

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchsanordnung und Zeitplan

Die Tab. 1 und 2 geben die Versuchsanordnung und den Zeitplan wieder.

**Tab. 1: Übersicht über die Aufgabenstellungen und den zeitlichen Ablauf der Versuchsreihen V 1 - 11**

V	Datum	Aufgabenstellung
1	04.02.2003 – 11.03.2003	Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ zur Langzeitstudie
	12.03.2003 – 07.04.2003	Wash-Out-Phase
2	08.04.2003 – 29.04.2003	Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ bei ausgeglichener Energieversorgung (Stroh u. Kraftfutter; Erhaltungsbedarf NEL)
3	30.04.2003 – 20.05.2003	Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ bei negativer Energiebilanz (Stroh; Erhaltungsbedarf NEL)
	21.05.2003 – 02.06.2003	Wash-Out-Phase
4	03.06.2003 – 11.06.2003	Verabreichung von $\text{KHCO}_3$ bei gleichzeitiger Gabe von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$
	12.06.2003 – 23.06.2003	Wash-Out-Phase
5	24.06.2003 – 02.07.2003	Verabreichung von $\text{NaHCO}_3$ bei gleichzeitiger Gabe von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$
	03.07.2003 – 14.07.2003	Wash-Out-Phase
6	15.07.2003 – 23.07.2003	Verabreichung eines $\text{KHCO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ -Gemisches bei gleichzeitiger Gabe von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$
	24.07.2003 – 04.08.2003	Wash-Out-Phase
7	05.08.2003 – 13.08.2003	Verabreichung von $\text{KHCO}_3$ bzw. $\text{NaHCO}_3$
	14.08.2003 – 01.09.2003	Wash-Out-Phase
8	02.09.2003 – 15.09.2003	Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ bei kalziumarmer Fütterung (Stroh und Maisschrot)
	16.09.2003 – 29.09.2003	Wash-Out-Phase
9	30.09.2003 – 14.10.2003	Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ bei ausgeglichener Kalziumversorgung (Stroh, Maisschrot und Kalk)
	15.10.2003 – 27.10.2003	Wash-Out-Phase
10	28.10.2003 – 02.12.2003	Wiederholung der ersten Versuchsphase
	03.12.2003 – 08.12.2003	Wash-Out-Phase
11	09.12.2003 – 16.12.2003	Einmalige Verabreichung von $\text{CaCl}_2$ bzw. $\text{CaSO}_4$ pro Tag
	17.12.2003 – 04.01.2004	Wash-Out-Phase

**Tab. 2: Übersicht über die Aufgabenstellung und den zeitlichen Ablauf der Versuchsreihe V 12**

V	Datum	Aufgabenstellung
12	05.01.2004 – 12.01.2004	Verabreichung von 2,5 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	12.01.2004 – 19.01.2004	Verabreichung von 3 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	19.01.2004 – 26.01.2004	Verabreichung von 3,5 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	26.01.2004 – 02.02.2004	Verabreichung von 4 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	02.02.2004 – 09.02.2004	Verabreichung von 4,5 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	09.02.2004 – 16.02.2004	Verabreichung von 5 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	16.02.2004 – 23.02.2004	Verabreichung von 5,5 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>
	23.02.2004 – 01.03.2004	Verabreichung von 6 Äquivalenten CaSO <sub>4</sub>

Aus der Tab. 3 sind die Daten und Angaben der Tagesprofile zu ersehen.

**Tab. 3: Übersicht über die Tagesprofile**

Tagesprofil	Versuch	Datum
1	V11	08.12.2003
2	V11	15.12.2003 – 16.12.2003
3	V12 (Übergang von 2,5 zu 3 equ)	12.01.2003 – 13.01.2003
4	V12 (4 equ)	27.01.2003 – 28.01.2003

### 3.2. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden 11 Kühe eingesetzt. Diese Tiere wurden im Rahmen einer vorhergehenden Studie von verschiedenen Betrieben ausgewählt. Auch im Rahmen dieses Projektes wurden ihnen Ende 2001 Pansenfisteln operativ eingesetzt. Die Kühe waren bereits in der Klinik für Klautiere eingestallt und wurden während des gesamten Versuchs in einem nicht klimatisierten Anbindestall auf Stroh gehalten. Es wurden Kühe ausgewählt, die mindestens eine oder mehrere Laktationen durchlaufen hatten. Alle Kühe gehörten zu der Holstein-Friesian-Rasse und hatten ein Gewicht zwischen 550 – 850 kg.

### 3.3. Futter und Fütterung

Die Tiere wurden täglich um 7 und um 14 Uhr gefüttert. Die Rationen gestalteten sich außer in den Versuchsphasen 2, 3, 8 und 9 aus 2 kg Kraftfutter, 8 kg Wiesenheu und 300 g Futterkalk. In der zweiten Versuchsphase wurden anstatt Heu 6 kg Gerstenstroh und zusätzlich 30 g Vihsalz gegeben. In der dritten Versuchsphase wurde das Kraftfutter weggelassen, ansonsten unterschied sie sich nicht von V 2. Die Rationen von V8 und 9 bestanden aus 2 kg Maisschrot und 6 kg Gerstenstroh, in V9 zusätzlich 300 g Futterkalk. Die Anfütterung erfolgte jeweils eine Woche vor Beginn des Versuchs.

Wasser stand den Kühen ad libitum über Selbsttränken zur Verfügung. Der tägliche Wasserverbrauch wurde dokumentiert. Die Futtermittel sind regelmäßig von einem externen Labor untersucht worden. Tab. 4 und 5 geben die DCAB-Werte wieder. Aus Tab. 6 und 7 sind die Werte der Futterinhaltsstoffe der Gesamtration zu ersehen. In V12 erfolgte am 29. Tag eine Heuumstellung, dies ist in Tab. 5 berücksichtigt. Die Futterinhaltsstoffe (pro kg TS) sind bei LÖPTIEN (2004) veröffentlicht.

**Tab. 4: DCAB-Werte der Futtrationen ohne und mit Salz der Versuche 1 - 11**

V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>DCAB Futter (meq / kg TS)</b>	399	438	575	276	287	288	288	318	319	390	234
<b>DCAB Salz (meq / kg TS)</b>	167	170	216	(276)	(287)	(288)	450	47	49	172	0

$$\text{DCAB} = (\text{Na} + \text{K}) - (\text{Cl} + \text{S}) \text{ [meq/kg TS]}$$

**Tab. 5: DCAB-Werte der Futtration ohne und mit Salz im Versuch 12**

Futter	DCAB Futter (meq/kg TS)	DCAB Salz (meq/kg TS)							
<b>bis zum 29. Tag</b>	179	-211	-289	-367	-440				
<b>ab dem 29. Tag</b>	183					-315	-370	-425	-481
<b>Menge von CaSO<sub>4</sub> (equ/Kuh/d)</b>		<b>2,5</b>	<b>3</b>	<b>3,5</b>	<b>4</b>	<b>4,5</b>	<b>5</b>	<b>5,5</b>	<b>6</b>

$$\text{DCAB} = (\text{Na} + \text{K}) - (\text{Cl} + \text{S}) \text{ [meq/kg TS]}$$

**Tab. 6: Futtration der einzelnen Versuche – Futterinhaltsstoffe der Gesamtration**

V	Na (g/d)	K (g/d)	Cl (g/d)	S (g/d)	Ca (g/d)	Mg (g/d)	P (g/d)	NEL (MJ/d)
<b>1</b>	4,29	173,40	26,37	6,97	154,9	20,74	33,61	49,61
<b>2</b>	21,72	135,26	27,35	4,46	87,52	7,11	11,72	32,90
<b>3</b>	13,61	131,57	23,75	1,36	78,48	2,30	3,24	21,15
<b>4</b>	4,68	169,83	43,16	13,3	143,43	25,09	29,12	50,46
<b>5</b>	2,94	160,19	40,14	7,59	113,12	15,18	27,14	46,79
<b>6</b>	4,20	134,04	23,69	4,49	112,29	16,91	25,89	47,77
<b>7</b>	4,20	134,08	23,69	4,49	112,29	16,91	25,89	47,77
<b>8</b>	3,62	100,70	10,05	1,48	20,76	6,50	9,83	36,50
<b>9</b>	4,00	98,69	7,38	2,00	77,54	5,31	8,77	35,15
<b>10</b>	3,79	195,54	36,48	9,85	130,36	20,75	33,25	52,39
<b>11</b>	2,92	133,84	31,01	11,40	85,07	15,99	21,64	42,23
<b>12 I</b>	3,03	93,96	41,07	4,64	85,08	6,05	17,14	31,59
<b>12 II</b>	4,02	154,96	65,89	11,22	126,64	20,75	25,80	49,63

### **3.4. Durchführung der Salzgabe und der Beprobung**

Die Salze wurden während der Versuche zweimal täglich zu den Fütterungen, in V 11 nur einmal täglich morgens verabreicht. Dazu wurde die Menge des verwendeten Salzes vorher in 2 l deionisiertem Wasser aufgelöst. Kalziumchlorid wurde je fünf Tieren 15 min. nach der Heuvorlage als Infusion über die Pansenfistel verabreicht. Kalziumsulfat wurde je sechs Tieren 30 min. nach Heuvorlage mit Hilfe von Schlauch und Trichter als Bolus ebenfalls über die Pansenfistel in den Pansen gegossen. Kaliumhydrogencarbonat wurde als Infusion und Natriumhydrogencarbonat als Bolus über die Pansenfistel verabreicht. In den Versuchen 1 – 3 und 8 – 11 wurden jeweils 2 Äquivalente/Tag, in den Versuchen 4 – 6 jeweils 1,5 Äquivalente/Tag der Salze  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{CaSO}_4$  verwendet. Zusätzlich wurden 1,5 Äquivalente Kaliumhydrogencarbonat (n=11) in V4 und 1,5 Äquivalente Natriumhydrogencarbonat (n=11) in V5 eingesetzt. In V6 wurden jeweils zusätzlich 0,75 Äquivalente (n=11) und in V7 wurden jeweils 1,5 Äquivalente Kalium- (n=5) und Natriumhydrogencarbonat (n=6) ohne den gleichzeitigen Einsatz von Kalziumsalzen verwendet. Bei V12 wurde nur  $\text{CaSO}_4$  in wöchentlich steigender Dosierung um 0,5 Äquivalente verwendet. Die Probenentnahme erfolgte mehrmals wöchentlich zwischen 10 und 11:30 Uhr. Es wurden Blutproben über die Punktion der V. jugularis in Heparin-Blutgasspritzen (Fa. Kabe) und Spontanharnproben in 100 ml Versandflaschen (Fa. Sarstedt) gewonnen. Die Blutgasspritzen wurden nach der Blutentnahme bis zur Bestimmung der Parameter gekühlt.

### **3.5. Durchführung der Laborarbeiten (Blutgasanalyse, NSBA)**

Die Proben wurden im Labor der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin aufbereitet. Die Blutgasparameter wurden innerhalb von 30 min. mit dem Blutgasanalysator (Abl 5, Radiometer Copenhagen) bestimmt und umfassten die Parameter Blut-pH, Basenüberschuss (base excess, Base-Excess, BE), Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) in (mmol/l),  $\text{pCO}_2$  (mmHG) und  $\text{pO}_2$  (mmHG).

Die Harnproben zur Bestimmung der NSBA wurden nach der Entnahme in den 100 ml Versandflaschen bei  $-23\text{ }^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Zur Bestimmung der Parameter wurden die Versandflaschen im Kühlschrank aufgetaut. Die Bestimmung der fraktionierten NSBA erfolgte nach der Titrationsmethode nach KUTAS (1965). Dazu wurde die Harnprobe vor dem Einsatz geschwenkt und auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden 10 ml Harn mit 1 n HCl auf den pH-Wert von 3,5 titriert und anschließend 30 Sekunden auf einer Kochplatte gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 0,1 n NaOH auf den pH 7,4 titriert.

Danach wurden 10 ml 20 % Formaldehydlösung dazu gegeben und erneut mit Hilfe von 0,1 n NaOH auf pH 7,4 titriert. Der pH-Wert sowie die verwendeten Mengen von HCl ( $V_{\text{HCl}}$ ) und NaOH ( $V_{\text{NaOH1}}$ ,  $V_{\text{NaOH2}}$ ) wurden dokumentiert. Unter Zuhilfenahme der Formeln der Tab. 7 wurden damit die Parameter errechnet.

**Tab. 7: Übersicht der Formeln der NSBA**

Parameter	Formel
NSBA (mmol/l)	$[(V_{\text{HCl}} \times 10) - (V_{\text{NaOH1}} + V_{\text{NaOH2}})] \times 10$
Basengehalt (mmol/l)	$V_{\text{HCl}} \times 100$
Säuregehalt (mmol/l)	$V_{\text{NaOH1}} \times 10$
$\text{NH}_4^+$ (mmol/l)	$V_{\text{NaOH2}} \times 10$
BSQ	Basengehalt : Säuregehalt

### 3.6. Statistische Auswertung

Die Erfassung und statistische Auswertung der Werte erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.5. Die Salzgruppen  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{CaSO}_4$  wurden getrennt voneinander ausgewertet. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 5 \%$  ( $p = 0,05$ ) festgelegt. Die biostatistische Auswertung wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse in einem gemischten Modell mit dem fixen Faktor Proben tag und dem zufälligen Faktor Tier und nachfolgendem Post-Hoc-Test nach Dunnett für den Proben tag im Vergleich zum Tag der Nullprobe mit korrigiertem  $\alpha$  durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung der untersuchten Parameter annähernd normalverteilt ist. Um die Plausibilität dieser Annahme für die Ergebnisse dieser Versuche zu überprüfen, wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors für die standardisierten Residuen des linearen Modells mit  $\alpha = 0,05$  sowie ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Lagen die Signifikanzen dieser beiden Tests unter 0,05, so wurde durch logarithmieren oder Herausnehmen der Ausreißer versucht, eine Annäherung an eine Normalverteilung zu erzielen. Die Parameter, bei denen dies durchgeführt wurde, sind der Tab. 8 zu entnehmen. Darüber hinaus wurde ein Mittelwertvergleich der zwei Salzgruppen zueinander an jedem Proben tag innerhalb eines Versuches durch einen t-Test mit unabhängigen Stichproben durchgeführt. Des Weiteren wurden die Versuche 8 und 9 bzw. 4 und 5 zueinander an jedem Proben tag mittels des t-Testes mit unabhängigen Stichproben verglichen.

Bei dem Versuch über steigenden Dosierungen von Kalziumsulfat (V12-19) wurde keine biostatistische Auswertung durchgeführt. Die Abhängigkeiten zwischen der DCAB und den Parametern pH, BE, Harn-pH, NSBA und BSQ (4.12.) wurden durch eine lineare, quadratische oder kubische Regressionanalyse hergestellt. Die Regressionsanalyse mit dem höchsten R-Quadrat wurde dabei jeweils ausgewählt.

**Tab. 8: Parameterübersicht**

Versuch	Parameter	Salz	logarithmiert	ohne Ausreißer
V1	sO <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>		+
V1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	+	
V1	Säuregehalt	CaCl <sub>2</sub>	+	
V2/3	pH	CaSO <sub>4</sub>		+
V2/3	sO <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>		+
V5	Harn-pH	NaHCO <sub>3</sub> + CaSO <sub>4</sub>		+
V7	HCO <sub>3</sub>	KHCO <sub>3</sub>		+
V8	BE	CaSO <sub>4</sub>		+
V8	HCO <sub>3</sub>	CaSO <sub>4</sub>		+
V8	Basengehalt	CaCl <sub>2</sub>	+	
V8	BSQ	CaCl <sub>2</sub>	+	
V9	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	+	
V10	pH	CaCl <sub>2</sub>		+
V10	Basengehalt	CaCl <sub>2</sub>	+	
V10	BSQ	CaSO <sub>4</sub>	+	
V10	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaCl <sub>2</sub> / CaSO <sub>4</sub>	+	
V11	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	+	
V12	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaSO <sub>4</sub>		+
Tagesprofil 2	Säuregehalt	CaSO <sub>4</sub>		+
Tagesprofil 3	Basengehalt	CaSO <sub>4</sub>	+	
Tagesprofil 3	BSQ	CaSO <sub>4</sub>	+	
Tagesprofil 3	Harn-pH	CaSO <sub>4</sub>		+
Tagesprofil 3	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CaSO <sub>4</sub>		+
Tagesprofil 4	Harn-pH	CaSO <sub>4</sub>		+