
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXI

SECTIO E

2006

Instytut Żywienia Zwierząt, Akademia Rolnicza w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

Antoni Lipiec, Agnieszka Skałecka

*Wykorzystanie chlorofilu do oceny pobrania i strawności
składników pokarmowych na pastwisku*

The usage of chlorophyll for evaluation of dry matter intake and nutrients
digestibility in a pasture

ABSTRACT. Two experiments involving 8 adult ewes were carried out. In experiment No. 1 the sheep were fed exclusively on the pasture, whereas in the second experiment the green forage was supplied to sheep individually in feeding racks, to compare the roughage intake values to the results obtained using markers-based evaluation. In the studies, the double indicator method was applied, using the following markers: internal – chlorophyll and external – chromium oxide (Cr_2O_3). To evaluate potential changes of chlorophyll concentration in the samples, it was established three times: directly after sample collection, in the sample chilled to 0–4 centigrade and in the frozen sample. The average amount of dry matter consumed by all the sheep, established by weighing did not differ significantly from the amount assessed on the basis of chlorophyll A. The differences between the dry matter consumption related to 1 kg of $\text{BW}^{0.75}$ in the experiments No. 1 and No. 2 resulted from the experimental animals weight gain during the studies. The sensitivity of chlorophyll A as a marker helpful for nutrients digestibility trials was also satisfactory. It stems from directional changes of digestibility coefficients, related to changes in the chemical composition of examined pasture roughage.

KEY WORDS: chlorophyll, pasture, sheep, dry matter intake, nutrients digestibility

METODY

Badania zlokalizowano w Zakładzie Doświadczalnym Akademii Rolniczej w Ustrusku. Dokonano oceny składu botanicznego runi pastwiskowej. Celem określenia potencjalnych strat w zawartości chlorofilu w próbach zielonek przeprowadzono dwa testy (w trakcie trwania doświadczeń), w których oceniano koncentrację chlorofilu A i B: bezpośrednio po pobraniu i w próbach przechowywanych w lodówce w temperaturze 0–4°C oraz w stanie zamrożonym. Chlorofil w zielonkach i kałach oznaczano spektrofotometrycznie, przy długości fali 645 nm dla chlorofilu A oraz 663 dla chlorofilu B.

Przeprowadzono dwa doświadczenia na ośmiu dorosłych maciorkach – 4 szt. polskiej owcy nizinnej z 25 % dolewem krwi owcy romanowskiej (ponR) + 4 szt. berrichon de cher (Berr). W doświadczeniu I owce korzystały wyłącznie z pastwiska, natomiast w doświadczeniu II zielonkę podawano indywidualnie *ad libitum* w paśnikach celem zweryfikowania wyników uzyskanych w doświadczeniach wskaźnikowych. Ilość pobieranej zielonki w doświadczeniu II określano również wagowo, z dokładnością do 10 g. Do oceny pobrania suchej masy oraz strawności składników pokarmowych w obu doświadczeniach zastosowano metodę podwójnego wskaźnika, wykorzystując jako markery: chlorofil – wewnętrzny i tlenek chromowy (Cr₂O₃) – zewnętrzny. Tlenek chromowy podawano *per os*, dwa razy w ciągu doby w opłatkach aptekarskich, w ilości 4 g na dobę. Uśrednione próbki zielonek pobierano z pastwiska trzy razy w trakcie trwania każdego doświadczenia. Próbki kału pobierano dwa razy w ciągu doby od każdej owcy indywidualnie, bezpośrednio z jelita końcowego. Zawartość chlorofilu w trakcie doświadczeń oznaczano w ciągu sześciu godzin od momentu pobrania prób, natomiast skład chemiczny oraz zawartość tlenku chromowego badano w materiale podsuszonym. Analizy laboratoryjne składu chemicznego zielonek i kałów oraz pomiary stężenia markerów wykonano w Instytucie Żywienia Zwierząt AR w Lublinie [Dz.U. 2004.271.2688].

WYNIKI

Zielonka pastwiskowa zawierała w runi 81,4 % traw z przewagą życicy wielokwiatowej; 0,3 % motylkowatych i 18,3 % ziół i chwastów. Zróżnicowanie zawartości chlorofilu (tab. 1) w suchej masie zielonek wynikało z różnych faz vegetacji roślin użytych do testów. W teście pierwszym zielonka pobierana była w początkowej fazie kwitnienia traw, a w teście drugim po okresie kwitnienia. Miało to również wpływ na zawartość składników pokarmowych w suchej masie (tab. 2). Zielonkę użytą w teście drugim charakteryzowała wyższa zawartość suchej masy oraz włókna surowego, istotnie mniejsza była natomiast zawartość białka oraz związków bezazotowych wyciągowych.

Tabela 1. Wpływ czasu i sposobu przechowywania zielonki na zawartość chlorofilu
Table 1. The influence of time and manner of green forage storage on the chlorophyll content

Próba Sample		Czas przechowywania próby zielonki Storage time of green sample											
		6 h		24 h		7 d		14 d		21 d		28 d	
		Frakcja chlorofilu (g/kg s.m.) Fraction of chlorophyll (g/kg of DM)											
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Test 1	Świeża Fresh	5,02 ±0,4	2,27 ±0,2	4,92 ±0,6	1,98 ±0,1								
	Mrożona Frozen			4,84 ±0,9	1,76 ±0,8	4,86 ±0,9	1,67 ±0,7	4,42 ±1,4	1,20 ±1,1	4,58 ±1,1	1,21 ±0,7	4,58 ±1,4	1,16 ±0,8
Test 2	Świeża Fresh	2,35 ±0,2	0,42 ±0,2	2,26 ±0,3	0,31 ±0,1								
	Mrożona Frozen			2,29 ±0,9	0,29 ±0,2	2,39 ±0,7	0,22 ±0,2	2,11 ±0,9	0,23 ±0,2	1,84 ±0,3	0,11 ±0,1	1,84 ±0,4	0,08 ±0,1

Tabela 2. Skład chemiczny suchej masy runi pastwiskowej
Table 2. Chemical composition of pasture dry matter

Doświad- czenie Experiment	Sucha Masa % Dry matter %	Popiół Surowy % Crude ash %	Białko Ogólne % Crude Protein %	Tłuszcz Surowy % Ether Extract %	Włókno Surowe % Crude Fibre %	BAW % NFE %
1	23,48 ±2,81	9,91 ±0,29	15,36 ±0,91	3,11 ±0,39	18,86 ±1,67	52,76 ±0,45
2	29,57 ±0,40	11,59 ±2,05	11,98 ±1,21	3,33 ±0,19	29,08 ±1,19	44,03 ±2,12
NIR LSD	2,91	Ni ns	1,51	Ni ns	2,84	3,02

Wyniki testów wskazują na to, że frakcja B chlorofilu jest mało stabilna i ulega zmniejszeniu podczas przechowywania prób. Jest zatem mało przydatna w badaniach wskaźnikowych. Znacznie lepsza jest stabilność chlorofilu A, który ponadto ze względu na wyższe stężenie w suchej masie roślin generuje niższy błąd podczas oznaczeń ($\Delta\%=3-5$). Z tych też względów chlorofil A jest bardziej wiarygodny jako wskaźnik w szacowaniu pobrania suchej masy zielonek przez owce. Celem uniknięcia ewentualnych błędów, wynikających z niekontrolowanych strat chlorofilu podczas przechowywania prób, jego zawartość w zielonkach i kałach należy oznaczać w próbach świeżych, przechowywanych maksymalnie do 24 godzin, w nieprzepuszczających światła pojemnikach i w temperaturze od 0 do 4 °C.

Wyniki pobrania suchej masy przez owce podano w tabeli 3. Ponieważ na wielkość pobrania suchej masy przez zwierzęta ma wpływ również tempo przemian metabolicznych, wyniki podano także w przeliczeniu na 1 kg masy metabolicznej ciała owiec ($MMC=MC^{0,75}$). Ilość pobieranej suchej masy w obu doświadczeniach była zbliżona i kształtowała się na poziomie podawanym w normach żywienia owiec [Vérité i in. 1979; Schneeberger, Landis 1984]. Znamienny jest przy tym fakt, że owce berrichon pobierały w doświadczeniu 1 istotnie więcej zielonki aniżeli owce ponoromanowskie. Podobna istotna zależność wystąpiła także w przeliczeniu pobrania na metaboliczną masę ciała. Tendencja taka miała miejsce także w doświadczeniu 2, chociaż różnice nie były istotne. Wyniki te świadczą z jednej strony o wysokiej czułości i przydatności zastosowanego wskaźnika (chlorofilu) w tego typu badaniach, z drugiej zaś o istotnych różnicach w pobraniu suchej masy przez zwierzęta w obrębie gatunku. O większej żerności owiec ras mięsnych donosi się także w innych opracowaniach [Kłos, Rogalski 2001], jednak co należy podkreślić, fakt ten nie jest do tej pory uwzględniony w normach żywienia.

Tabela 3. Pobranie suchej masy
Table 3. Dry matter intake

Doświadczenie Experiment	Genotyp Genotype	Kg/szt./dzień Kg/head/day		G/kg MMC/dzień G/kg BW ^{0,75} /day	
		Rzeczywiste* True*	Chlorofil Chlorophyll	Rzeczywiste True*	Chlorofil Chlorophyll
1	Ponr		1,9 ±0,4		86 ±17
	Berr		2,3 ±0,2		103 ±13
NIR LSD			0,2		15
2	Ponr	1,8 ±0,4	1,9 ±0,5	77 ±16	76 ±20
	Berr	2,1 ±0,5	2,0 ±0,4	83 ±21	83 ±22
NIR LSD		Ni ns	Ni ns	Ni ns	Ni ns

* Na podstawie pomiarów wagowych

* Based on the mass measures

O przydatności chlorofilu jako wskaźnika do badań nad pobraniem suchej masy przez przeżuwacze świadczą szczególnie wyniki doświadczenia 2. Uzyskane wartości pobrania nie różniły się zasadniczo od tych, które otrzymano drogą pomiarów wagowych. Mniejsze pobranie suchej masy w doświadczeniu 2 w przeliczeniu na 1 kg MMC było wynikiem zwiększonej masy ciała owiec, u których indywidualny przyrost w trakcie trwania badań wynosił od 3 do nawet 5 kg.

Tabela 4. Strawność składników pokarmowych
Table 4. Nutrients digestibility

Doświadczenie Experiment	Genotyp Genotype	Białko Ogólne % Crude protein %	Tłuszcz surowy % Ether Extract %	Włókno surowe % Crude Fibre %	BAW % NFE %
1	Ponr	53 ±10	38 ±9	47 ±8	62 ±6
	Berr	56 ±6	37 ±10	48 ±7	65 ±7
NIR LSD		Ni ns	Ni ns	Ni ns	Ni ns
2	Ponr	64 ±11	69 ±9	65 ±13	69 ±11
	Berr	63 ±6	67 ±6	63 ±11	68 ±8
NIR LSD		Ni ns	Ni ns	Ni ns	Ni ns
NIR _(D1:D2)		Ni ns	11	12	Ni ns
LSD _(Ex1:Ex2)					

Pewnym zaskoczeniem było porównywalne dobowe pobranie suchej masy zielonki koszonej w doświadczeniu 2 i w doświadczeniu 1 – pastwiskowym. Zakładano bowiem, że przy bezpośrednim żywieniu *ad libitum* zielonką koszoną zwierzęta będą pobierały więcej masy pokarmowej aniżeli na pastwisku. Niewątpliwie miała na to wpływ jakość zielonki, która w doświadczeniu 2 zawierała więcej suchej masy i włókna surowego. Jej wartość wypełnieniowa była zatem większa i wymagała dłuższego czasu przeżuwania. W efekcie czynniki te wpłynęły na niższe w przeliczeniu na 1 kg MMC pobranie suchej masy.

W odniesieniu do wartości obliczonych metodą wskaźnikową podkreślić należy także dobrą powtarzalność wyników cząstkowych. Świadczą o tym zbliżone co do wartości współczynniki odchylenia standardowego z pomiarów wagowych i badań wskaźnikowych.

Wysoka powtarzalność wyników oraz czułość tej metody zdają się wskazywać na to, że chlorofil w porównaniu z innymi znacznie droższymi i bardziej skomplikowanymi pod względem analitycznym metodami [Mayes i in. 1986; Vulich, Hanrahan 1995; Reeves i in. 1996; Nowakowski i in. 2000] powinien znaleźć szersze zastosowanie. W niektórych wcześniejszych pracach podnoszony jest problem strat chlorofilu wskutek częściowego utleniania i rozkładu pod wpływem światła słonecznego [Schwartz, von Elbe 1983]. W badaniach tych wykorzystywano jednak najczęściej chlorofil całkowity, co mogło mieć wpływ na dokładność pomiarów.

Nie stwierdzono znaczących z praktycznego punktu widzenia różnic w strawności składników pokarmowych w zależności od genotypu owiec (tab. 4). Istotny statystycznie wpływ na strawność miała natomiast faza wegetacji skarmianej zielonki. W doświadczeniu 2 wartość współczynników strawności była wyższa aniżeli podczas doświadczenia 1, jednak istotne statystycznie różnice wykazano jedynie dla tłuszczu i włókna surowego. Prawdopodobnie i w tym przypadku był to wynik dłuższego przebywania masy pokarmowej w przedżołądkach oraz lepszego rozdrobnienia zielonki podczas przeżuwania. Potwierdzałoby to znany z żywienia przeżuwaczy fakt [Wójcik i in. 1984], że bardzo młode zielonki – o nie do końca wykształconej strukturze składników strukturalnych (włókna surowego) – są gorzej trawione.

WNIOSKI

1. Zastosowanie metody podwójnego wskaźnika, z wykorzystaniem jako indykatora zewnętrznego tlenku chromowego (Cr_2O_3) oraz chlorofilu A – jako indykatora wewnętrznego pochodzenia naturalnego – pozwala na poprawne szacowanie pobrania przez owce masy pokarmowej.

2. Pomiary stężenia tego wskaźnika w zielonkach i kałach powinny być wykonane w ciągu 24 godzin od pobrania prób. Materiał do analiz powinien być przechowywany w temperaturze 0–4 °C bez dostępu światła.

3. Wielkość pobrania przez owce masy pokarmowej oraz strawność składników pokarmowych są warunkowane składem chemicznym (zawartość włókna surowego) porostu, oraz czynnikami osobniczymi związanymi z genotypem owiec.

PIŚMIENICTWO

- Kłos J. M., Rogalski M. 2001. Ocena przydatności wybranych linii i ras jagniąt do żywienia pastwiskowego. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 479, 149–154
- Mayer R. W., Lamb C.S., Colgrove P. M. 1986. The use of dosed and herbage n-alkane as markers for the determination of herbage intake. J. Agric. Sci. 107, 161–170.
- Nowakowski P., Aniołowski K., Ćwikła A., Wojski K. 2000. Ocena pobierania runi pastwiskowej przez owce z zastosowaniem n-alkanów jako wskaźników. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu 339, 233–241.
- Reeves M., Fulkerson W.J., Kellaway R.C., Dove H. 1996. A comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) pasture. Aust. J. Exp. Agric. 36, 23–30.
- Rozporządzenie MRiRW dn. 2 grudnia 2004 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materia-

- łach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych. Dz.U. 2004 nr 271 poz. 2688.
- Schneeberger H., Landis J. 1984. Fütterungsnormen und Nährwerttabellen für Wiederkäuer. Landwirt. Lehrmittelzentrale, Zollikofen, Szwajcaria.
- Schwartz S.J., von Elbe J.H. 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *J. Food Sci.* 48, 1303–1306.
- Vérité R., Journet M., Jarrige R. 1979. A new system for the protein feeding of ruminants: The PDI system. *Livest. Prod. Sci.* 6, 349.
- Vulich S.A., Hanrahan J.P. 1995. Faecal sampling for the estimation of herbage intake using n-alkanes: evaluation of sample pooling and the use of rectal grab samples. *J. Agric. Sci.* 124, 79–86.
- Wójcik S., Soroka T., Matras J., Tarkowski A., Wojtasik J. 1984. Ilość pasz dowolnie pobieranych przez przeżuwacze w zależności od składu dawki. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 257, 15–25.