

ANNA ANTONIEWICZ, PAWEŁ PISULEWSKI

Instytut Zootechniki w Krakowie

WSKAŹNIKI STOSOWANE PRZY BADANIU PROCESÓW TRAWIENNYCH U PRZEŻUWACZY

Przeżuwacze mają poważne znaczenie gospodarcze, gdyż dzięki charakterystycznej budowie przewodu pokarmowego i współdziałaniu mikroorganizmów zwacza wykorzystywać mogą pasze o dużej zawartości celulozy oraz produkty o małej wartości w żywieniu ludzi i zwierząt nieprzeżuwających. Na coraz szerszą skalę prowadzone są badania nad przebiegiem procesów trawiennych i wykorzystaniem białka oraz innych składników pokarmowych, w celu uzyskania maksymalnej produktywności. Skomplikowana budowa przewodu pokarmowego przeżuwacza, różnorodność procesów zachodzących w żwaczu oraz duże zmiany jakościowe jakim podlega pobrana pasza, stanowią trudności badań nad trawieniem i wykorzystaniem paszy u tych zwierząt. Pomocne jest stosowanie substancji wskaźnikowych, których obecność ułatwia śledzenie przebiegu procesów fizjologicznych w przewodzie pokarmowym przeżuwacza.

Idea stosowania wskaźników w badaniach żywieniowych u przeżuwaczy nie jest nowa. W okresie ostatnich 50 lat przeprowadzono liczne badania nad zastosowaniem różnych substancji [32, 52, 54]. Jednak tylko niektóre z nich stosowane są obecnie i te właśnie wskaźniki zostaną omówione w opracowaniu, w oparciu przede wszystkim o prace metodyczne dotyczące zastosowania wskaźników do oznaczania: czasu przepływu treści pokarmowej przez poszczególne części przewodu pokarmowego, trawienia i wchłaniania składników pokarmowych w wielokomorowym żołądku i jelicie cienkim, objętości treści pokarmowej oraz dobowego przepływu treści, a także do konstrukcji modeli obrazujących procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym. Obszerny przegląd zastosowania wskaźników do oznaczania strawności pasz przedstawiła Ziolecka [87].

Stosowane wskaźniki i ich podział

Substancja użyta jako wskaźnik spełniać powinna 4 podstawowe warunki:

- a) nie ulegać absorpcji z przewodu pokarmowego ani rozkładowi w procesie trawienia,
- b) być obojętna fizycznie, chemicznie i fizjologicznie (nie wykazywać działania toksycznego, nie wpływać na aktywność wydzielania, ruchy żwacza i perystaltykę jelit oraz procesy absorpcji, nie wpływać na aktywność fermentacyjną żwacza),
- c) być fizycznie podobną do składników treści przewodu pokarmowego lub łatwo się z nimi mieszać,
- d) dać się swoiście i dokładnie oznaczać w treści pokarmowej i obecność wskaźnika nie może wpływać na wyniki analizy innych składników treści.

Treść pokarmowa jest zawiesiną cząstek stałych w płynie, dlatego dla obu tych faz stosowane są odpowiednie substancje wskaźnikowe, spełniające w mniejszym lub większym zakresie warunki fizycznego podobieństwa do składników treści.

Jest to szczególnie istotne przy wskaźnikach frakcji cząstek stałych. Badania Hoelzela [45] wykazały, że szybkość przechodzenia cząstek stałych przez przewód pokarmowy jest odwrotnie proporcjonalna do ich ciężaru właściwego, przy czym cząstki cięższe są zatrzymywane dłużej w końcowych odcinkach przewodu pokarmowego. Na szybkość przepływu treści ma wpływ także wielkość cząstek. Balch [3] stosując dodatek do dawki 5% siana barwionego barwnikami organicznymi stwierdził, że cząstki drobno zmielone wydalane były w kale szybciej niż sieczka. Podobnie Ellis [26], King i Moore [51] oraz Campling i Freer [11] stwierdzili, że ciężar właściwy cząstek paszy ($1-1,4 \text{ g/cm}^3$) ma istotny wpływ na szybkość ich przejścia przez przewód pokarmowy.

Rozpuszczalne wskaźniki fazy płynnej. Należą do nich: glikol polietylenowy, zastosowany po raz pierwszy przez Hydéna [48] w latach 50-tych oraz kompleksy metali ciężkich z kwasem etylenodwuaminoczteroocowym: Cr-EDTA [8, 21] wprowadzony w latach 60-tych oraz Co-EDTA zaproponowany przez Udena i wsp. [77] w 1978 roku.

Nierozpuszczalne wskaźniki frakcji cząstek stałych. Do tej grupy wskaźników należą substancje będące integralnymi składnikami dawki pokarmowej (wskaźniki naturalne — A) oraz związki chemiczne dodawane do dawki pokarmowej lub wprowadzone do żwacza podobnie jak wskaźniki rozpuszczalne (wskaźniki chemiczne — B).

Do grupy A należy m. in. lignina, stosowana od lat 40-tych [87], do grupy B — tlenek chromowy Cr_2O_3 oraz metale ziem rzadkich i chrom, związane kompleksowo z materiałem roślinnym wprowadzone w latach 60-tych [18].

Rozpuszczalne wskaźniki fazy płynnej

Glikol polietylenowy. (PEG) powstaje przez polimeryzację glikolu etylenowego dając produkty o różnym ciężarze cząsteczkowym i zależnym od tego stanie skupienia (100—600 ciecz, 1000—10000 ciała stałe o rosnącej twardości). Jako wskaźnik najczęściej stosowana jest frakcja o ciężarze cząsteczkowym 3000—5000, bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie, lecz — jak wykazały badania z użyciem ^3H -PEG — nie ulegająca rozkładowi i absorpcji w przewodzie pokarmowym [74].

PEG oznaczać można turbidymetrycznie [48], przy czym wprowadzane modyfikacje [13, 68, 78] miały na celu zwiększenie swoistości i selektywności wytrącania kolejno białka i PEG z roztworu.

PEG nie wykazuje właściwości toksycznych w zakresie stosowanych stężeń [52] i nie wywiera wpływu na szybkość przepływu treści pokarmowej w jelitach [69].

Kompleks chromu z kwasem etylenodwuamino-czterooctowym (Cr-EDTA). Cr-EDTA powstaje przy ogrzewaniu roztworu CrCl_3 z Na_2EDTA . Nadmiar użytych odczynników można usunąć w reakcji z CaCl_2 (EDTA) [8] lub z NH_4OH (CrCl_3) [21]. Stabilność kompleksu zapewnia alkalizacja po reakcji kompleksowania, do uzyskania pH 6—7. Zastosowanie w tym celu NH_4OH prowadzi do uzyskania preparatu Cr-EDTA ze znaczną zawartością NH_4Cl . Metoda ta może być stosowana tylko przy radioaktywnym ^{51}Cr -EDTA, który podaje się zwierzęciu w niewielkich ilościach. Stosując większe stężenia wskaźnika zawierającego stały izotop Cr wprowadza się do przewodu pokarmowego znaczne ilości jonów amonowych [54], co uniemożliwia badanie przemiany azotowej. Dlatego właściwsza wydaje się metoda Binnertsa i in. [8], w której stosuje się alkalizację przy użyciu NaOH .

Stabilny chrom z Cr-EDTA oznaczać można kolorymetrycznie [28] lub wybiórczo za pomocą spektrofotometrii absorpcji atomowej [86].

Stabilny lub ^{51}Cr -EDTA nie ulega rozkładowi pod wpływem aktywności fermentacyjnej mikroorganizmów zwacza, nie pojawia się we krwi, w żyle wątrobowej ani w żółci [46]. Z przewodu pokarmowego jest absorbowany w 3—5%, z czego większość wydalana jest z moczem [46, 81, 85].

Kompleks kobaltu z kwasem etylenodwuamino-czterooctowym (Co-EDTA). Co-EDTA otrzymać można z dobrą

wydajnością z następujących substratów: octanu kobaltu [II], kwasu wersenowego i LiOH, stosując H_2O_2 jako utleniacza [77]. Jako wskaźnik zachowuje się analogicznie do Cr-EDTA, 2—3% dawki ulega absorpcji z przewodu pokarmowego u owiec i bydła i jest wydalane z moczem. Może być oznaczony wybiórczo za pomocą spektrofotometrii absorpcji atomowej.

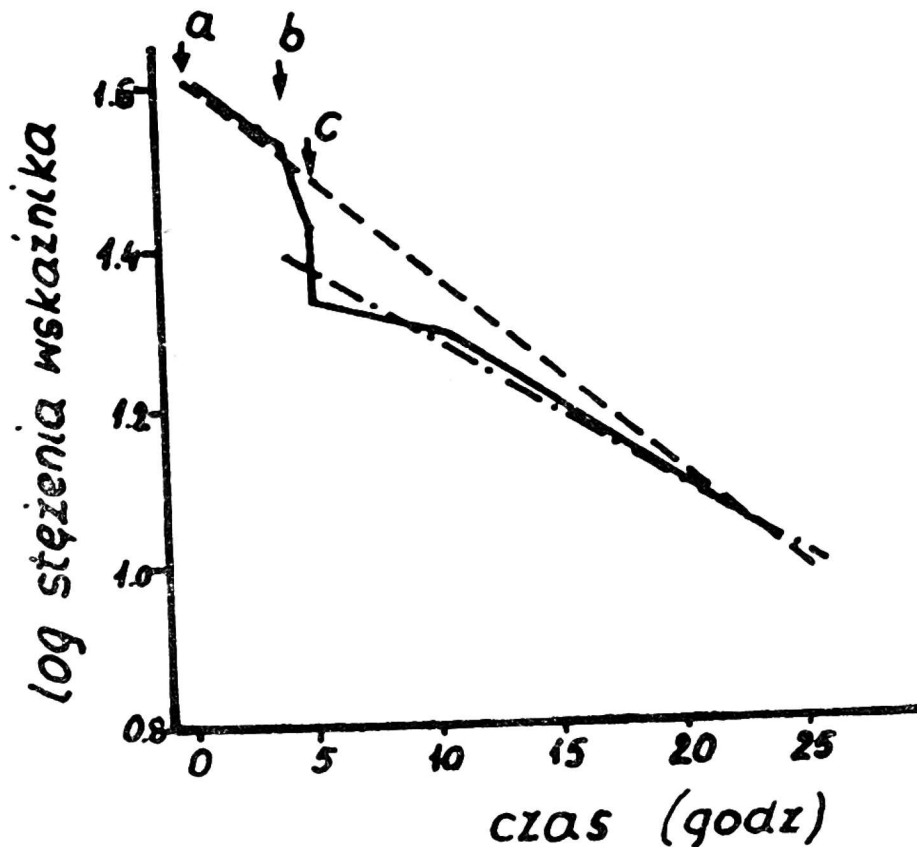
Wskaźniki rozpuszczalne są przydatne do oznaczania objętości płynu w żwaczu oraz szybkości przepływu płynu i wypadkowych zmian stężenia rozpuszczalnych składników treści (np. drobnocząsteczkowych produktów trawienia).

Hydén [49] sformułował równania pozwalające na określenie szybkości wpływu treści pokarmowej i czasu retencji w żwaczu i w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Są one prawdziwe przy założeniu stanu równowagi dynamicznej w żwaczu.

Objętość płynu żwaczowego wyznacza się przez wprowadzenie dawki wskaźnika do żwacza i oznaczenie jego zmniejszającego się stężenia w określonych odstępach czasu. Stężenie wskaźnika po upływie czasu t od jego podania (c_t) związane jest ze stężeniem początkowym c_0 następującym równaniem:

$$c_t = c_0 \cdot e^{-kt}$$

gdzie k — stopień rozcieńczenia płynu żwaczowego. Doświadczalnie wyznaczyć można c_t i k , natomiast c_0 graficznie, wykreślając zależność $\lg c_t$ od czasu po podaniu wskaźnika (jest to funkcja liniowa). Objętość V oblicza się dzieląc dawkę wskaźnika wprowadzoną do żwacza przez stężenie początkowe c_0 . Ekstrapolacja oznaczonych stężeń wskaźnika do stężenia c_0 (czas 0) na podstawie kąta nachylenia krzywej zaniku prowadzi może do znacznych błędów, jeśli w czasie pomiędzy podaniem wskaźnika a pierwszym pobraniem próbki (zalecany jest co najmniej odstęp 1,5 godziny, niezbędny dla wyrównania stężenia wskaźnika w całej objętości płynu żwaczowego) mają miejsce znaczne zmiany objętości płynu (np. spowodowane odpasem i pojeniem). Badania Warnera i Stacy [84] wykazały, że bezpośrednio po pobraniu paszy i pojeniu objętość płynu żwaczowego znacznie się zwiększa, co powoduje gwałtowne zmniejszenie stężenia wskaźnika. Około 1—2 godzin po odpasie rozpoczyna się 7-godzinny okres, w którym zmiany objętości żwacza i zmniejszenie stężenia wskaźnika zachodzą bardzo powoli (rys. 1). Dopiero po tym okresie kąt nachylenia krzywej zwiększa się i w około 15 godzin po odpasie osiąga wartość sprzed odpasu. W badaniach Antoniewicz i Pisulewski [2] wykazano, że efekt ten zależy od fizycznej formy paszy i zaznacza się bardziej w przypadku rozdrobnionych pasz treściwych niż przy paszach objętościowych skarmianych w formie sietki.



Rys. 1. Wyznaczanie stężenia wskaźnika w żwaczu bezpośrednio po podaniu wskaźnika (w czasie 0) na podstawie krzywej zaniku wskaźnika. Strzałki wskazują: a — czas podania wskaźnika, b — czas odpasu, c — czas pojenia.

- doświadczalnie wyznaczone stężenie wskaźnika w żwaczu w okresie 24 godzin po podaniu,
- - - - - linia dopasowana do wyników w hipotetycznym układzie, w którym wskaźnik podano bezpośrednio przed odpasem i pojeniem a stężenie w żwaczu wyznaczano po odpasie i pojeniu,
- . - . - linia obrazująca średnią szybkość zaniku wskaźnika w żwaczu w okresie 24 godzin po podaniu.

(Warner i Stacy, 84).

W zależności od tego jakie parametry ma się wyznaczać za pomocą wskaźnika może on być podany dożwaczowo w dawce jednorazowej lub w infuzji ciągłej. W tym ostatnim przypadku najpierw wprowadza się dawkę wstępną, w celu uzyskania określonego stężenia, po czym następuje infuzja roztworu o znanym stężeniu, ze stałą szybkością. Warner i Stacy [84] podali podstawy matematyczne wyznaczania parametrów dynamiki fazy płynnej treści żwacza dla obu technik wprowadzania wskaźnika. Zdefiniowali oraz określili sposób wyliczenia następujących wielkości: dopływ wody do żwacza (F), wypływ wody ze żwacza do ksiąg (E), objętość płynu w żwaczu (V), szybkość rozcieńczenia czyli względny dopływ wody netto ($D = \frac{F}{V}$), czas połowicznego zaniku wskaźnika ze

żwacza ($t_{1/2}$) oraz średni czas retencji wskaźnika w żwaczu (Θ). Wzory podane przez tych autorów mogą być stosowane pod warunkiem, że rozpatruje się krótkie przedziały czasu, co pozwala na operowanie wartościami średnimi wielkości ulegających zmianie (np. średnie stężenie wskaźnika podczas pobierania paszy lub pojenia). D i V wyznacza się zawsze z zaniku dawki wskaźnika, natomiast metoda infuzji ciągłej jest szczególnie przydatna do wyznaczania E i F , nie tylko w żwaczu, lecz także w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Podawanie wskaźnika w infuzji ciągłej, co utrzymuje jego stężenie w treści przewodu pokarmowego na względnie stałym poziomie, stosuje się przy oznaczaniu wchłaniania produktów rozkładu trawienego w jelicie cienkim. W tym celu porównuje się stężenie wybranego składnika (np. poszczególnych aminokwasów) ze stężeniem wskaźnika w średniej próbce treści pokarmowej otrzymanej z początkowego odcinka dwunastnicy oraz końcowego odcinka jelita biodrowego [25, 54, 59, 63, 70].

Badania prowadzone na bydle, owcach i kozach żywionych dawkami o zróżnicowanym udziale pasz treściwych i objętościowych wykazały, że oznaczenia objętości płynu żwacza za pomocą PEG i Cr-EDTA dają wyniki zgodne (w granicach $\pm 5\%$) z uzyskanymi przy bezpośrednim pomiarze [4, 24, 76, 79]. Źródłem błędu może być nierównomierne rozprzestrzenienie wskaźnika w zawieszynie cząstek paszy [1, 14, 37] lub absorpcja na cząstkach stałych w treści pokarmowej [12, 17, 37, 83].

Dotychczasowe obserwacje świadczą jednak, że przy PEG proces ten zachodzi w niewielkim nasileniu dla pasz objętościowych [2, 17], a wyraźnie zaznaczył się jedynie przy skarmianiu wysłodków buraczanych [17]. Następstwem dużej adsorpcji wskaźnika są bardzo zawyżone wyniki objętości i szybkości rozcieńczenia płynu żwaczowego [19].

PEG dodawany do dawki pokarmowej może być użyty do oznaczania szybkości przepływu fazy płynnej treści w dwunastnicy, gdyż pojawia się tam równomiernie, a dobowe odzyskanie wynosi 78—104%. Poprawę precyzji oznaczeń przy stosowaniu zwierząt wyposażonych w przetoki proste uzyskać można przez zwiększenie częstotliwości i przedłużenie okresów pobierania próbek (więcej niż 6 razy/dobę) w czasie 120 godzin [82]).

Wadą PEG jest nieswoista metoda oznaczania, powodująca użycie tego wskaźnika w stosunkowo dużym stężeniu takim, które może wpływać na wartości oznaczeń innych składników treści. Na przykład Nicholson i Sutton [63] przy badaniu strawności na odcinku jelita cienkiego stwierdzili, że PEG podawany w infuzji ciągłej w ilości 30 mg/ml stanowił znaczną część suchej masy i wpływał na oznaczenia wartości kalorycznej treści pokarmowej. Problemu tego można uniknąć stosując ^3H -PEG, który ze względu na czułość i selektywność metody oznacza-

nia może być użyty w znacznie mniejszych ilościach [62], lecz z wyższym kosztem. Wady tej nie posiada Cr-EDTA, który przy tym, ze względu na mniejszą masę cząsteczkową, łatwiej dyfunduje i rozprzestrzenia się w fazie płynnej treści żwacza [37, 81]. Może być jednak bardziej podatny na adsorpcję na cząstkach paszy [83]. Wielkość procesu adsorpcji zależy od wielu czynników fizyko-chemicznych, a w żwaczu ponadto od aktywnego działania mikroorganizmów, dlatego jest bardzo trudna do oszacowania ilościowego. Niemniej jednak np. Grovum i Williams [38] uważają, że adsorpcja ^{51}Cr -EDTA na częściach stałych treści może być przyczyną rozbieżności w oznaczonych wartościach przepływu wody w jelicie biodrowym skopów żywionych dawkami siana z lucerny. W doświadczeniu tym jednak autorom nie udało się wykazać, że proces adsorpcji faktycznie zachodzi. Według Warnera i Stacy [84] można uniknąć błędu związanego z adsorpcją wskaźnika na częściach stałych przy wyznaczaniu objętości płynu żwacza, wyliczając tę ostatnią z ekstrapolacji do zerowego stężenia wskaźnika.

Wyniki Van't Kloostera i Rogersa [81] wskazują, że nawet przy znacznych odstępstwach od stanu równowagi dynamicznej w żwaczu, jak przy normalnej praktyce żywienia 2 razy dziennie, metoda wskaźnikowa prowadzi do prawidłowych wyników oznaczeń objętości płynu żwaczowego. Większy błąd może być popełniony przy oznaczaniu średniego przepływu płynu, zwłaszcza jeśli ekstrapoluje się wyniki ze stosunkowo krótkiego okresu pomiarowego. Wykreślenie krzywych zaniku dla okresu 2 lub 3 dni od podania wskaźnika pozwala na wyeliminowanie fluktuacji stężenia związanych z pobraniem wody lub zwiększonym wydzielaniem śliny w czasie po odpasie.

Jak wynika z powyższego omówienia, wskaźniki rozpuszczalne mogą być użyte do oznaczeń bilansu i przepływu wody w przewodzie pokarmowym oraz dynamiki fazy płynnej w „zbiorniku do fermentacji ciągłej” jakim jest czepco-żwacz. Cr-EDTA, zarówno stabilny jak i radioaktywny jest łatwiejszy do oznaczania chemicznego, co daje temu wskaźnikowi przewagę nad PEG. Dalszych badań wymaga proces adsorpcji Cr-EDTA na cząstkach paszy. Zależy on od rodzaju dawki pokarmowej i zwłaszcza w przypadku stosowania ^{51}Cr -EDTA w małym stężeniu prowadzić może do istotnych błędów. Na uwagę zasługuje Co-EDTA, który nadaje się do zastosowania równocześnie ze związkami chromu użytymi jako wskaźnik frakcji cząstek stałych.

Nierozpuszczalne wskaźniki frakcji cząstek stałych

Wskaźniki naturalne. Lignina zawarta w składnikach dawki pokarmowej spełnia idealnie warunki: drugi i trzeci, ustalone dla wskaź-

ników i często była stosowana przy ocenie zarówno pobrania paszy jak i strawności składników pokarmowych [23, 87] oraz przepływu treści pokarmowej w jelicie cienkim [66, 73]. Erickson i in. [30] porównując przydatność jako wskaźnik frakcji ligniny (ADL) i Cr_2O_3 stwierdzili, że współczynniki strawności pozornej dla siana z lucerny i traw oraz ziarna jęczmienia i owsa u owiec, oznaczone za pomocą tych wskaźników były bardzo zbliżone. ADL okazała się lepsza jako wskaźnik niż Cr_2O_3 przy określeniu rozmiarów trawienia w żwaczu, ze względu na szybkość wpływu ze żwacza, podobną do składników paszy. Podobny wynik uzyskali Drennon i in. [22]. Kropp i in. [53] stwierdzili, że przy oznaczaniu przepływu treści przez trawieniec i strawności suchej masy w żwaczu wolców lignina w paszy daje bardziej wiarygodne wyniki niż Cr_2O_3 dodany do dawki pokarmowej w ilości 0,5%.

Obecnie lignina stosowana jest niezbyt często jako wskaźnik, gdyż w pewnym rozmiarze ulega trawieniu w przewodzie pokarmowym [66], ma zmienną budowę chemiczną [29], a metody jej oznaczania mają charakter doświadczalny (brak zdefiniowanego chemicznie wzorca) [80].

W s k a ź n i k i c h e m i c z n e

Trójtlenek chromu Cr_2O_3 jest jednym z najbardziej obojętnych związków chemicznych, nierozpuszczalnym i nieaktywnym w warunkach fizyko-chemicznych przewodu pokarmowego. Nie ulega absorpcji z przewodu pokarmowego. Donaldson i Barreas [20] stwierdzili, że nawet z rozpuszczalnego połączenia, jakim jest chlorek chromowy CrCl_3 , chrom trójwartościowy absorbowany był w ilości mniejszej niż 1% dawki, natomiast chromian ulegał absorpcji w 10—40%. Z tego względu handlowe preparaty Cr_2O_3 , które zawierają zwykle dwuchromian powinny być oczyszczone przed zastosowaniem do oznaczeń.

Cr_2O_3 nie wykazuje działania toksycznego, nie wpływa ubocznie na przebieg trawienia. Może być oznaczany swoiście metodą kolorymetryczną po utlenieniu do chromianu [44] lub za pomocą spektrofotometrii absorpcji atomowej [86]. Cr_2O_3 spełnia więc dobrze warunki: pierwszy, drugi i czwarty, określone dla idealnego wskaźnika. Nie spełnia całkowicie warunku trzeciego, ze względu na właściwości fizyczne, a zwłaszcza duży ciężar właściwy 5,6 g/cm³ [36].

Poprawność wyników oznaczeń przy użyciu Cr_2O_3 zależy od stopnia odzyskania i równomierności przechodzenia wskaźnika przez przewód pokarmowy. Istotny wpływ na to ma sposób podania Cr_2O_3 zwierzęciu, forma fizyczna preparatu oraz częstotliwość i pora podania. Cr_2O_3 może być dodany do paszy jako proszek, może zostać wprowadzony do żwacza w kapsułkach żelatynowych zawierających proszek Cr_2O_3 albo jego za-

wiesinę w tłuszczu [50], może być podany w paszy lub do żwacza po spreparowaniu z bibułą filtracyjną (Cr_2O_3 równomiernie rozmieszany z masą celulozową przed prasowaniem arkuszy [15]). Ten ostatni sposób wydaje się najstosowniejszy. Cr_2O_3 podany w formie proszku może ulegać zlepieniu w większe cząstki lub przywierać do ścian żwacza i dlatego nie miesza się równomiernie z treścią pokarmową [15]. Poza tym wielkość cząstek proszku Cr_2O_3 jest mniejsza od wielkości cząstek paszy co, jak podano wyżej, powoduje jego szybszy wpływ ze żwacza niż np. cząstek siana [36]. Przy stosowaniu kapsułek żelatynowych zachodzi obawa, że gdy treść żwacza jest gęsta (np. przy skarmianiu dużych ilości pasz objętościowych) to rozpuszczenie kapsułki i mieszanie oraz równomierne rozprowadzenie Cr_2O_3 w żwaczu może być utrudnione [50]. Niewątpliwe zalety posiada Cr_2O_3 spreparowany z bibułą filtracyjną ($\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$). Wskaźnik jest uwalniany w żwaczu powoli, w miarę trawienia bibuły przez mikroorganizmy (rozkład celulozowy), co zapewnia równomierne wymieszanie i wypływ Cr_2O_3 z szybkością zbliżoną do wypływu innych składników stałych treści.

$\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ powinien być podawany w formie rozdrobnionej, jako wąskie paski lub ścinki. Corbet i in. [15], przy podawaniu owcom 1 g $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ raz dziennie, w 3 godziny po odpasie stwierdzili, że rozdrobnienie preparatu wskaźnika powoduje jego równomierniejsze pojawienie się w kale w ciągu doby. Zaobserwowali 2 maksima wydalania wskaźnika — przypadające czasowo mniej więcej na odpas poranny i wieczorny. Średnie odzyskanie rozdrobnionego $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ w kale w kolejnych 3-dniowych okresach wynosiło 95,6—100,1%, z wahaniami od 82—111%. Do pełnego odzyskania Cr_2O_3 w kale konieczny jest kilkudniowy okres wstępny podawania wskaźnika.

Cr_2O_3 uwalniany jest z $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ powoli, jednak wartości dobowych odzysków nie wskazują na zaleganie $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ w żwaczu i łączenie się dawek z kolejnych dni. Corbett i in. [13] stwierdzili, że kapsułka papierowa z $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ rozplywa się w żwaczu kompletnie przed upływem 29 godzin po podaniu.

Badania McRae i Armstronga [55] miały na celu ustalenie warunków zastosowania wskaźnika Cr_2O_3 do oznaczania strawności i dobowego przepływu treści pokarmowej w określonych odcinkach jelita cienkiego owiec. $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{-P}$ w ilości 3 g podawano do żwacza przez przetokę, dwa razy dziennie w porze odpasu. Średni dobowy odzysk Cr_2O_3 w kale w okresie 7 dni wynosił ok. 100% zarówno dla dawek treściwych jak i objętościowych. Wahania dobowe były mniejsze przy skarmianiu pasz objętościowych niż przy paszach treściwych. Odzysk dobowy Cr_2O_3 w treści dwunastnicy wynosił średnio z 17 kolekcji 83,7%, natomiast

w treści jelita biodrowego średnio z 11 kolekcji 77,3%. Zawartość Cr_2O_3 w suchej masie treści pokarmowej, w kolejnych okresach 1,5-godzinnych pobierania treści z dwunastnicy i 3-godzinnych z jelita biodrowego, zmieniała się odpowiednio w zakresie 83—135% oraz 46—128% w stosunku do zawartości w średniej próbie dobowej. Zakres zmian był większy przy dawkach zawierających jęczmień, niż przy żywieniu sianem. Wahania w jelicie biodrowym były większe niż w dwunastnicy, pomimo 2 razy dłuższych okresów zbierania treści (wolny wpływ treści w tym odcinku jelita cienkiego). Przepływ Cr_2O_3 wykazywał duże wahania w kolejnych 1,5- lub 3-godzinnych okresach czasu, wynoszące od 1 do 38% łącznego przepływu dobowego. Natomiast średni przepływ Cr_2O_3 w okresie doby, wyznaczony z sumowania 16 kolejnych pobrań z dwunastnicy lub 8 z jelita biodrowego różnił się w zakresie $\pm 5\%$ od przepływu oznaczonego na podstawie pełnej dobowej kolekcji treści.

Podobne wahania w przepływie Cr_2O_3 obserwowali u owiec Van't Klooster i in. [82]. Nie miały one jednak wpływu na wartości średnie odzysku Cr_2O_3 w dwunastnicy w okresach 3 i 5 dni (99%, przy wahaniamiach dobowych od 86 do 101%).

Pierwiastki ziem rzadkich: cer, dysproz, europ, lantan, ruten i samar. Metale ziem rzadkich mogą być wykorzystane jako wskaźniki [26]. Wykazują zdolności szybkiej i trwałej adsorpcji na materiale roślinnym [42, 60, 61], nie ulegają wchłanianiu z przewodu pokarmowego ssaków [35, 41] ani wiązaniu do ścian przewodu pokarmowego *in vivo* [72]. Metale związane z materiałem roślinnym przechodzą przez przewód pokarmowy w ścisłym powiązaniu z cząstkami paszy i dzięki temu są doskonałymi wskaźnikami frakcji stałej treści pokarmowej. Metale ziem rzadkich w postaci soli adsorbowane są zarówno przez pasze objętościowe, jak i ziarna zbóż [42].

W początkowym okresie badań nad zastosowaniem tych pierwiastków jako wskaźników (w latach 60-tych) uważano, że przechodzenie *in vivo* metalu z paszy znakowanej na inne cząstki stałe treści zwacza nie ma istotnego znaczenia [26]. W okresie ostatnich kilku lat, przy coraz szerszym stosowaniu tych pierwiastków do opisu zachowania się poszczególnych frakcji stałych treści pokarmowej (składniki dawki pokarmowej i mikroorganizmy) problem przechodzenia znacznika jest często rozpatrywany [34, 42]. Dysocjacja metali i ich ewentualne wtórne dołączanie się do nieznakowanych cząstek paszy lub mikroorganizmów zależy od strawności cząstek znakowanych i jest większe dla pasz treściwych niż objętościowych. Wg Hartnella i Sattera [42] przy inkubacji przez 24 godziny z treścią zwacza *in vitro* oddzielało się średnio 7,4% ilości Sm, Ce lub La zaadsorbowanych na ziarnie, a tylko 0,8% ilości związanych z cząstkami siana. *In vivo*, od 4,4 do 10% ilości związanych metali prze-

chodziło z siana znakowanego do nieznakowanego, w miarę zwiększania czasu inkubacji od 4 do 24 godzin. Podatność materiału roślinnego ze związanymi metalami na trawienie w przewodzie pokarmowym zależy także od warunków środowiska przy procesie wiązania metali i nadmierne obniżenie pH (poniżej 1) zwiększa strawność paszy i dysocjację metalu [60].

Proces adsorpcji zachodzi przy bardzo małych stężeniach metali ziem rzadkich (10^{-11} — 10^{-7} M), przy których wykazują one właściwości koloidalne [67]. Stężenia te są mniejsze od dolnej granicy wykrywalności metodami chemicznymi, co nastęrcza znaczne trudności analityczne. Można stosować izotopy radioaktywne, które oznacza się ilościowo za pomocą liczników promieniowania, lecz mają one niekiedy długi okres półtrwania i podczas pracy ze zwierzętami stwarzają problemy związane z zagrożeniem promieniowania przy zbieraniu i przy przechowywaniu odchodów. Do oznaczania izotopów trwałych nadaje się analiza aktywacyjna [26] oraz fluorescencja rentgenowska [31]. W przypadku stosowania analizy aktywacyjnej dobierać należy pierwiastki o względnie dużym przekroju jądrowym, aby przy oznaczaniu uzyskać z odpowiednią wydajnością produkty o dużej aktywności [26].

Fakt, że metale ziem rzadkich stosuje się w bardzo małym stężeniu jest korzystny z punktu widzenia fizjologii przeżuwacza, gdyż substancje te są toksyczne dla mikroorganizmów i częściowo hamują ich wzrost już przy stężeniach rzędu 5 $\mu\text{g/ml}$ [52].

Tan i in. [71] zaproponowali użycie jako wskaźnik kompleksu rutenu (^{103}Ru) z fenantroliną (Ru-F). Związek ten nie jest wchłaniany z przewodu pokarmowego (odzyskanie w kale w 97,4%), wiąże się z frakcją upostaciowaną w zakresie 70—97% i nie oddziałuje na mikroorganizmy przy stężeniu $1,5 \times 10^{-5}$ M. Powyżej $2,2 \times 10^{-5}$ M powoduje zmniejszenie strawności suchej masy *in vitro*, co ogranicza jego górne stężenie przy podawaniu owcom do około 12 mg Ru na 1 kg pobranej suchej masy [5]. ^{103}Ru ma krótszy okres półtrawienia (40 dni) niż ^{144}Ce (285 dni), co zmniejsza ryzyko napromieniowania personelu przy przechowywaniu materiału do oznaczeń. Charakter promieniowania gamma wydzielanego przez ^{103}Ru pozwala na jego jednoczesne oznaczanie z ^{51}Cr , co ma szczególne znaczenie przy równoczesnym stosowaniu tych dwóch wskaźników.

Wskaźniki frakcji stałej treści pokarmowej zastosować można przy badaniu zarówno kinetyki, czyli czasu retencji, szybkości przepływu, czasu pełnej odnowy [38, 39, 40, 43] jak i zmian ilościowych składników tej frakcji [5, 6, 55, 56]. Wskaźniki są niezbędne zwłaszcza przy pracy ze zwierzętami wyposażonymi w przetoki proste, kiedy to niewielkie kolejne próbki treści pokarmowej pobrane według określonego sche-

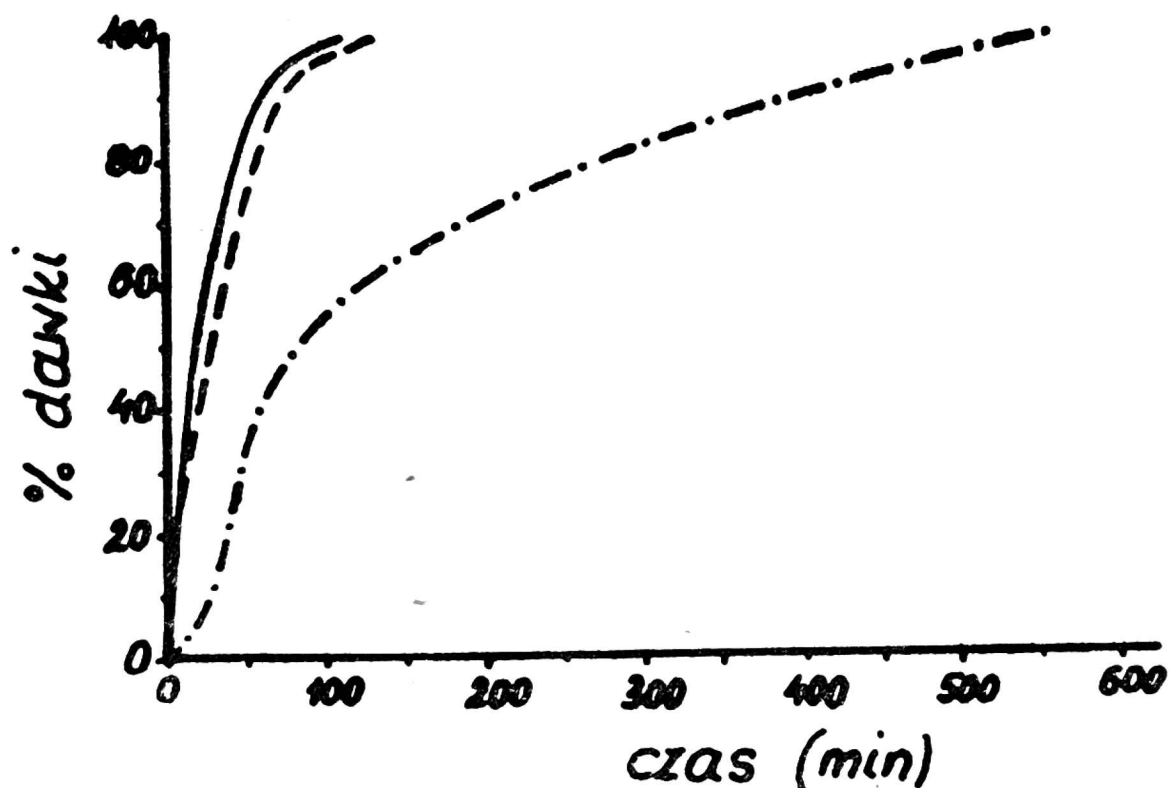
matu łączy się w średnią próbę treści płynącej przez wybrany odcinek przewodu pokarmowego w danym przedziale czasu t . Dobowy przepływ dowolnego składnika pokarmowego A wyliczyć można wg wzoru [55]:

$$\text{Całkowity dobowy przepływ składnika } A = \frac{\text{przepływ składnika } A \text{ w czasie } t \text{ (g)} \times \text{Dobowa dawka wskaźnika (g/24 godz.)}}{\text{Ilość wskaźnika w treści pobranej w czasie } t \text{ (g)}}$$

Wzór ten prowadzić może do prawidłowych wyników jedynie w przypadkach, gdy: pobrana w czasie t średnia próba treści jest reprezentatywna dla treści płynącej w tym czasie oraz w okresie doby przez dany odcinek przewodu pokarmowego, stężenie wskaźnika w treści jest względnie stałe, szybkość jego przepływu jest zgodna z przepływem badanego składnika i odzyskanie wskaźnika wynosi 100%. Warunki te są praktycznie trudne do spełnienia przy Cr_2O_3 i publikowano sprzeczne opinie na ten temat. Obserwowano np. duże wahania przepływu Cr_2O_3 w jelicie cienkim w okresie doby [55, 82] i niską korelację pomiędzy zawartością Cr_2O_3 i suchej masy w treści dwunastnicy [82]. Jednak Corse i Sutton [16] oraz McRae i in. [58] stwierdzili, że przepływ składników wyliczony przy użyciu Cr_2O_3 jest zgodny z oznaczonym w pełnej kolekcji, podczas gdy Faichney [32] podał, że wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu tego wskaźnika są zaniżone a błąd zwiększa się przy zmniejszeniu szybkości przepływu treści. Zadowalające wyniki uzyskać można przy zastosowaniu pierwiastków ziem rzadkich [5, 33, 54, 57] lub ligniny [53].

Zarówno Cr_2O_3 -P jak i metale ziem rzadkich stosować można do korygowania dobowego przepływu treści przy prowadzeniu kolekcji u zwierząt wyposażonych w przetoki mostkowe. Wahania przepływu treści następują jako reakcja na stress związany z prowadzeniem kolekcji [64], a także na zmiany w ciśnieniu treści na ścianki jelita [65]. Oznaczenie odzysku wskaźnika w danym odcinku przewodu pokarmowego pozwala na wprowadzenie odpowiednich poprawek [10, 58, 75].

Różnice w zachowaniu się Cr_2O_3 i pierwiastków ziem rzadkich przy wyznaczaniu czasu ich retencji w żwaczu obrazują wyraźnie wyniki badań Giesecke i in. [36]. Autorzy ci wyznaczali czas retencji 3 wskaźników w czepcu i księgach: Cr_2O_3 , PEG i ^{144}Ce umiejscowionego na cząstkach siana o długości 5 mm. Wskaźniki wprowadzono w pobliżu ujścia z czepca do ksiąg. Całkowitą treść wypływającą z ksiąg pobierano przez



Rys. 2. Wyznaczenie czasu wypływu dawki wskaźników z ksiąg do trawieńca w warunkach wolnego przepływu treści pokarmowej 382 ml/godzinę [36]:

———— PEG
 - - - - - Cr₂O₃
 - · - · - · ¹⁴⁴Ce

specjalnie skonstruowaną przetokę. Stwierdzono, że przy szybkości wypływu treści 382 ml/godzinę czas połowicznego wydalania PEG wynosił 36 minut, Cr₂O₃ 48 minut a ¹⁴⁴Ce — 149 minut (rys. 2). Wyniki wskazują wyraźnie, że wielkość cząstek ma istotny wpływ na czas ich retencji w żwaczu. Cr₂O₃ nie obrazował zachowania się większych cząstek paszy a szybkość jego wypływu była zbliżona raczej do fazy ciekłej. Cr₂O₃-P ma mniej wad niż ten sam związek zastosowany jako proszek, jednak obie te formy ustępują metalom ziem rzadkich zaadsorbowanym na cząstkach paszy pod względem podobieństwa fizycznego z treścią pokarmową [54]. Jak wspomniano powyżej, podobieństwo fizyczne jest warunkiem koniecznym dla minimalizacji błędów przy przenoszeniu wyników oznaczeń parametrów kinetyki uzyskanych dla wskaźników na będące przedmiotem oceny frakcje treści pokarmowej.

Modelowe zastosowanie wskaźników

Do pełnego opisu kinetyki treści pokarmowej najważniejsze wydaje się zastosowanie 2 wskaźników jednocześnie — dla fazy płynnej i stałej. Takie podejście doświadczalne pozwala na kompleksowe badania

i określenie czynników wpływających na przepływ treści pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego.

Wielokomorowy żołądek przeżuwacza jest zbiornikiem, w którym ma miejsce największe frakcjonowanie treści pokarmowej i różnicuje się szybkość wypływu frakcji płynnej i stałych cząstek [36]. W następstwie tego szybkość przepływu w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego i wydalania w kale wskaźnika fazy płynnej (PEG lub Cr-EDTA) jest znacznie większa niż metali ziem rzadkich [7, 40, 56, 57], lecz wielkości te są ze sobą skorelowane [5].

Poznanie tych prawidłowości było szczególnie istotne dla sformułowania modeli matematycznych obrazujących zachowanie się wskaźników i treści pokarmowej przy przechodzeniu przez przewód pokarmowy. Na uwagę zasługuje dwuprzędziałowy model Brandta i Thackera [9], rozwinęty przez Grovuma i Williamsa [38, 39]. Podano w nim podstawy matematyczne określania czasu retencji i przepływu składników w wielokomorowym żołądku oraz w dalszych częściach przewodu pokarmowego w oparciu o szybkość wydalania wskaźników w kale. Praktyczne zastosowanie tego modelu do określenia stopnia wypełnienia żwacza, czasu retencji oraz czasu wymiany treści w żwaczu u krów w różnych stadiach laktacji przedstawili Hartnell i Satter [43]. Model oparty jest na równaniu [40]:

$$y = Ae^{-k_1(t-TT)} - Ae^{-k_2(t-TT)}$$

gdzie y i A — stężenie wskaźnika w kale, k_1 — stała szybkości kinetyki wskaźnika w czepco-żwaczu, k_2 — stała szybkości kinetyki treści w jelicie ślepym i okrężnicy, t — czas od podania wskaźnika, TT — czas przejścia wskaźnika przez przewód pokarmowy. Zastosowanie tego równania do wyliczenia k_1 i k_2 wymaga użycia maszyny liczącej.

Inne zastosowanie wyników uzyskanych przy użyciu wskaźników to konstrukcja układów symulujących działanie żwacza (np. system Rusitec, [18]). Układy takie ułatwiają badanie procesów trawienia pasz oraz rozwoju mikroflory i mikrofauny żwacza w warunkach jak najbardziej zbliżonych do istniejących *in vivo*.

Uwagi końcowe

Zamierzeniem powyższego przeglądu było zaprezentowanie wskaźników, jakie stosowane są obecnie w badaniach na przeżuwaczach oraz wskazanie ich podstawowych zastosowań w odniesieniu do procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym.

Najczęstsze zastosowanie wskaźników to użycie przy:

a) określeniu dobowej podaży do jelita cienkiego składników pokarmowych oraz ich strawności w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego u zwierząt wyposażonych w przetoki żwacza, trawieńca oraz proste lub mostkowe przetoki w jelitach,

b) badaniu wpływu czynników zewnętrznych i wewnętrznych na przebieg trawienia i kinetykę składników treści pokarmowej w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego.

Pamiętać trzeba, że nasza wiedza o wskaźnikach i ich zastosowaniu ulega ciągłemu postępowi: wprowadza się nowe substancje o właściwościach bardziej zbliżonych do zdefiniowanych dla „idealnego wskaźnika”, a równocześnie odkrywa się wady wskaźników stosowanych dotychczas.

W chwili obecnej jako najskuteczniejsze wskaźniki polecić można Cr-EDTA dla frakcji płynnej oraz metale ziem rzadkich dla frakcji cząstek stałych treści pokarmowej.

Podkreślić należy raz jeszcze istotność i znaczenie właściwego doboru wskaźnika, który rzutować może na poprawność uzyskanych wyników doświadczalnych.

LITERATURA

1. Alexander C. L., Meyer R. M., Bartley E. E.: *J. anim. Sci.* 28, 69, 1969.
2. Antoniewicz A., Pisulewski P.: *Rocz. nauk. Zoot.* 7, 1980.
3. Balch C. C.: *Br. J. Nutr.* 4, 361, 1950.
4. Bauman D. E., Davis C. L., Frobish R. A., Sachan D. S.: *J. Dairy Sci.* 54, 928, 1971.
5. Beever D. E., Kellaway R. C., Thomson D. J., MacRae J. C., Evans C. C., Wallace A. S.: *J. agric. Sci., Camb.* 90, 157, 1978.
6. Beever D. E., Thomson D. J., Cammell S. B.: *J. agric. Sci., Camb.* 86, 443, 1976.
7. Bertoni G., Suttle N. F.: *Riv. Zootec. Vet.* 1, 165, 1973.
8. Binnerts W. T., Vant Klooster A. Th., Frens A. M.: *Vet. Res.* 82, 470, 1968.
9. Brandt C. S., Thacker E. J.: *J. anim. Sci.* 17, 218, 1958.
10. Bruce J., Goodall E. D., Kay R. N. B., Phillipson A. T., Vowles L. E.: *Proc. R. Soc. B* 166, 46, 1966.

11. Campling R. C., Freer M.: *Br. J. Nutr.* 16, 507, 1962.
12. Clark J. L., Hembry F. G., Thompson G. B., Preston R. L.: *J. Dairy Sci.* 55, 1160, 1972.
13. Corbett J. L., Greenhalgh J. F. D., Gwynn P. E., Walker D.: *Br. J. Nutr.* 12, 266, 1958.
14. Corbett J. L., Greenhalgh J. F. D., Florence E.: *Br. J. Nutr.* 13, 337, 1959.
15. Corbett J. L., Greenhalgh J. F. D., McDonald J., Florence E.: *Br. J. Nutr.* 12, 266, 1958.
16. Corse D. A., Sutton J. D.: *Proc. Nutr. Soc.* 30, 18A, 1971.
17. Czerkawski J. W., Breckenridge G.: *Br. J. Nutr.* 23, 559, 1969.
18. Czerkawski J. W., Breckenridge G.: *Br. J. Nutr.* 38, 371, 1977.
19. Czerkawski J. W., Paterson D. R.: *Proc. Nutr. Soc.* 27, 33A, 1968.
20. Donaldson R. M., Barreas R. F.: *J. Lab. clin. Med.* 68, 484, 1966.
21. Downes A. M., McDonald I. W.: *Br. J. Nutr.* 18, 153, 1964.
22. Drennam M. J., Holmes J. H. G., Garrett W. N.: *Br. J. Nutr.* 24, 961, 1970.
23. Dyne G. M., Meyer J. H.: *J. anim. Sci.* 23, 1108, 1964.
24. Egan A. R.: *Aust. J. agric. Res.* 21, 735, 1970.
25. Elliott R., Little D. A.: *Br. J. Nutr.* 37, 285, 1977.
26. Ellis W. C.: *J. agric. Food Chem.* 16, 220, 1968.
27. Ellis W. C., Ibert E. R.: *Proc. Vth Int. Congr. Nutr., Edinburgh*, 575, 1964.
28. El-Shazly K., Ahmed E. I. A., Naga M. A., Borhami B. E.: *J. agric. Sci, Camb.* 87, 369, 1976.
29. Ely R. E., Kane E. A., Jacobson W. C., Moore L. A.: *J. Dairy Sci.* 36, 346, 1953.
30. Erickson D. O., Bolin D. W., Dinusson W. E.: *J. anim. Sci.* 25, 1259, 1966.
31. Evans C. C., McRae J. C., Wilson S.: *J. agric. Sci., Camb.* 89, 17, 1977.
32. Faichney G. J.: *J. agric. Sci., Camb.* 79, 493, 1972.
33. Faichney G. J.: w *Digestion and Metabolism in the Ruminant* (ed. I. W. McDonald, A. C. I. Warner), 277, 1975.
34. Faichney G. J., Griffiths D. A.: *Br. J. Nutr.* 40, 71, 1978.
35. Garner R. J., Jones H. G.: Ekman L., *J. agric. Sci., Camb.* 55, 107, 1960.
36. Giesecke D., Engelhardt M., Erbersdobler H.: w *Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants*, II. I. A. E. A. Vienna, 133, 1975.
37. Goodall E. D., Kay R. N. B.: *Proc. Nutr. Soc.* 32, 22A, 1973.
38. Grovum W. L., Williams V. J.: *Br. J. Nutr.* 29, 13, 1973.
39. Grovum W. L., Williams V. J.: *Br. J. Nutr.* 30, 231, 1973.
40. Grovum W. L., Williams V. J.: *Br. J. Nutr.* 38, 425, 1977.
41. Hamilton J. G.: *Radiology* 49, 325, 1947.
42. Hartnell G. F., Satter L. D.: *J. anim. Sci.* 48, 375, 1979.
43. Hartnell G. F., Satter L. D.: *J. anim. Sci.* 48, 381, 1979.

44. Hill F. W., Anderson D. L.: *J. Nutrit.* 64, 587, 1958.
45. Hoelzel F.: *Am. J. Physiol.* 92, 466, 1930.
46. Hogan J. P.: *Aust. J. agric. Res.* 15, 384, 1964.
47. Huston J. E., Ellis W. C.: *J. agric. Food Chem.* 16, 225, 1968.
48. Hydén S.: *Ann. Roy. Agr. Coll. (Sweden)* 20, 337, 1955.
49. Hydén S.: *Ann. Roy. Agr. Coll. (Sweden)* 27, 51, 1961.
50. Karr M. R., Little C. O., Mitchell G. E. Jr.: *J. anim. Sci.* 25, 652, 1966.
51. King K. W., Moore W. E. C.: *J. Dairy Sci.* 40, 528, 1957.
52. Kotb A. R., Luckey T. D.: *Nutr. Abstr. a. Rev.* 42, 813, 1972.
53. Kropp J. R., Johnson R. R., Males J. R., Owens F. N.: *J. anim. Sci.* 46, 837, 1977.
54. MacRae J. C.: *Proc. Nutr. Soc.* 33, 147, 1974.
55. MacRae J. C., Armstrong D. G.: *Br. J. Nutr.* 23, 15, 1969.
56. MacRae J. C., Reid C. S. W., Dellow D. W., Wyburn R. S.: *Res. vet. Sci.* 14, 78, 1973.
57. MacRae J. C., Ulyatt M. J.: *N. Z. J. agric. Res.* 15, 98, 1972.
58. MacRae J. C., Ulyatt M. J., Pearce P. D., Hendtlass J.: *Br. J. Nutr.* 27, 39, 1972.
59. MacRae J. C., Wilson S.: *Br. J. Nutr.* 38, 65, 1977.
60. Martz F. A., Van Soest P. J., Vogt J. R., Hildebrand E. S.: w *Proc. of EAAP Vol. 14*, 111, 1974.
61. Morgan A.: U. K. Atomic Energy Res. Estab. R3181, Harwell, Kerkshire, England, 1959.
62. Neudoerffer R. S., McLaughlin D. R., Horney F. D.: *J. anim. Sci.* 31, 1042, 1970.
63. Nicholson J. W. G., Sutton J. D.: *Br. J. Nutr.* 23, 585, 1969.
64. Oldham J. D., Ling J. P.: *Br. J. Nutr.* 37, 333, 1977.
65. Phillipson A. T., Ash R. W.: w *Physiology of Digestion in the Ruminant*. Butterworth, 97, 1965.
66. Porter P., Singleton A. G.: *Br. J. Nutr.* 25, 3, 1971.
67. Schweitzer G. K., Jackson W. M.: *J. Chem. Educ.* 29, 513, 1952.
68. Smith R. H.: *J. agric. Sci., Camb.* 52, 72, 1959.
69. Smith R. H.: *J. Physiol.* 172, 305, 1964.
70. Smith R. H., McAllan A. B.: *Br. J. Nutr.* 25, 181, 1971.
71. Tan T. N., Weston R. H., Hogan J. P.: *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 22, 301, 1971.
72. Thompson R. C., Hollis O. L.: *Am. J. Physiol.* 194, 308, 1958.
73. Thornton R. F., Bird P. R., Somers M., Moir R. J.: *Aust. J. agric. Res.* 21, 345, 1969.
74. Till A. R., Downes A. M.: *Br. J. Nutr.* 19, 435, 1965.
75. Topp J. H., Kay R. N. B., Goodall E. D.: *Br. J. Nutr.* 22, 261, 1968.
76. Tulloh N. M., Hughes J. W.: *N. Z. J. agric. Res.* 8, 636, 1965.

77. Uden P., Colucci P. E., Van Soest P. J.: Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.*, w druku.
78. Ulyatt M.: *N. Z. J. agric. Res.* 7, 713, 1964.
79. Ulyatt M. J., Blaxter K. L., McDonald I.: *Anim. Prod.* 9, 463, 1967.
80. Van Soest P. J.: *J. Ass. Off. agric. Chem.* 46, 829, 1963.
81. Van't Klooster A. Th., Rogers P. A. M.: *Neth. J. vet. Sci.* 3, 114, 1970.
82. Van't Klooster A. Th., Rogers P. A., Sharma H. R.: *Neth. J. agric. Sci.* 17, 60, 1969.
83. Warner A. C. I.: *Vet. Res.* 84, 441, 1969.
84. Warner A. C. I., Stacy B. D.: *Br. J. Nutr.* 22, 389, 1968.
85. Weston R. H., Hogan J. P.: *Aust. J. agric. Res.* 18, 789, 1967.
86. Williams C. H., David D. J., Iismaa O.: *J. agric. Sci., Camb.* 59, 381, 1962.
87. Ziółcka A.: *Roczn. Nauk roln.* 127-D, 62, 1969.