäure; C4 Buttersäure; I-C5 Iso-Valeriansäure; C5 Valeriansäure; C2-C5 VFA Gesamt

Tabelle A 20: Mittelwert und Standardabweichung der flüchtigen Fettsäuren in $\mu\text{mol}/200 \text{ mg}$ Einwaage von Versuch B

FM	P-Stufe		C2	C3	I-C4	C4	I-C5	C5	C2-C5
Stärke	0,90	MW	764	113	1	54	0	40	972
		SD	47	12	2	2	0	0	59
	2,29	MW	137	2	0	67	0	76	282
		SD	15	2	0	3	0	6	24
	3,84	MW	227	22	0	80	0	81	410
		SD	19	3	0	5	0	3	26
Cellulose	0,90	MW	216	110	0	15	0	0	341
		SD	6	10	0	2	0	0	14
	2,29	MW	214	106	0	9	0	0	329
		SD	16	5	0	3	0	0	24
	3,84	MW	331	144	0	24	0	3	502
		SD	27	11	0	3	0	2	43
Pektin	0,90	MW	785	187	0	44	0	12	1028
		SD	43	30	0	2	0	2	74
	2,29	MW	875	160	0	35	0	4	1074
		SD	52	5	0	2	0	0	59
	3,84	MW	973	163	0	47	0	15	1198
		SD	50	5	0	5	0	2	56

* nicht gemessen; C2 Essigsäure; C3 Propionsäure; I-C4 Iso-Buttersäure; C4 Buttersäure; I-C5 Iso-Valeriansäure; C5 Valeriansäure; C2-C5 VFA Gesamt

8 Literaturverzeichnis

AIPLE, K.-P. (1993)

Vergleichende Untersuchungen mit Pansensaft und Kot als Inokulum im Hohenheimer Futterwerttest. Diss. agr., Universität Hohenheim: 138 Seiten

ANDERSSON, R.J. (1939)

The chemistry of the lipoids of the tubercle bacillus and certain other microorganisms. Fortschritte in der Chemie organischer Naturstoffe 3: 145-164

BAUCHART, D.; LEGAY-CARMIER, F.; DOREAU, M. und GAILLARD, B. (1990)

Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. British Journal of Nutrition 63 (3): 563-578

BIRD, S.H. (1991)

Role of protozoa in relation to the nutrition of the host animal. In Ho, Y.W.; WONG, H.K.; ABDULLAH, N.; TAJUDDIN, Z.A. (eds.): Recent Advances on the nutrition of herbivores. Malaysian Society of Animal Production, Kuala Lumpur: 171-180

BRANDT, M. und ROHR, K. (1981)

Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen. I. Mitteilungen. FAL, Braunschweig-Völkenrode: 39-48.

BREVES, G. (1985)

Phosphor- und Calciumumsatz sowie Flüssigkeitspassagen und mikrobielle Verdauungsvorgänge im Gastrointestinaltrakt von Schafen in einer experimentellen P-Depletion. Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover: 124 Seiten

BREVES, G. (1991)

Physiologische Grundlagen des gastrointestinalen P-Umsatzes und Bedeutung einer nicht bedarfsdeckenden P-Versorgung bei kleinen Wiederkäuern. Übersichten zur Tierernährung 19: 23-44.

BREVES, G. und HÖLLER, H. (1987)

Effects of dietary phosphorus depletion in sheep on dry matter and organic matter digestibility. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 58: 280-286

BREVES, G. und HÖLLER, H. (1989)

Phosphorus deficiency in ruminants: interrelation between dietary phosphorus supply and gastrointestinal metabolism. In: Recent progress on mineral nutrition and mineral requirements in ruminants. Proceedings of the international meeting on mineral nutrition and mineral requirements in ruminants. Kyoto, Japan: 35-41

BREVES, G. und SCHRÖDER, B. (1991)

Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. Nutrition Research Reviews 4: 125-140

BREVES, G.; ROSENHAGEN, C. und HÖLLER, H. (1987)

Die Sekretion von anorganischem Phosphor mit dem Speichel bei P-depletierten Schafen. Journal of Veterinary Medicine. A 34: 42-47

BUCHOLTZ, H. F. and BERGEN, W. G. (1973)

Microbial phospholipids synthesis as a marker for microbial protein synthesis in the rumen. Applied Microbiology 25(5): 504-513

CARRO, M.D.; LEBZIEN, P. und ROHR, K. (1995)

Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. Small Ruminant Research 15: 113-119.

CHUDASKE, C. (2000)

Einfluss von pektinreichen Futtermitteln, N-Methylträgern und Monensin auf die Fermentation und Methanogenese in der Pansensimulationstechnik. Diss. agr., Universität Gießen: 201 Seiten

CRAIG, W.M.; BROWN, D.R.; BRODERICK, G.A. und RICKER, D.B. (1987)

Post-prandial compositional changes of fluid- and particle associated ruminal microorganisms. Journal of Animal Science 65: 1042-1048

CZERKAWSKI, J.W. (1976)

Chemical composition of microbial matter in the rumen. Journal of the Science of Food and Agriculture 27: 621-632

CZERKAWSKI, J.W. (1986)

An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford: 235 Seiten

CZERKAWSKI, J.W. und BRECKENRIDGE, G. (1977)

Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). British Journal of Nutrition 38: 371-384

CZERKAWSKI, J.W. und BRECKENRIDGE, G. (1979)

Experiments with the long-term rumen simulation technique (RUSITEC); use of soluble food and an inert solid matrix. British Journal of Nutrition 42: 229-245

DEMEYER, D.I.; HENDERSON, C. und PRINS, R.A. (1978)

Relative significance of exogenous and *de novo* synthesized fatty acids in the formation of rumen microbial lipids *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology 35: 24-31

DLG [Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft] (1997)

DLG- Futterwerttabellen Wiederkäuer. Universität Hohenheim – Dokumentationsstelle (edt.); DLG-Verlag, Frankfurt am Main: 212 Seiten

DURAND, M. und KAWASHIMA, R. (1980)

Influence of minerals in rumen microbial digestion. In RUCKEBUSH, Y und THIVEND, P. (edts.): Digestive physiology and metabolism in ruminants. MTP Press, Lancaster: 375-383.

DURAND, M. und KOMISARCZUK, S. (1988)

Influence of major minerals on rumen microbiota. Journal of Nutrition 118: 249-260

DURAND, M.; BERTIER, B.; HANNEQUART, G. und GUÉGUEN, L. (1982)

Influence d'une subcarence en phosphore et d'un excès de calcium alimentaire sur la phosphatémie et les teneurs en phosphore et calcium des contenus de rumen du mouton. Reproduction, Nutrition, Développement 22: 865-879

DURAND, M.; BEAUMATIN, P. und DUMAY, C. (1983a)

Estimation *in vitro* à l'aide du phosphore radioactif des besoins en phosphore des microorganismes du rumen. Reproduction, Nutrition, Développement 23: 727-739

DURAND, M.; BOXEBELD, A.; DUMAY, C. und BEAUMATIN, P. (1983b)

Influence of the level of dietary phosphorus on urea utilization by rumen microorganisms in lambs. In IVth International Symposium on protein metabolism and nutrition, Clermont-Ferrand, Frankreich. INRA, Publ. II: 263-266

DURAND, M.; BEAUMATIN, P.; DUMAY, C.; MESCHY, F. und KOMISARCZUK, S. (1986a)

Influence de l'addition de phosphore sur la digestion d'une paille traitée à l'ammoniac par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu. Reproduction, Nutrition, Développement 26 (1 B): 297-298

DURAND, M.; HANNEQUARDT, G.; BEAUMATIN, P.; DUMAY, C. und TASSERY, F. (1986b)
Influence du niveau d'apport de soufre sur la synthèse d'acid ribonucléique et de
protéines par les microorganismes du rumen en fermenteur semi-continu.
Reproduction, Nutrition, Développement 26 (1 B): 299-300.

DURAND, M.; KOMISARCUK-BONY, S. und MESCHY, F. (1989)
Phosphorus requirement for rumen microbial activity. In: Recent progress on mineral
nutrition and mineral requirements in ruminants. Proceedings of the international
meeting on mineral nutrition and mineral requirements in ruminants. Kyoto, Japan:
27-34

FOLCH, J.; LEES, M. und SLOANE-STANLEY, G.H. (1957)
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
Journal of Biological Chemistry 226: 497-509.

FONTY, G. (1991)
The rumen anaerobic fungi. In JOUANY, J.-P. (ed.): Rumen microbial metabolism and
ruminant digestion. Paris, INRA Editions: 53-70

FRANCIS, G.L.; GAWTHORNE, J.M. und STORER, G.B. (1978)
Factors affecting the activity of cellulases isolation from the rumen digesta of sheep.
Applied and Environmental Microbiology 36: 643-649

FRIEDMANN, L.; GAINES, D.W.; NEWELL, R.F.; SMITH, M.C.; BRAUNBERG, R.C.; FLYNN,
T.J. und O'DONNELL M.W. Jr. (1995)
Growth patterns in selected organs of the miniature swine as determination by gross
macromolecular composition. Journal of Animal Science 73: 1340-1350.

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere] (1978)
Energie und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 1. Empfehlungen zur
Mineralstoffversorgung. DLG-Verlag, Frankfurt am Main: 61 Seiten

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere] (1986)

Energie und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 3 Milchkühe und Aufzuchtrinder. DLG-Verlag, Frankfurt am Main: 92 Seiten

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie] (1993)

Mitteilungen des Ausschusses für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie: Überarbeitete Empfehlungen zur Versorgung von Milchkühen mit Calcium und Phosphor. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 1: 108-113

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie] (2001)

Energie und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 8. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder. DLG-Verlag, Frankfurt am Main: 136 Seiten

GfE [Gesellschaft für Ernährungsphysiologie] (2003)

Energie und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 9. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Ziegen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main: 121 Seiten

GIESECKE, D. (1973)

Biologie und Biochemie der Bakterien im Pansen. In GIESECKE, D. und HENDERICKX, H.K. (eds.): Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung. BLV Verlagsgesellschaft, München, Bern, Wien: 5-57

GODOY, S. und MESCHY, F. (2001)

Utilisation of phytase phosphorus by rumen bacteria in a semi-continuous culture system (RUSITEC) in lactating goats fed on different forage to concentrate ratios. Reproduction, Nutrition, Développement 41: 259-265

GREENBERG, N.A. und SHIPE, W.P. (1979)

Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. *Journal of Food Science* 44: 735-737

HARMEYER, J. (1973)

Protozoologie des Pansens. In GIESECKE, D. und HENDERICKX, H.K. (eds.): *Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung*. BLV Verlagsgesellschaft, München, Bern, Wien: 58-107

HESPELL, R.B. und BRYANT, M.P. (1979)

Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP} . *Journal of Animal Science* 49: 1640-1659

HORNUNG, M. (1983)

Untersuchungen zum diätetischen Phosphormangel bei Schafen. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover: 82 Seiten

HSU, J.T. und FAHEY, J.G.C. (1990)

Effects of centrifugation speed and freezing on composition of ruminal bacterial samples collected from defaunated sheep. *Journal of Dairy Science* 73: 149-152.

HUNGATE, R.E. (1966)

The rumen and its microbes. Academic Press, New York: 533 Seiten

HVELPLUND, T. (1986)

The influence of diet on nitrogen and amino acid content of mixed rumen bacteria. *Acta Agriculturae Scandinavica* 36: 325-331

HVELPLUND, T. (1991)

Volatile fatty acids and protein production in the rumen. In JOUANY, J.-P. (ed.): *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris, INRA Editions: 165-178

- ISAACSON, H.R.; HINDS, F.C.; BRYANT, M.P. UND OWENS, F.N. (1975)
Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in Continuous Culture.
Journal of Dairy Science 58: 1645-1659
- JOUANY, J.-P. (1991)
Defaunation of the rumen. In JOUANY, J.-P. (ed.): Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris, INRA Editions: 239-261
- KODDEBUSCH, L. und PFEFFER, E. (1988)
Untersuchungen zur Verwertbarkeit von Phosphor verschiedener Herkunft an laktierenden Ziegen. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 60: 269-275
- KOMISARCZUK-BONY, S. und DURAND, M. (1991a)
Nutrient requirements of rumen microbes. In HO, Y.W.; WONG, H.K.; ABDULLAH, N.; TAJUDDIN, Z.A. (edts.): Recent Advances on the nutrition of herbivores. Malaysian Society of Animal Production, Kuala Lumpur: 133-142
- KOMISARCZUK-BONY, S. und DURAND, M. (1991b)
Effects of minerals on microbial metabolism. In JOUANY, J.-P. (ed.): Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris, INRA Editions: 179-198
- KOMISARCZUK, S.; MERRY, R.J.; MCALLAN, A.B.; SMITH, R.H. und DURAND, M. (1984)
Use of a continuous culture system to study phosphorus requirements in the rumen. Canadian Journal of Animal Science 64 (Suppl.): 35-36
- KOMISARCZUK, S.; DURAND, M.; DUMAY, C. und MOREL, M.-T. (1986)
Use of a semi-continuous culture system (RUSITEC) to study the effects of phosphorus deficiency on rumen microbial digestion. In: DUBOURGUIER, H.C. (ed.) Biology of anaerobic bacteria. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam: 47-53.

KOMISARCZUK, S.; DURAND, M.; BEAUMATIN, P. und HANNEQUART, G. (1987a)
Effects of phosphorus deficiency on rumen microbial activity associated with the solid and liquid phase of a fermentor (RUSITEC). *Reproduction, Nutrition, Développement* 27 (5): 907-919.

KOMISARCZUK, S.; MERRY, R.J. und McALLAN, A.B. (1987b)
Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *British Journal of Nutrition* 57: 279-290

KOMISARCZUK, S.; GAUDET, G.; HANNEQUART, G.; FONTY, G. und DURAND, M. (1988)
Effets d'une sub-carence en phosphore sur divers paramètres de l'activité cellulolytique de *Bacteroides succinogenes*. *Reproduction, Nutrition, Développement* 28 (1): 79-80

KRAWIELITZKI, R. und VOIGT, J. (1988)
Der Einfluss unterschiedlicher Zentrifugationsbedingungen bei der Isolierung gemischter Pansenbakterien auf deren Gehalt an Stickstoff und Diaminopimelinsäure. *Archives of Animal Nutrition* 38: 1-11

LEGAY-CARMIER, F. und BAUCHART, D. (1989)
Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplement with soya-bean oil. *British Journal of Nutrition* 61: 725-740

LESSMANN, H.-W. (1985)
Der Einfluss einer diätetischen Phosphordepletion auf den Nettozuwachs an mikrobiell gebundenem Stickstoff im Pansen von Schafen. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover: 79 Seiten

LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M. und VAN SOEST, P.J. (1996)
Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology* 57: 347-358.

MARTIN, C.; WILLIAMS, A.G. und MICHALET-DOREAU, B. (1994)

Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *Journal of Animal Science* 72: 2962-2968.

MARTIN-ORUE, S.M.; BALCELLS, J.; ZAKRAOUI, F. und CASTRILLO, C. (1998)

Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Animal Feed Science and Technology* 71: 269-282

MAURUSCHAT, A. (1996)

Untersuchungen zum Einfluss von Roquefortin auf Fermentationsvorgänge im Panseninhalt des Rindes (*in vitro*). Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover: 204 Seiten

MCALLAN, A.B. und SMITH, R.H. (1969)

Nucleic acid metabolism in the ruminant. Determination of nucleic acids in digesta. *British Journal of Nutrition* 23: 671-682

MCALLAN, A. B. und SMITH, R. H. (1974)

Carbohydrate metabolism in the ruminant. Bacterial carbohydrate formed in the rumen and their contribution to digesta entering the duodenum. *British Journal of Nutrition* 31: 77-88

McDOUGALL, E. (1948)

Studies on ruminant saliva. *The biochemical Journal* 43: 99 –109

MEKURIA, B. (1997)

In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss der P- und N-Versorgung auf mikrobielle Stoffwechselleistungen im Pansen. Diss. med. vet., Universität Gießen: 125 Seiten

MENKE, K.H. und HUSS, W. (1987)

Tierernährung und Futtermittelkunde. Ulmer Verlag, Stuttgart. 3. Auflage: 424 Seiten

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D. und SCHNEIDER, W. (1979)

The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science, Cambridge 93: 217-222

MERRY, R.J. und McALLAN, A.B. (1983)

A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fraction of rumen bacteria. British Journal of Nutrition 50: 701-709

MERRY, R.J.; SMITH, R.H. und McALLAN, A.B. (1982)

Glycosyl ureides in ruminant nutrition. 2. *In vitro* studies on the metabolism of glycosyl ureides and their free component molecules in rumen contents. British Journal of Nutrition 48: 287-304

MERRY, R.; SMITH, R. und McALLAN, A. (1987)

Studies of rumen function in an *in vitro* continuous culture system. Archives of Animal Nutrition 37: 475-488

MILTON, J.T.B. und TERNOUTH, J.H. (1984)

The effects of phosphorus upon *in vitro* microbial digestion. Animal production in Australia : proceedings of the Australian Society of Animal 15: 472-475

MÜSCHEN, H. (1987)

Untersuchungen zur Anpassung des Phosphor-Stoffwechsels laktierender Milchziegen an mangelhafte Phosphor-Aufnahme. Diss. agr., Universität Bonn: 123 Seiten

MÜSCHEN, H.; PETRI, A.; BREVES, G. und PFEFFER, E. (1988)

Response of lactating goats to low phosphorus intake 1. Milk yield and faecal excretion of P and Ca. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 111: 255-263

NAUMANN, C. und BASSLER, R. (1976)

Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.

Methodenbuch, Band III mit Ergänzungslieferungen von 1983, 1988, 1993 und 1997 in loser Blattsammlung. VDLUFA-Verlag, Darmstadt

OLUBOBOKUM, J.A.; CRAIG, W.M. und NIPPER, W.A. (1988)

Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *Journal of Animal Science* 66: 2701-2710

ORPIN, C.G. und HO, Y.W. (1991)

Ecology and function of the anaerobic rumen fungi. In HO, Y.W.; WONG, H.K.; ABDULLAH, N.; TAJUDDIN, Z.A. (edts.): *Recent Advances on the nutrition of herbivores*. Malaysian Society of Animal Production, Kuala Lumpur: 163-170

OWEN, E.; JAYASURIYA, M.C.N.; HAMILTON, R. und LALENTA, M. (1991)

Use of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC) to provide micro-organisms for *in vitro* digestability assays. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 116: 297-301

PAUEN, A. (1990)

Veränderungen im Stoffwechsel laktierender Ziegen nach Umstellung auf eine Phosphor-Depletion und im Verlauf einer anschließenden -Repletion. Diss. agr., Universität Bonn: 164 Seiten

PETRI, A. (1987)

Quantifizierung von N-Umsetzungen in laktierenden Ziegen mittels intraruminaler Dauerinfusion von ¹⁵N-Ammoniumsalzen bei angemessener und mangelhafter Phosphor-Versorgung. Diss. agr., Universität Bonn: 161 Seiten

PRINS, R.A. (1991)

The rumen ciliates and their function. In JOUANY, J.-P. (ed.): Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris, INRA Editions: 39-52

PRÜSTEL, N. (1994)

Untersuchungen der Pansensimulationstechnik RUSITEC zum Einfluss von Nitrat und Harnstoff auf mikrobielle Fermentation und Nitratumsatz. Diss. agr., Universität Gießen: 118 Seiten

RAAB, L. (1980)

Untersuchungen über den Proteinabbau und die Proteinsynthese im künstlichen Pansen. Diss. agr., Universität Hohenheim: 89 Seiten

RODEHUTSCORD, M. (1992)

Untersuchungen zur Anpassung der mikrobiellen Aktivität im Pansen von Milchziegen an stark variierte Phosphor-Zufuhr. Diss. agr., Universität Bonn: 127 Seiten

RODRIGUEZ, C.A.; GONZALES, J.; ALVIR, M.R.; REPETTO, J.L.; CENTENO, C. und LAMRANI, F. (2000)

Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. British Journal of Nutrition 84: 369-376.

SAUER, F. D. und TEATHER, R. M. (1987)

Changes in oxidation reduction potentials and volatile fatty acids production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. Journal of Dairy Science 70: 1835-1840

SIEGFRIED, R. (1989)

Protein- und Gesamtstickstoff-Bestimmung mit Hilfe des FP-228 im Vergleich mit anderen Analysenverfahren. Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 335: 489-492

SMITH, R.H. (1975)

Nitrogen metabolism in the rumen and the composition and nutritive value of nitrogen compounds entering the duodenum. In: McDONALD, I.W. und WARNER, A.C.I. (eds.) Digestion and Metabolism in the Ruminant. The University of New South Wales Publishing Unit: 399-415

SMITH, R.H. (1984)

Minerals and rumen function. In: Nuclear Techniques in Tropical Animal Diseases and Nutritional Disorders. IAEA, Wien: 79-96

SMITH, R. und McALLAN, A. (1974)

Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. British Journal of Nutrition 31: 27-34.

STEWART, C.S. (1991)

The rumen bacteria. In JOUANY, J.-P. (ed.): Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. Paris, INRA Editions: 15-26

STEWART, C.S. und BRYANT, M.P. (1988)

The rumen bacteria. In HOBSON, P.N. (ed.): The rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Science; London, New York: 21-75

STORM, E. und ØRSKOV, E.R. (1983)

The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. British Journal of Nutrition 50: 463-470.

SUTHERLAND, I.W. und WILKINSON, J.F. (1971)

IV. Chemical extraction methods for microbial cells. VII. Nucleic acids. Methods in microbiology 5B: 371-373

TEATHER, R. und SAUER, F. (1988)

A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *Journal of Dairy Science* 71: 666-673

THOMPSON, K. J. and HOBSON, P. N. (1971)

Polysaccharide synthesis and degradation by rumen micro-organisms *in vitro*. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 76: 423-432

TILLEY, J. und TERRY, R. (1963)

A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104-111

VAN NEVEL, C.J. und DEMEYER, D.I. (1977)

Determination of rumen microbial growth *in vitro* from ^{32}P -labelled phosphate incorporation. *British Journal of Nutrition* 38: 101-114.

VAN SOEST, P.J. (1994)

Nutritional ecology of the ruminant - 2nd ed. Ithaca, Cornell University Press: 476 Seiten

VOLDEN, H. und HARSTAD, O.M. (1998)

Chemical composition of bacteria harvested from the rumen of dairy cows fed three diets differing in protein content and rumen protein degradability at two levels of intake. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science* 48: 202-209

VOLDEN, H.; HARSTAD, O.M. und MYDLAND, L.T. (1999)

Amino acid content and profile of protozoal and bacterial fractions isolated from ruminal contents of lactating dairy cows fed diets differing in nitrogen supplementation. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science* 49: 245-250

YOKOYAMA, M.T. und JOHNSON, K.A. (1988)

Microbiology of the rumen and intestine. In CHURCH, D.C. (edt.): The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey: 125-144

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ernst Pfeffer, für seine jeder Zeit gewährte wissenschaftliche und moralische Unterstützung.

Prof. Dr. Karl Schellander möchte ich herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Saskia Plos, ohne deren Hilfe und Engagement die kniffligen Laborarbeiten nicht denkbar gewesen wären, und Dr. Michael Hovenjürgen, der maßgeblich am ersten Teil der Experimente durch Ideen und technische Unterstützung beteiligt war. Dr. Fidelis Fru danke ich für die Unterstützung in der Endphase, Prof. Dr. Karl-Heinz Südekum für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern des Instituts sei gedankt, namentlich Walter Diefenthal und Viktor Braun für die Arbeiten im Stall sowie Nadja Wahl, Petra Jaquemin und Evelyne Oettershagen für die vielen Analysen im Labor. Bei Lisa Wirtz und Claudia Weinkauff bedanke ich mich für ihre stets zuverlässige Mithilfe bei den RUSITEC-Versuchen.

Meinen Mitdoktoranden Antje, Ariane, Elly, Feyza, Fidel, Frank, Jürgen, May, Saskia, Sven und Uschi verdanke ich viele lustige und konstruktive Arbeitsstunden am Institut.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern und Schwiegereltern, die mir mit ihrer steten und selbstlosen Hilfe während der ganzen Zeit zur Seite standen.

Von Herzen möchte ich mich bei meinem Mann Tobias bedanken, der mich immer mit Rat und Tat unterstützte und jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte.