

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.- Prof. Dr. Ellen Kienzle

**Grünfutter und Grünfutterkonserven modifizieren den
Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von Gideon Goren
aus Tel Aviv

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meinem Linus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
A. Der Einfluss der Fütterung auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes	2
B. Chlorophyll	7
III. PUBLIKATION	10
IV. DISKUSSION	31
A. Kritik der Methoden	31
B. Diskussion der Ergebnisse	32
V. ZUSAMMENFASSUNG	35
VI. SUMMARY	38
VII. LITERATURVERZEICHNIS	41
VIII. DANKSAGUNG	48

Abkürzungsverzeichnis

1N	1 normality
Abb.	Abbildung
ALF	Luzerne
a.m.	ante meridiem
ber.	berechnet
BW	body weight
$C_5H_{11}NO_2S$	Methionin
Ca	Calcium
CAB	cation-anion-balance
$CaCl_2$	Calciumchlorid
$CaCO_3$	Calciumcarbonat
Cl	Chlor
COBS	Grascobs
DE	digestible energy
DM	dry mater
Fig.	figure
g	Gramm
GRASS	Gras
griech.	griechisch
i.e.	id est; that is
KAB	Kationen-Anionen-Bilanz
kg	Kilogramm
Mg	Magnesium

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mmol	Millimol
N ₂ H ₈ SO ₄	Ammoniumsulfat
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
org. geb.	organisch gebunden
P	Phosphor
p.m.	post meridiem
S	Schwefel
SIL	Grassilage
STR	Stroh
STRe	extrudiertes Stroh
Tab.	Tabelle; table
TS	Trockensubstanz
UV	ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Chemische Struktur von Chlorophyll a und b
- Abb. 2 Relation von Ca-Aufnahme zu faecaler Ca-Exkretion in den eigenen Untersuchungen im Vergleich zu einer entsprechenden Regressionsgeraden aus der Meta-Analyse von KIENZLE und BURGER (2011)
- Abb. 3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zum Harn-pH-Wert von STÜRMER (2005) und BERCHTOLD (2009) sowie der eigenen Studie

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Effekt der Fütterung auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes nach Literaturangaben unter besonderer Berücksichtigung „grüner“ Futtermittel (modifiziert nach BERCHTOLD 2009)
- Tab. 2 Einfluss von Harnsäurern auf den Harn-pH-Wert des Pferdes bei verschiedenen Rationen (Messungen am letzten Tag des jeweiligen Versuches)
- Tab. 3 Einfluss von Harnsäurern auf den Basenexcess in arteriellem Blut des Pferdes bei verschiedenen Rationen nach einer Anfütterungszeit von mindestens 7 Tagen
- Tab. 4 Effect of acidifiers on urine pH in horses in relation to diet (measurements on last day of experiment)
- Tab. 5 Effect of acidifiers on base excess in arterial blood in relation to diet after at least one week of adaptation

I. Einleitung

Die Auswirkungen der Ernährung auf den Säuren-Basen-Haushalt beim Pferd sind in jeder klinischen oder Leistungssituation, wie zum Beispiel bei der Urolithiasis (REMILLARD et al. 1992; DUESTERDIECK-ZELLMER 2007), der Laktatakkumulation (FOREMAN 1996) oder der Equinen Rhabdomyolyse (VALBERG et al. 1993; CARLSTRÖM 1931; ARIGHI et al. 1984), bei der das Säuren-Basen-Gleichgewicht betroffen ist oder verändert werden soll, von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass bei Katzen, Hunden und Schweinen die Effekte der Rationen auf den Säuren-Basen-Haushalt, insbesondere auf den Urin-pH-Wert, mit der Kationen-Anionen-Bilanz (KAB) in Zusammenhang stehen (KIENZLE et al. 1991; BEHNSEN 1992; DOBENECKER et al. 1999; JANCZIKOWSKI 2008).

Eine Pilotstudie (STÜRMER 2005) beschrieb Einflüsse verschiedener Rationen auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes. Mit Heurationen gelang auch mittels drastischer Harnsäurerer keine Ansäuerung des Harns, wohingegen eine Kraftfuttermation dies leicht ermöglichte. Eine Folgestudie (BERCHTOLD 2009) sollte dieses Phänomen im Hinblick auf die Aufnahme und Verdaulichkeit von Calcium und Phosphor untersuchen. Die Untersuchung zeigte, dass die Harnansäuerung bei Heurationen weder vom Ca/P-Verhältnis noch von der Mineralstoffbilanz beeinflusst ist. Erneut konnte der Harn-pH-Wert unter ansonsten gleichen Bedingungen bei kraftfutterlastigen Rationen verschoben werden, bei heureichen dagegen nicht. Somit konnte die Hypothese, dass Heu einen stabilisierenden Effekt auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes hat, bestätigt werden.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht werden, ob sich der stabilisierende Effekt von Heu auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes durch strukturelle oder chemische Eigenschaften von Heu erklären lässt. Es wurden Effekte von Gras, Grassilage, Stroh und aufgeschlossenem Stroh sowie von Luzerneheu geprüft, die alle eine vergleichbare Struktur wie Heu aufweisen. Als stark zerkleinertes Raufutter mit ähnlicher Zusammensetzung wie Heu, aber anderer Struktur, wurden Grascobs (Grünmehl) eingesetzt.

II. Literaturübersicht

A. Der Einfluss der Fütterung auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes

Säuren und Basen können vom Organismus aufgenommen oder durch verschiedene Stoffwechselmechanismen produziert werden. Ursprungsunabhängig müssen diese gepuffert und ausgeschieden werden, so dass ein Säuren-Basen-Gleichgewicht im Körper erhalten bleibt.

Der Hauptparameter für die Regulation ist der pH-Wert im Blut. Beim Pferd liegt der Referenzbereich des pH-Wertes im Blut bei 7,34 - 7,44 (KRAFT und DÜRR 2005).

Der Organismus kann über pulmonale und renale Regulationsmechanismen bestimmte pH-Schwankungen ausgleichen. Daher zeigen sich kleinere Schwankungen im Säuren-Basen-Gleichgewicht auch eher am Harn-pH-Wert als am Blut-pH-Wert. Zusätzlich verfügt der Körper über weitere Puffersysteme, zum Beispiel den Bicarbonat- oder den Hämoglobinpuffer im Blut, die in dieses Gleichgewicht eingreifen. Das Hämoglobin ist ein Proteinkomplex aus vier Untereinheiten, bestehend aus einem zentralen Eisenion und einem Porphyrinring. In seiner molekularen Struktur weist das Hämoglobin große Ähnlichkeiten mit dem Chlorophyll der Pflanzen und Algen und dem Bacteriochlorophyll der Bakterien auf (RÖMPPS, 1979).

Durch die Nahrung kann der Säuren-Basen-Haushalt beeinflusst werden. Dieser Einfluss lässt sich durch die KAB im Futter grob abschätzen. Die Kationen (Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium) wirken alkalisierend, die Anionen (Phosphor, Chlorid und Schwefel) säuernd (MAREK und WELLMANN 1932; LENNON et al. 1966; PATIENCE und CHAPLIN 1997; SCHUKNECHT 1991; KROHN 1993; STÜRMER 2005; BERCHTOLD 2009).

Weitere Literatur über den Effekt der Fütterung auf den Säuren-Basen-Haushalt im Allgemeinen und im Besonderen beim Pferd wurde bereits von STÜRMER (2005) und BERCHTOLD (2009) ausführlich dargestellt. In der vorliegenden Arbeit werden die wesentlichen Aspekte aus dem Schrifttum einschließlich neuerer Arbeiten und der Ergebnisse der genannten Studien kurz wiederholt und im Hinblick auf die eigenen Ergebnisse neu beleuchtet.

STÜRMER (2005) beobachtete, dass heureiche Rationen den pH-Wert im Harn und Blut unter Einsatz verschiedener Harnsäurerer, darunter Ammoniumchlorid, stabilisieren.

Wurde dagegen eine kraftfutterreiche, heuarmer Ration verabreicht, so konnte der pH-Wert im Harn durch Harnsäurerer in ähnlicher Weise verschoben werden wie bei anderen monogastrischen Species (KIENZLE et al. 1991; BEHNSEN 1992; DOBENECKER et al. 1999). ROMANOWSKI et al. (2011) konnten den stabilisierenden Effekt von Heu bestätigen. Heulastige Rationen wurden mit verschiedenen Mengen Natriumchlorid versetzt, das eine säuernde Wirkung hat. Der Effekt der Salzzulagen war wesentlich geringer als bei ähnlichen Versuchen mit kraftfutterreicheren Rationen von ZEYNER et al. (2008).

Es stellte sich die Frage, inwieweit der stabilisierende Effekt des Heus auf den Säuren-Basen-Haushalt auf die Mengenelementgehalte der Rationen zurückzuführen sei, da bei STÜRMER (2005) weder die Hafer- noch die Heurationen bilanziert worden waren. Außerdem war fraglich, ob es – wie von MEYER et al. (1982) und MEYER et al. (1992) postuliert - Unterschiede in der Verdaulichkeit der Mengenelemente gäbe, die die unterschiedlichen Effekte auf den Säuren-Basen-Haushalt erklären könnten. BERCHTOLD (2009) bilanzierte daher Heu- und Haferrationen und versetzte sie mit Harnsäurerern. Das Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen von STÜRMER (2005) überein. Auch die scheinbare Verdaulichkeit der Mengenelemente erklärte die unterschiedlichen Effekte nicht. Nach KIENZLE und BURGER (2011) besteht zwar bei der scheinbaren Verdaulichkeit von Mengenelementen ein Unterschied zwischen Heu und Kraftfutter, mit dem Lukas-Test zur Ermittlung der wahren Verdaulichkeit über Regressionsberechnung ließ sich dieser Unterschied bei der wahren Verdaulichkeit jedoch nicht verifizieren. KIENZLE und BURGER (2011) modifizierten den klassischen Lukas-Test für die Bestimmung der wahren Verdaulichkeit der Mengenelemente, indem sie die aufgenommene Mineralstoffmenge gegen die faecal ausgeschiedene Menge plotteten. Bei vergleichbarer wahrer Verdaulichkeit des Nährstoffs ergibt sich eine lineare Beziehung mit relativ geringer Variation um die Regressionsgerade. Futtermittel, bei welchen die wahre Verdaulichkeit höher ist, liegen in diesem Fall unterhalb der Regressionsgerade, während Futtermittel mit geringerer wahrer Verdaulichkeit des betreffenden Nährstoffes oberhalb liegen. Eine derartige Verteilung ließ sich weder beim Calcium noch beim Phosphor für Kraft- oder Raufutter zeigen (KIENZLE und BURGER 2011). Vermutlich sind die Unterschiede der scheinbaren Verdaulichkeit dieser Elemente bei Kraft- bzw. Raufutter auf unterschiedlichen Aufnahmen und den rechnerischen Einfluss der endogenen Verluste

zurückzuführen. Eine weitere Eigenschaft des Heus im Gegensatz zu Kraftfutter ist die Herkunft aus grünem Pflanzenmaterial. In Tab.1 wird dieser Aspekt gesondert berücksichtigt. Die Übersicht zum Effekt der Harnsäurer auf den Säuren-Basen-Haushalt, wie von STÜRMER (2005) und BERCHTOLD (2009) dargestellt, wurde um Daten aus neuerer Literatur und

- soweit bekannt - um Ergebnisse zur Aufnahme an grünem Pflanzenmaterial erweitert.

In Untersuchungen, in welchen überwiegend grünes Pflanzenmaterial zum Einsatz kam, fielen Harn-pH-Veränderungen durch Harnsäurer in der Regel geringer aus.

Eine Ausnahme bildet die Studie von REMILLARD (1992), bei der einem Klinikpatienten Harnsäurer (Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat) verabreicht wurden und Urin-pH-Werte von unter 7 gemessen worden waren, obwohl die Ration überwiegend aus Heu bestand. Hier ist allerdings eine insgesamt geringe Futteraufnahme wahrscheinlich, quantitative Angaben fehlen.

II. Literaturübersicht

Tab. 1: Effekt der Fütterung auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes nach Literaturangaben unter besonderer Berücksichtigung „grüner“ Futtermittel (modifiziert nach BERCHTOLD 2009)

Literatur	Rau-/Kraftfutter	Anteil und Art „grüner“ Futters	Anteil und Art Kraftfutter	KAB	KAB ber.	Harn-pH	Blut-pH	Säuernde Zusätze
BAKER et al. (1992)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	231 ¹	364 ⁴	7,52	7,37	-
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	21 ¹	-43 ⁴	5,59	7,35	CaCl ₂ , NH ₄ Cl
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	125 ¹	131 ⁴	6,97	7,31	CaCl ₂
BAKER et al. (1993)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	227 ¹	316 ⁴			-
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	24 ¹	79 ⁴			CaCl ₂ , NH ₄ Cl
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	127 ¹	177 ⁴			CaCl ₂
BAKER et al. (1998)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	0 ²		6,05	7,35	MgSO ₄
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	53 ²		5,73	7,33	NH ₄ Cl
BERCHTOLD (2009)	76/24	76% Heu	24% Hafer	-	86	7,1	7,44	NH ₄ Cl, NaCl, MgCl ₂ , CaCO ₃ , C ₅ H ₁₁ NO ₂ S, CaSO ₄ , N ₂ H ₈ SO ₄
	77/23	77% Heu	23% Hafer	-	-106	7,13	7,43	NH ₄ Cl, NaCl, MgCl ₂ , CaCO ₃ , C ₅ H ₁₁ NO ₂ S, CaSO ₄ , N ₂ H ₈ SO ₄
	83/17	83% Heu	17% Hafer	-	-112	7,12	7,42	NH ₄ Cl, NaCl, MgCl ₂ , CaCO ₃ , C ₅ H ₁₁ NO ₂ S, CaSO ₄ , N ₂ H ₈ SO ₄
	38/62	38% Heu	62% Hafer	-	-22	6,52	7,43	NH ₄ Cl, NaCl, MgCl ₂ , CaCO ₃ , C ₅ H ₁₁ NO ₂ S, CaSO ₄ , N ₂ H ₈ SO ₄
	38/62	38% Heu	62% Hafer	-	-85	5,81	7,42	NH ₄ Cl, NaCl, MgCl ₂ , CaCO ₃ , C ₅ H ₁₁ NO ₂ S, CaSO ₄ , N ₂ H ₈ SO ₄
COOPER et al. (1998)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja	110 ²	-	-	-	-
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja	86 ²	-	-	-	CaCl ₂ , NH ₄ Cl
COOPER et al. (2000)	30/70	30% Heu	70% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	-52 ²	238 ⁴	-	-	CaCl ₂
MCKENZIE et al. (2002)	55/45	55% Heu	44% Getreide, Hafer, Soja, Bolzmehl	85 ²	207 ⁴	5,25	7,33	org. geb. S, Cl
	55/45	55% Heu	44% Getreide, Hafer, Soja, Bolzmehl	190 ²	448 ⁴	8,00		-
MÜLLER et al. (2001)	100/0	50% Heu, 50% Luzerne (Pellets)	-	333 ²	794 ⁴	7,67	7,38	-
	30/70	30% Heu	Getreide, Soja	124 ²	837 ⁴	7,13	7,37	NH ₄ Cl
	30/70	30% Heu	Getreide, Soja	154 ²	888 ⁴	7,11	7,37	NH ₄ Cl
	50/50	50% Heu, 50% Luzerne (Pellets)	-	152 ²	551 ⁴	6,93	7,37	NH ₄ Cl
POPPLEWELL et al. (1993)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	10 ²	-	5,95	7,35	CaCl ₂ , NH ₄ Cl
	40/60	4% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	95 ²	-	7,33	7,37	CaCl ₂ ,
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	165 ²	-	7,45	7,39	-
REMILLARD et al. (1992) *		Heu, keine quantitative Angabe	Keine quantitative Angabe	-	-	6,50	-	NH ₄ Cl
		Heu, keine quantitative Angabe	Keine quantitative Angabe	-	-	5,00	-	N ₂ H ₈ SO ₄

II. Literaturübersicht

- Fortsetzung Tab. 1 -

Literatur	Rau-/ Kraftfutter	Anteil und Art „grünen“ Futters	Anteil und Art Kraftfutter	KAB	KAB ber.	Harn-Ph	Blut-pH	Säuernde Zusätze
ROMANOWSKI et al. (2011)	73/27	73 % Heu	Keine quantitative Angabe		-	**	**	NaCl
	73/27	73 % Heu	Keine quantitative Angabe		-	**	**	NaCl
	73/27	73 % Heu	Keine quantitative Angabe		-	**	**	NaCl
STÜRMER (2005)	88/12	88 % Heu	12% Hafer	179 ³	101 ⁴	7,52	7,43	-
	88/12	88 % Heu	12% Hafer	179 ³	100 ⁴	7,34	7,44	CaCl ₂
	88/12	88 % Heu	12% Hafer	179 ³	100 ⁴	7,41	7,43	NaCl
	88/12	88 % Heu	12% Hafer	111 ³	33 ⁴	7,38	7,45	NH ₄ Cl
	88/12	88 % Heu	12% Hafer	43 ³	-36 ⁴	7,31	7,40	NH ₄ Cl
	30/70	30 % Heu	70% Hafer	131 ³	86 ⁴	7,55	7,40	-
	30/70	30 % Heu	70% Hafer	53 ³	7 ⁴	6,67	7,39	NH ₄ Cl
STUTZ et al. (1992)	40/60	40% Heu	60% corn,soya, cottonseed hulls	201 ¹		7,37		-
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	107 ¹		7,37		CaCl ₂
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	5 ¹		7,34		CaCl ₂ , NH ₄ Cl
TOPLIFF et al. (1989)	50/50			6,5 ¹				NH ₄ Cl
WALL et al. (1992)	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	201 ¹	336 ⁴	7,38		-
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	107 ¹	226 ⁴	7,17		CaCl ₂
	40/60	40% Heu	60% Getreide, Soja, Baumwollsamensprodukt	5 ¹	109 ⁴	6,73		CaCl ₂ , NH ₄ Cl

1AKB berechnet: $Na + K - Cl$

2AKB berechnet: $(Na + K) - (Cl + S)$

3AKB berechnet: $49,9*Ca + 82,3*Mg + 43,5*Na + 25,6*K - 59*P - 13*(Met + Cys) - 28,2Cl$

4AKB berechnet: $49,9*Ca + 82,3*Mg + 43,5*Na + 25,6*K - 59*P - 62,4*S - 28,2Cl$

* klinischer Fall – geringe Futterraufnahme möglich

** keine signifikante Veränderung

B. Chlorophyll

Chlorophyll (griech. *Chloros* = gelbgrün und *phyllon* = Blatt) oder Blattgrün verleiht Pflanzen und bestimmten Algen die Funktion der Photosynthese und, wie der Name bereits sagt, ihre grüne Farbe. Chlorophyll ist ein Gemenge aus 2 Chlorophyll-Arten, Chlorophyll a und Chlorophyll b. Durch Chromatographie lassen sich diese Moleküle trennen. Chlorophyll a ist blaugrün und Chlorophyll b gelbgrün gefärbt. Die Umwandlung von der b- in die a-Form geschieht durch Oxidation. Chlorophyll a kommt in der Pflanze dreimal häufiger vor als Chlorophyll b. Aus Meeresalgen konnte man das Chlorophyll c und d isolieren (RÖMPPS 1979).

Der Blattfarbstoff enthält als Grundgerüst das Porphyrin, das aus 4 miteinander verbundenen Pyrrolringen besteht. Über eine Methylestergruppierung ist ein Cyclopentenonring in das Molekül eingebaut. Ein Phytol (ungesättigter Alkohol) ist über eine Carboxylgruppe mit dem Porphyrinkomplex verbunden. Daneben enthält das Porphyrin weitere Gruppen: 3 Methyl-Gruppen und jeweils eine Ethyl-, eine Vinyl- und eine Aldehyd- bzw. eine weitere Methylgruppe. Magnesium ist als Zentralion im Molekül gebunden (LATSCHA 1994).

Abb. 1 stellt die Chlorophylle a und b dar.

Der Blattfarbstoff Chlorophyll ist dem Blutfarbstoff Hämoglobin sowohl in der Struktur als auch in anderen seiner Eigenschaften ähnlich. Hämoglobin besitzt ebenfalls die Struktur des Porphyrins, statt Magnesium besitzt das Molekül Eisen als Zentralion.

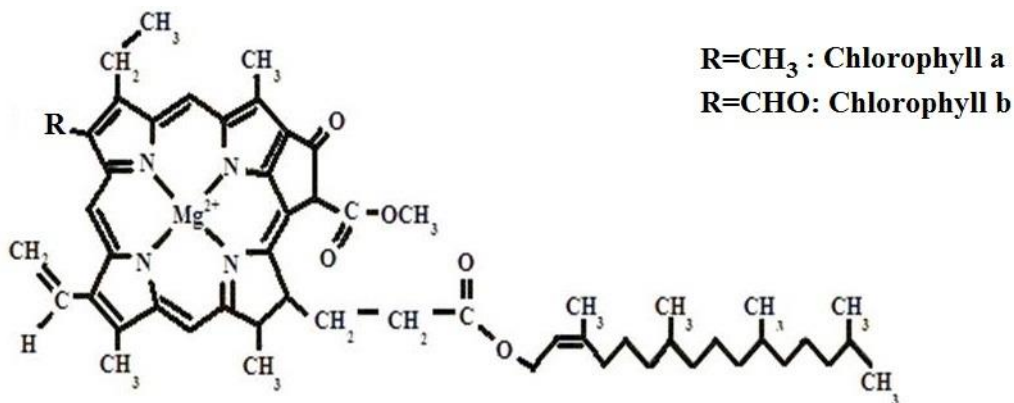


Abb. 1: Chemische Struktur von Chlorophyll a und b

Das Chlorophyll steht derzeit in der Ernährungsforschung nicht im Fokus. Es gibt kaum aktuelle Publikationen, wenn man von dem derzeitigen Interesse an dem Metaboliten Phytansäure in der Milch (HELLGREN 2010) absieht, der aus Phytol stammt.

In der wissenschaftlichen Literatur konnten keine Studien zum Einfluss des Chlorophylls auf den Säuren-Basen-Haushalt gefunden werden. In der populärwissenschaftlichen Literatur wird jedoch behauptet, dass Chlorophyll ein hervorragender Puffer sei und gegen eine „Übersäuerung“ des Organismus wirke (ULMER 1997). Entsprechende Ernährungsergänzungen befinden sich in großer Zahl auf dem Markt. Chlorophylltabletten (z.B. Stozzon®) werden auch gegen Mundgeruch und Körpergeruch angeboten.

Das Chlorophyll wird nach Verlust des Zentralions Magnesium zu Pheophytin. Dieser wird bei der Photosynthese benötigt. KLIMOV (2003) beschreibt die Bedeutung des Pheophytins im Photosystem II als ersten Elektronenempfänger und -transporter.

Die Menge an Pheophytin in Relation zu Chlorophyll ist in der Pflanzenzelle sehr gering (<0,1%) (IGNATOV et al. 1994).

Pheophytin entsteht aber auch aus Chlorophyll unter dem Einfluss schwacher Säuren. Es kann bereits bei der Konservierung von Heu entstehen (DAWSON und HEMINGTON 1974).

Dieses Chlorophyllderivat bildet sich auch im Pansen des Wiederkäuers. Dort wird anschließend Phytansäure abgespalten, wodurch Photoporphyrin (frühere Bezeichnungen: Phylloerythrin, Erythrophyllin) entsteht (DAWSON und HEMINGTON 1974).

Dieses Stoffwechselprodukt des Chlorophylls stellt eine Base dar und ist in der Lage 2 Protonen aufzunehmen (BROSER und LAUTSCH 1951). CLARE (1955) beschreibt das Phylloerythrin als das photosensibilisierende Abbauprodukt des Chlorophyllstoffwechsels. Photoporphyrin wird in gewissen Mengen von der Leber aufgenommen und über die Galle ausgeschieden (FORD und GOPINATH 1974). Einer Hepatopathie oder Störung des Gallenabflusses folgt eine Anreicherung von Phylloerythrin in der Leber, im Blut und schließlich in der Haut. Eine daraus resultierende Photosensibilität wird als eine hepatogene bzw. sekundäre Photosensibilität bezeichnet (STENGELMEIER 2002). Diese ist laut STENGELMEIER (2002) die häufigste Ursache der UV Lichtempfindlichkeit bei Nutztieren und Pferden.

Gelegentlich führen photoreaktive Pigmente (Porphyrine), Abbauprodukte des Hämoglobins, ebenfalls zu einer Photosensibilität (FRANCO 1992).

Die Ausscheidung von Photoporphyrin über die Galle nach Aufnahme von Protonen könnte einen zusätzlichen Weg der Säureausscheidung darstellen.

Wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Hämoglobin wurde ein Einfluss des Chlorophylls auf die Blutbildung untersucht. BÜRGI et al. (1919) vermuteten, dass bei Kaninchen die Bildung von Hämoglobin vom Chlorophyll abhängig sei. Bei einem Fütterungsversuch konnte ein Zusammenhang zwischen Erholungszeit einer Anämie und dem Angebot an Grünfütterung nachgewiesen werden. Allerdings muss bedacht werden, dass zu dieser Zeit noch nicht alle Vitamine bekannt waren, so dass zum Beispiel ein Vitamin der B-Gruppe (höhere Aufnahme oder vermehrte Produktion im Darm bei Grünfütterung) ebenfalls an der besseren Hämatopoese beteiligt gewesen sein könnte. GRIGORIEW (1919) konnte die Ergebnisse von BÜRGI et al. (1919) reproduzieren und wies eine stärkere Wirkung von Pheophytin gegenüber dem Chlorophyll nach.

FULTON (1922) führte umfassende Studien über die Beziehung zwischen Chlorophyll, Hämoglobin und anderen tierischen Pigmenten durch. FULTON glaubte, dass bestimmte Organismen sogar in der Lage seien, Hämoglobin aus Chlorophyll zu synthetisieren und erstellte die Hypothese, dass Hämoglobin aus Chlorophyll in der Evolution entstanden ist.

Bis heute werden derartige Wirkungen von Chlorophyll auf die Blutbildung z.B. bei kranken Kindern mit Thalassemia Major beobachtet (SINGH 2010). SINGH assoziierte die steigende Hämoglobinkonzentration im Blut, die auffallend niedrigeren benötigten Mengen und die zunehmenden Intervallsperioden zwischen Bluttransfusionen während der Behandlung dieser Kinder gegen Thalassemia Major mit der Wirkung von Weizengrastabletten.

GORDONOFF (1927) vermutete, dass Chlorophyll in der Leber und in der Milz gespeichert wird. Bei Einnahme von reinem Chlorophyll konnte ein rot-fluoreszierender Urin beobachtet werden. GORDONOFF (1927) konnte die Chlorophyllresorption im Körper nachweisen und erklärte die Verfärbung des Urins durch die Beimischung eines Metaboliten des Chlorophylls, der dem Hämatoporphyrin sehr ähnlich, aber nicht identisch ist.

III. Publikation

Received: 7 December 2012; accepted: 25 February 2013

Article first published online: 30 MAR 2013

DOI: 10.1111/jpn.12071

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition © 2013 Blackwell Verlag GmbH

Fresh and preserved green fodder modify effects of urinary acidifiers on urine pH of horses

G. Goren, J. Fritz, N. Dillitzer, B. Hipp, E. Kienzle

Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Ludwig-Maximilians-University of Munich

Address for Correspondence

Prof. Dr. Ellen Kienzle

Veterinärwissenschaftliches Department

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Ludwig-Maximilians-Universität München

Schönleutnerstraße 8

85764 Oberschleißheim

Phone + 49 89 2180 78701

Fax +49 89 2180 78702

e-mail: kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Keywords: Acid base balance, green fodder, horse, chlorophyll

Running title: Green fodder and urine pH of horses

Word count 3422

Summary

Hay stabilizes urine pH in horses. It is unknown whether this is an effect of structure or of chemical composition. In the present study 4 ponies (230-384 kg body weight [BW]) were fed 6 different diets with either a structure or a composition similar to hay with and without acidifiers in a cross over experimental design in amounts to maintain body weight with the following main compounds: Fresh grass (GRASS), alfalfa hay (ALF), grass cobs (COBS), grass silage (SIL), straw (STR) or extruded straw (STRe) for 2 to 10 days. Urine pH was measured in all trials, blood pH, blood base excess and bicarbonate as well as mineral balance were determined in GRASS, ALF, STR and STRe. In the trials with straw and extruded straw urine pH decreased significantly (STR control: 7.8 ± 0.23 , acidifier: 5.2 ± 0.38) when acidifiers were added, whereas in all other diets which were based on fresh or preserved green fodder pH did not decrease below 7. Blood pH was similarly affected by diet and acidifiers. Acidifiers had little effect on the preprandial blood pH, only in diet STR there was a significant reduction compared to control. Postprandial blood pH was significantly reduced by acidifiers in all diets. Blood bicarbonate and base excess showed corresponding effects. Faecal and renal mineral excretion and apparent mineral digestibility were not systematically affected by diet or acidifiers except for chloride. Chloride added as inorganic chloride salt had an even better apparent digestibility than chloride originating from feed. Because only green plant material stabilized acid base balance chlorophyll and its metabolites are discussed as potential mediators of the effect of green fodder on acid base balance.

Introduction

Understanding the impact of nutrition on acid base balance is important for all clinical conditions and working situations where acid base balance is affected, or where a shift of acid base status might be beneficial. In cats, dogs and sows it was demonstrated that cation-anion balance (CAB) in the food allows a reasonable estimate of the effect of the diet on acid base balance and especially on urine pH (Kienzle et al. 1991; Behnsen 1992; Dobenecker et al. 1999, Janczikowski 2008). A previous study in horses showed that the type of feed interacts strongly with the effect of CAB (Kienzle et al. 2006). In horses eating rations based mainly on hay there was little effect of a low CAB on urine pH, while in horses eating rations based on oats there was a strong acidifying effect of a low CAB. This was not an effect of large

intestinal acidosis and – as a second study showed - it was unrelated to the Ca/P ratio in hay versus oats (Kienzle et al. 2009). The question remains open whether the effect of hay on acid base balance is related to the structure of hay or to other qualities of hay. An effect of structure might be mediated by differences in the secretion into the gastro-intestinal tract such as in saliva production, or it might be due to differences in the absorption of major minerals. Such differences were postulated by Meyer et al. (1982) and (1992). To test for the effect of structure in the present study hay was partly replaced by straw in one experiment, by an extruded straw product and by grass cobs with a shorter structure in another one. The hypothesis being that in case of an effect of structure the “buffering” quality would be lost in the grass cobs and in case of another effect it might remain unchanged in the grass cobs. We also checked whether fresh grass and grass silage had the same effect as hay. In addition alfalfa hay as botanically different type of hay was tested.

Animals, Materials and Methods

Four adult ponies (230-384 kg BW) were available for the study. All rations were tested at two different CAB levels using a cross-over experimental design. The ration with lower CAB was called “acidifier”, the one with the higher CAB “control”. Ammonium chloride, methionine, and mono calcium phosphate were used to shift CAB. CAB in the food was calculated by the following equation: $CAB \text{ (mmol/kg dry matter [DM])} = 49.9Ca + 82.3Mg + 43.5Na + 25.6K - 59P - 28.2Cl - 62.4S$ (minerals in g/kg DM). All diets were balanced for minerals and vitamins. Ca/P ratio was adjusted between 1:1 and 1.9:1. All diets were fed with small amounts of oats into which mineral food and in case of “acidifiers” the acidifying substances were mixed. Fresh grass (GRASS), grass silage (SIL) and alfalfa hay (ALF) were fed as the only source of roughage. To prevent health and behaviour issues during the experiment small amounts of hay were added to the diets grass cobs (COBS), straw (STR) and extruded straw product (STRe). Table 1 gives the feed intake, table 2 the mineral content in dry matter in the experimental diets. Intake of digestible energy (DE) amounted to $0.39 \pm 0.04 \text{ MJ DE/kg BW}^{0.75}$ in the trial STR, and to $0.55 \pm 0.03 \text{ MJ DE/kg BW}^{0.75}$ in all other trials (Weende feed analysis and calculation of DE by Zeyner and Kienzle, 2002; data not shown). Food was offered in 2 meals (8.00 a.m and 3.00 p.m.). Water was offered free choice. The trials were planned to last for 10 days. During the first 7 days of the experiment urine and faecal pH were measured. In the last three days of the experiment urine and faeces were

collected completely, and frozen at -20°C until analysis. The ponies were kept on a paddock with rubber mats for several hours and urinated when they were allowed to return to their box with saw dust bedding. Urine was then manually collected with a bucket. The rations were not always completely eaten. In case of COBS and SIL all ponies stopped eating the acidified ration after several days. In case of STR the ponies refused to eat all acidifiers. Consequently these were reduced after a few days, resulting in a slightly differing CAB in this trial. One pony did not eat the diet STR after 4 days trial. When the ponies stopped eating the respective experiment was terminated for reasons of animal welfare. For these trials there are only data on urine and faecal pH. We used the measurements of the last day with nearly complete feed intake for evaluation. The last day is then indicated in the tables on the results.

Urine pH was measured with an electric pH-meter immediately after collection. Fresh faeces were diluted with bidistilled water (1:5) and pH was measured 10 minutes after dilution with an electric pH-meter. Buffer curves of urine from the trials GRASS and STR with and without acidifiers were obtained using hydrochloric acid (1N) and sodium hydroxide (1N) to titrate 25ml urine in each case from its starting point to pH 4 and pH 9 adding each time 0,05-0,1ml of the respective solution at room temperature with stirring. Urine pH was measured with an electric pH-meter after each application of hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Aliquot samples of fresh faeces were frozen immediately after collection, weighing and thorough mixing. Faeces were lyophilized and ground for further analysis. For mineral analysis wet digestion of dry feed samples, faecal samples and urine samples was carried out in a microwave digestion unit. Calcium was determined by flame emission spectrography, and phosphorus photometrically with ammonium molybdate and ammonium vanadate in HNO_3 (Gericke and Kurmies 1952). Sulfur was determined by the LUFA Kiel, Germany using Atomic Emission Spectroscopy in feed. Arterial blood samples were taken in all completed trials (grass, alfalfa, straw and treated straw) before and 2 hours after feeding and were immediately analysed for pH, bicarbonate and base excess; Siemens RAPIDLAB® 248. The study was approved by the Regierung von Oberbayern, which is the proper authority according to German laws on animal welfare (Tierschutzgesetz).

Mean and standard deviation of the urine pH, arterial pH, arterial bicarbonate, and arterial base excess on the last day of each experiment were calculated. Comparison of means was

carried out after 1-way ANOVA by the Holm-Sidak method in an all-pair wise multiple-comparison procedure using the software Sigmastat 3.0 (SPSS). Pair-wise comparisons of two groups such as before and after feeding or control versus acidified diet were carried out by paired t-test. A p-value of < 0.05 was considered as significant. Simple linear regression was calculated to describe a relationship between parameters.

Results

In the trials with straw and extruded straw urine pH decreased significantly when acidifiers were added, whereas in all other diets, i.e. in all diets containing green fodder in a fresh or preserved stage there was no significant effect (Table 3). The change of urine pH after addition of acidifiers occurred within 2 or 3 days. Fig. 1 shows the urine pH of one horse in two experiments with acidifiers during adaptation period and trial as an example.

When acidifiers were added to the diet the buffering curves of urine showed much steeper slopes than in the control trials. There was, however, no systematic difference between the slope of the curves from trials with mainly green fodder such as GRASS and from trials with little green fodder, such as STR (fig. 2).

Faecal pH was significantly different between some rations and it was slightly and not systematically affected by the acidifiers in some diets. A mean faecal pH of 6.5 was the lowest value obtained (table 4). Blood pH, bicarbonate and base excess were affected by diet, acidifiers and time of sampling. All postprandial means were significantly lower than the corresponding preprandial means (tables 5, 6, 7). Acidifiers had little effect on the preprandial blood pH, only in diet STR there was a significant reduction compared to control. Postprandial blood pH was significantly reduced by acidifiers in all diets. Blood bicarbonate and base excess showed corresponding effects. Neither renal nor faecal water excretion were systematically affected by acidifiers (data not shown). Faecal calcium excretion was not affected by the addition of acidifiers (data not shown). Figure 3 shows that faecal calcium excretion was closely correlated to Ca intake. Even though calcium intake was similar the excretion was higher in the group GRASS than in the group STRe both including controls. Renal calcium excretion (y ; mg/kg BW^{0.75}) was closely related to calcium intake (fig. 4).

There was no significant effect of the addition of acidifiers, and there was no difference between the diets GRASS and STRe with a similar calcium intake.

Faecal phosphorous excretion was not affected by the addition of phosphorus free acidifiers (groups GRASS, STR, STRe). Faecal phosphorous excretion increased, however, in the diet ALF where mono calcium phosphate was added from 230 ± 12 mg/kg BW^{0.75} in the control group to 331 ± 28 mg/kg BW^{0.75} in the acidified group. This was reflected by an apparent phosphorus digestibility of 22 ± 6 % in the diet ALF with acidifiers compared to an apparent digestibility of -1 ± 6 % in the corresponding control. Apparent P digestibility was similar in the diets STR (-4 ± 13 %), and STRe (5.4 ± 15 %). It was much lower in the group GRASS (-30 ± 12 %). The described differences were significant.

Renal phosphorous excretion was relatively low (range 1-28 mg/kg BW^{0.75}). When all horses and diets were considered there was no significant effect. One horse, however, had a significantly higher renal phosphorous excretion than all others, when a two-way ANOVA with horse and diet as factors was carried out. In this case there were differences between diets and also interactions between diets and horse (data not shown).

Magnesium metabolism (renal and faecal excretion) was not affected by the addition of acidifiers. Therefore, data are not shown. There was no systematic effect of acidifiers on faecal and renal sodium excretion, there were no significant differences between controls and acidified diets (data not shown). Apparent potassium digestibility and renal potassium excretion were not affected by urinary acidifiers (data not shown). Apparent digestibility of chloride was higher in all diets with added ammonium chloride ranging from 97.1 ± 0.48 in diet STRe to 98.7 ± 0.22 in diet GRASS. In the controls apparent chloride digestibility was lowest in GRASS (92.5 ± 2.11) and highest in ALF (95.4 ± 0.58). Renal excretion of chloride was closely correlated to apparently digested chloride ($R^2=0.85$).

Discussion

The present study confirmed previous results, i.e. that the urine pH of horses eating substantial amounts of fresh or preserved green fodder is unlikely to decrease below pH 7,

whereas the urine pH of horses eating any other food as major compound of the diet can be as easily acidified as the urine pH of omni- and carnivorous monogastric species (Kienzle et al. 1991; Behnsen 1992; Dobenecker et al. 1999). When diets based on hay were compared with diets based on oats (Kienzle et al. 2006; Berchtold 2009) caecum acidosis due to microbial starch fermentation in the caecum could not be entirely excluded as the cause for the differences between hay and oats, even though faecal pH did not suggest caecum acidosis in the oats diets. In the own study where straw based diets were compared to green fodder caecum acidosis caused by starch fermentation is highly unlikely.

The effect of green fodder could be due to effects on true digestibility of major minerals, such as a higher apparent calcium and lower apparent phosphorus digestibility, which would alter the CAB of the absorbed anions and cations. In the present study as well as in the previous studies (Stürmer 2005; Berchtold 2009) apparent digestibility of minerals was determined. There was no systematic difference of apparent calcium and phosphorus digestibility between diets with and without green fodder. A two-way ANOVA of all data on apparent calcium and phosphorus digestibility of Stürmer 2005, Berchtold 2009 and the own data with the factors green fodder (yes, no) and acidifiers (yes, no) did not show a significant effect of either green fodder or acidifiers. There was no significant interaction. The same was true for magnesium and potassium. For sodium there was a very low apparent digestibility with diet STR, but only in the control group. Such an effect was not observed in other studies with straw (Schiele 2008; Lindemann 1982; Güldenhaupt 1979; Schmidt 1980; Mundt 1978). The reason is unclear. The low apparent sodium digestibility in the control group is unlikely to have a systematic effect on acid base balance. If the absorption of sodium was very low this would rather have an acidifying effect than other way round. If the apparent sodium digestibility in the control group is lower than in the acidified group then this is more likely to minimize than maximize the differences between control and acidifiers. Apparent digestibility of chloride was high in all trials, it was higher, when chloride originated from added chloride salts such as ammonium chloride. There was, however, no systematic difference between green fodder and other feed. This was true for the own study as well as for the literature (Stürmer 2005, Berchtold 2009). In summary, differences in absorption of major minerals from green fodder or other feed are highly unlikely to be the reason for the effect of green fodder on urine pH.

Another explanation for the different effects of green fodder and other feed on urine pH might simply be the buffering of urine. Titration of urine from the control groups resulted in buffering curves with a broad buffering zone at approximately pH 6. This would be consistent with a carbonate buffer. By contrast when urinary acidifiers were eaten the slope of the buffering curves of urine was steep, indicating low buffering capacity. Presumably the carbonate content of the urine was lower. There was, however, no systematic difference between green fodder and STR or STRe.

This leaves the hypothesis that a component of green fodder which is still present after drying and ensilaging causes the differences between green fodder and other feed. The effect on urine pH might be mediated by the component itself, by microbial metabolites produced in the gastro-intestinal tract or in the intermediary metabolism. Such a compound or metabolite needs to be either alkalizing or buffering in the intermediary metabolism. This hypothesis is strengthened by observations in rabbits eating rations containing either hay or grass meal. Paulus (2010) failed to acidify urine of rabbits eating such rations.

A common denominator of green leaves is chlorophyll. Chlorophyll pigments are converted into phaeophytins by loss of magnesium. This may already occur during feed conservation for example during hay making (Dawson and Hemington 1974). The conversion of chlorophyll into phaeophytin also occurs in the rumen of sheep. In the rumen phaeophytin undergoes further rapid decomposition to phylloerythrin (Dawson and Hemington 1974). Some phylloerythrin is normally absorbed into the portal circulation, removed by the liver and excreted by the bile (Ford und Gopinath 1974). Phylloerythrin is a base and can accept two protons (Broser and Lautsch, 1951). Thus the excretion of phylloerythrin via bile might help the horse to excrete acid, and thus reduce the need for renal acid excretion. To our knowledge there is no scientific literature on the effect of chlorophyll and its metabolites on acid base balance. By contrast popular “natural” medicine accepts as fact that chlorophyll helps to regulate acid base balance (Ulmer 1997). The hypothesis that chlorophyll acts stabilises acid base balance of horses and presumably other monogastric herbivores should be tested in further studies.

References

Behnsen, K., 1992: Einfluss der Fütterung auf pH-Wert und spezifisches Gewicht im Harn des Hundes. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Berchtold, L., 2009: Untersuchungen zum Einfluss der Anionen-Kationen-Bilanz auf den Mineralstoff- und Säure-Basen-Haushalt bei Ponys. Diss. med. vet., LMU, München.

Broser, W.; Lautsch, W., 1951: Über Säure-Base-Gleichgewichte bei Chlorin-e₆-dimethylester-6-säureäthylamid. *Naturwissenschaften*. 38, 209.

Dawson, R.M.C.; Hemington, N., 1974: Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *Brit. J. Nutr.* 32, 327-340.

Dobenecker, B.; Beker, S.; Kienzle, E., 1999: Investigations on the adjustment of urinary pH in sows. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 8, 92.

Gericke, S.; Kurmies, B., 1952: Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 137, 15-22.

Güldenhaupt, V., 1979: Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines Alleinfutters für Pferde in Kombination mit Stroh. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Ford, E.J.; Gopinath, C., 1974: The excretion of phylloerythrin and bilirubin by the horse. *Res. Vet. Sci.* 16, 186-198.

Janczikowski, M (2008): Untersuchungen zur Schwefelbilanz von Hunden bei Supplementierung des Futters mit unterschiedlichen S- Verbindungen (Cystein, CaSO₄, S-Blüte) und S-Gehalten. Hannover, Diss. med. vet.

Kienzle, E.; Schuknecht, A.; Meyer, H., 1991: Influence of food composition on the urine pH in cats. *J. Nutr.* 121, S87-S88.

Kienzle, E.; Stürmer, K.; Ranz, D.; Clauss, M., 2006: A high roughage/concentrate ratio decreases the effect of ammonium chloride on acid-base balance in horses.

J. Nutr. 136, 2048S-2049S.

Kienzle E.; Berchtold L.; Zorn N., 2009: Influence of roughage/concentrate ratio on the effect of urinary acidifiers in ponies is independent of dietary Ca/P ratio.

Proc. Soc. Nutr. Physiol. 18, 41.

Lindemann, G., 1982: Untersuchungen über den Einfluss von Lactose- und Stärkezulagen auf die Verdaulichkeit von NH₃-aufgeschlossenem Stroh beim Pferd.

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Meyer, H.; Schmidt, M.; Lindemann, G.; Muuß, H., 1982: Praecae cale und postileale Verdaulichkeit von Mengen- (Ca, P, Mg) und Spurenelementen (Cu, Zn, Mn) beim Pferd.

Adv. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 13, 61–69.

Meyer, H.; Stadermann, B.; Schnurpel, B.; Nehring, T., 1992: The influence of type of diet (roughage or concentrate) on the plasma level, renal excretion, and apparent digestibility of calcium and magnesium in resting and exercising horses. J. Equine Vet. Sci. 12, 233-239.

Mundt, H.C., 1978: Untersuchungen über die Verdaulichkeit von aufgeschlossenem Stroh beim Pferd. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Paulus, C.; Kamphues, J., 2010: Fütterungseinflüsse auf die Ammoniakfreisetzung aus den Exkrementen von Zwergkaninchen. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Schiele, K., 2008: Einfluss reduzierter Futterzuteilung zweier verschiedener Heuqualitäten auf Passagedauer und Verdaulichkeit bei Ponies. Diss. med. vet., LMU, München.

Schmidt, M., 1980: Untersuchungen über die Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines pelletierten Mischfutters für Pferde in Kombination mit Heu und NH₃-aufgeschlossenem Stroh. Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Stürmer, K., 2005: Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung auf den Säure-Basen-Haushalt bei Ponys. Diss. med. vet., LMU, München.

Ulmer, G.A. 1997: Gesundheitswunder Chlorophyll. Albert Ulmer Verlag.

Zeyner, A.; Kienzle, E., 2002: A Method to Estimate Digestible Energy in Horse Feed. J. Nutr. 132: 1771-1773.

III. Publikation

Table 1: Feed intake in per kg BW^{0.75}

group		CAB mmol/kg DM	main feed g DM/ kg BW ^{0.75}	Hay g DM/ kg BW ^{0.75}	Oat g DM/ kg BW ^{0.75}	NH ₄ Cl g DM/ kg BW ^{0.75}	Methionine g DM/ kg BW ^{0.75}	NaCl g DM/ kg BW ^{0.75}	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ g DM/ kg BW ^{0.75}
GRASS	acidifiers	-174	31.20±1.56	-	4.67±0.23	1.18±0.06	0.39±0.02	-	-
GRASS	control	584	31.20±1.56	-	4.65±0.22	-	-	-	-
ALF	acidifiers	664	48.71±0.11	-	11.77±0.03	0.80±0.00	-	0.23±0.00	0.80±0.00
ALF	control	992	48.71±0.11	-	11.77±0.03	-	-	0.23±0.00	-
STR	acidifiers ¹⁾	-63 to 60	19.34±12.89	9.66±6.44	5.68±3.79	0.36±0.24	0.34±0.23	0.08±0.05	-
STR	control	282	25.70±0.25	12.84±0.11	7.55±0.10	-	-	0.07±0.05	-
STRe	acidifiers	-12	33.40±2.01	16.50±0.14	8.74±1.20	0.85±0.15	0.82±0.15	0.23±0.00	-
STRe	control	470	34.70±0.30	16.50±0.14	9.81±0.09	-	-	0.23±0.00	-

¹⁾ incomplete intake of salts, dose reduction

Table 2: Mineral content in feed in g/kg DM

group		Ca g/kg DM	Mg g/kg DM	P g/kg DM	Na g/kg DM	K g/kg DM	Cl g/kg DM	S g/kg DM
GRASS	acidifiers	5.85	1.97	4.99	1.77	27.56	23.63	7.26
GRASS	control	6.11	2.05	5.21	1.84	28.78	2.70	5.20
ALF	acidifiers	11.91	2.99	6.84	2.04	23.35	13.0	1.48
ALF	control	9.85	2.99	3.65	2.04	23.35	4.39	1.48
STR	acidifiers ¹⁾	3.21±0.17	0.92±0.08	2.83±0.11	1.12±0.08	16.49±0.49	12.72±0.88	3.21±0.27
STR	control	3.20	0.90	2.84	1.09	16.57	6.31	1.27
STRe	acidifiers	4.31	1.13	2.62	2.93	19.38	16.60	5.14
STRe	control	4.43	1.16	2.70	3.01	19.95	6.98	2.12

¹⁾ incomplete intake of salts, dose reduction

III. Publikation

Table 3: Effect of acidifiers on urine pH in horses in relation to diet (last day of experiment)

group	last day of experiment	Acidifiers CAB mmol/kg DM	acidifiers urine pH	Control CAB mmol/kg DM	control urine pH
GRASS	10	-174	7.23±0.17a	584	7.58±0.23a
ALF	10	664	7.4±0.17a	992	7.73±0.22a
COBS	4	-109	7.6±0.4a	662	7.63±0.37a
SIL	2	-4	7.59±0.21a	840	7.91±0.31a
STRe	10	-12	6.81±0.53b	470	7.87±0.3a*
STR ¹⁾	11/4 in 1 horse	-63 to 60	5.2±0.38c	282	7.8±0.25a***

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.001$)

marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

¹⁾ incomplete intake of salts, dose reduction

Table 4: Effect of acidifiers on faecal pH

group	acidifiers		control	
	N	pH	N	pH
GRASS	40	6.7±0.23a	40	6.7±0.24a
ALF	44	7.0±0.23b	44	7.2±0.36b*
COBS	22	6.6±0.26ac	22	6.5±0.24c
SIL	10	6.7±0.32acd	10	6.5±0.17c*
STR	43	6.6±0.26c	50	6.5±0.22c
STRe	44	6.8±0.35d	44	6.8±0.27a

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

*marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, $p < 0.05$)

III. Publikation

Table 5: Effect of acidifiers on arterial blood pH in horses in relation to diet after at least one week of adaptation

diet	acidifiers		control		N
	preprandial	postprandial	preprandial	postprandial	
GRASS	7.42±0.03 ^a	7.39±0.01 ^{ac*}	7.44±0.01 ^a	7.41±0.02 ^a	4
ALF	7.44±0.01 ^a	7.40±0.02 ^{a*}	7.44±0.02 ^a	7.43±0.03 ^a	4
STR	7.37±0.03 ^{b*}	7.36±0.02 ^{bc*}	7.43±0.01 ^a	7.42±0.00 ^a	3
STRe	7.42±0.03 ^a	7.37±0.02 ^{c*}	7.44±0.01 ^a	7.41±0.02 ^a	4

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

*marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, $p < 0.05$)

#Postprandial blood pH significantly lower than preprandial blood pH (paired t-test, $p < 0.05$) in all groups

III. Publikation

Table 6: Effect of acidifiers on bicarbonate concentration in arterial blood in relation to diet after at least one week of adaptation

diet	acidifiers		control		N
	preprandial	postprandial	preprandial	postprandial	
GRASS	28.4±1.85 ^{ad}	23.3±0.39 ^{a*}	28.5±1.5 ^a	26.5±0.97 ^a	4
ALF	30.4±1.71 ^a	28.23±1.94 ^{b*}	32.8±2.2 ^a	30.9±2.09 ^b	4
STR	23.9±1.55 ^{bc*}	21.0±2.87 ^{a*}	29.3±2.5 ^a	27.8±1.6 ^a	3
STRe	26.4±1.95 ^{cd}	23.6±0.9 ^{a*}	30.0±1.75 ^a	27.6±1.58 ^a	4

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

*marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, $p < 0.05$)

Postprandial blood bicarbonate significantly lower than preprandial bicarbonate (paired t-test, $p < 0.05$) in all groups

III. Publikation

Table 7: Effect of acidifiers on base excess in arterial blood in relation to diet after at least one week of adaptation

diet	acidifiers		control		N
	preprandial	postprandial	preprandial	postprandial	
GRASS	3.70±1.49 ^{ac*#}	-1.33±0.31 ^{a*}	3.95±0.74 ^{ac#}	1.98±0.64 ^a	4
ALF	5.28±1.54 ^{a*#}	2.38±1.72 ^{b*}	7.30±1.84 ^b	5.40±2.18 ^b	4
STR	-1.13±1.53 ^{b*}	-4.43±2.49 ^{c*}	4.20±1.76 ^c	2.90±1.18 ^a	3
STRe	1.73±1.29 ^{c*#}	-1.83±0.89 ^{a*}	5.00±1.52 ^{bc#}	2.50±0.86 ^a	4

Statistic Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

*marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, $p < 0.05$)

#marks a significant difference between pre- and postprandial blood base excess (paired t-test, $p < 0.05$)

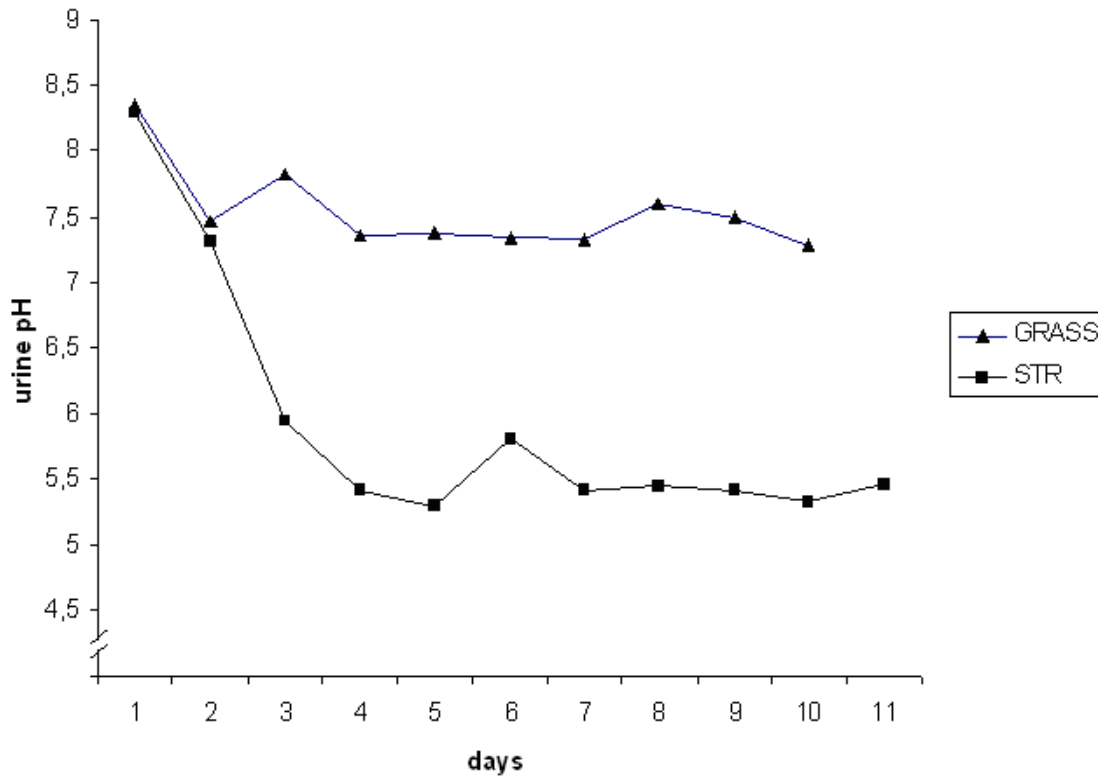


Fig. 1: Changes of urine pH in one horse during adaptation and trial periods with acidifiers in the diets GRASS and STR

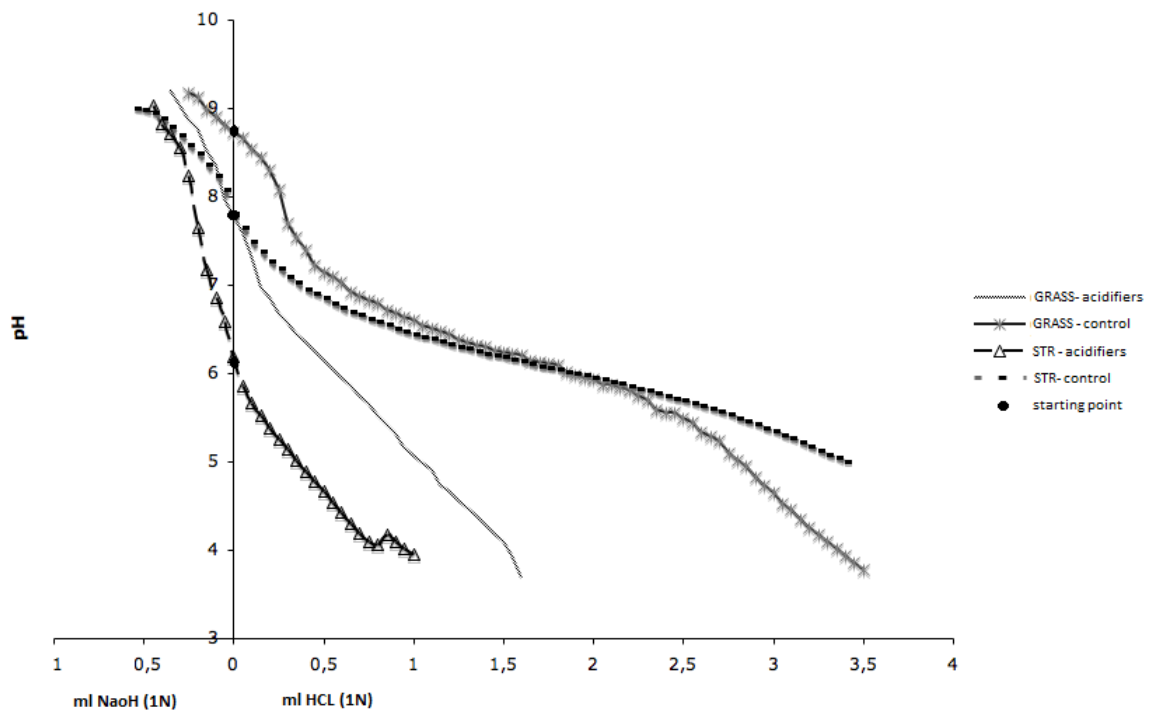


Fig. 2: Buffering curves of individual urine samples from the trials GRASS and STR with and without acidifiers

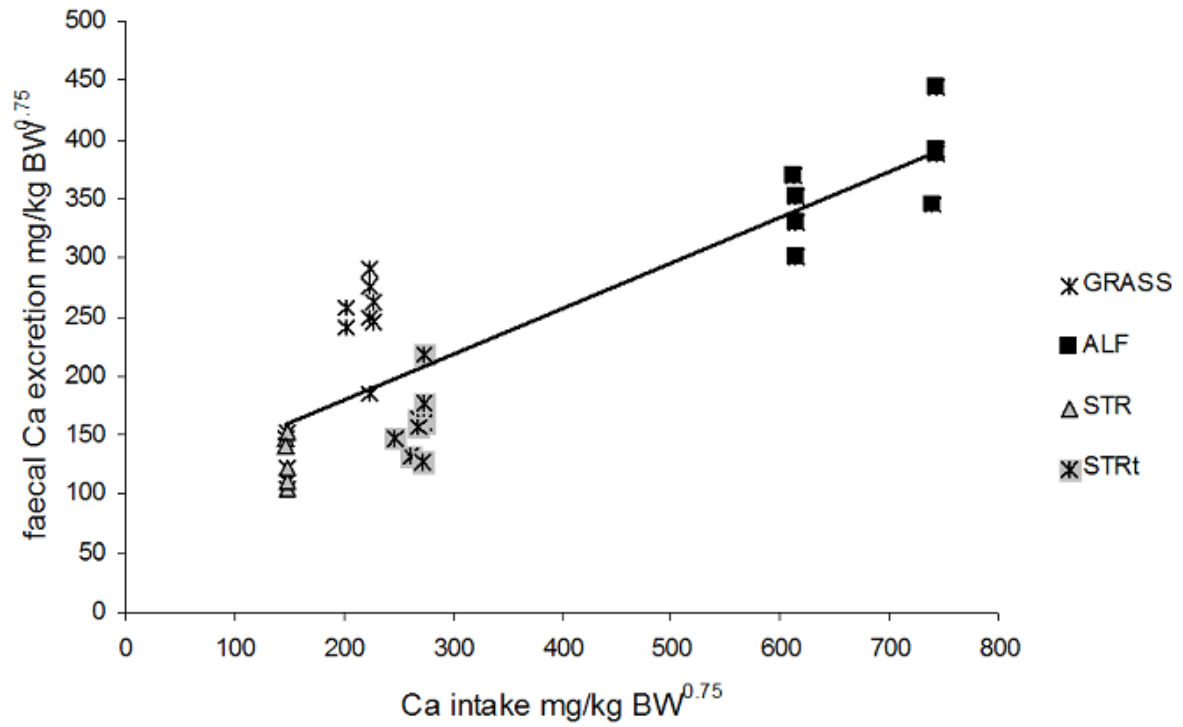


Fig. 3: Relationship between Ca intake (x; mg/kg BW^{0.75}) and faecal excretion (y; mg/kg BW^{0.75}): $y = 101 + 0.39x$; $r^2 = 0.72$; $n = 30$

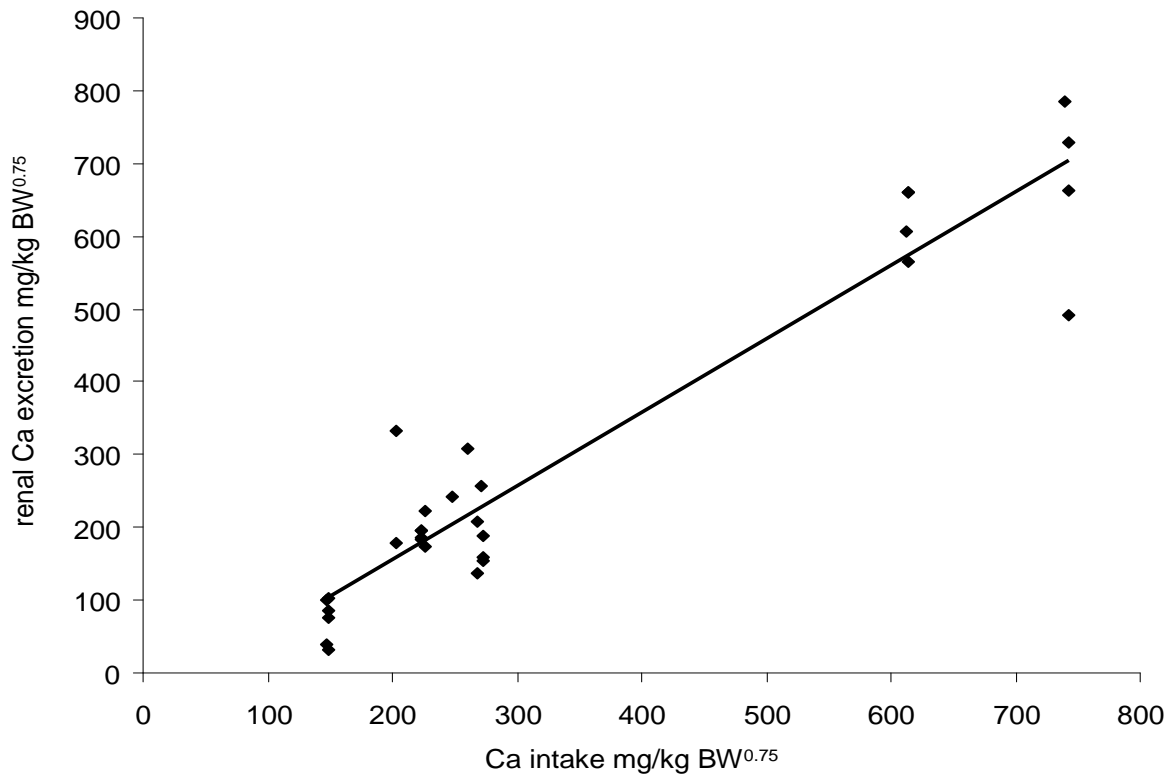


Fig. 4: Relationship between Ca intake (x ; mg/kg BW^{0.75}) and renal excretion (y ; mg/kg BW^{0.75}): $y = -47.0 + 1.01x$; $r^2 = 0.90$; $n=3$

IV. Diskussion

A. Kritik der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde der Urin aus Tierschutzgründen beim spontanen Harnabsatz aufgefangen. Um zu gewährleisten, dass zum Zeitpunkt des Harnabsatzes auch tatsächlich Harn aufgefangen werden kann, wurden die Pferde stundenweise auf Gummimatten gehalten. Auf diesen setzten sie wegen des Spritzeffekts ungern Harn ab. Nach einigen Stunden wurde der Zugang zum eingestreuten Bereich freigegeben. Die Pferde gingen dann in aller Regel in diesen Bereich und setzten Harn ab, der auch vollständig aufgefangen wurde. Diese Methode der Harngewinnung wird am Lehrstuhl seit Jahren praktiziert. Es wurde dabei mehrmals gezeigt, dass die Harngewinnung weitgehend vollständig gelingt (STÜRMER 2005; SCHIELE 2008; BERCHTOLD 2009). Die Messung des Harn-pH-Wertes erfolgte unmittelbar im Anschluss. Wesentliche Veränderungen des pH-Wertes sind dabei unwahrscheinlich. Dieser war selbst in eingefrorenen und wieder aufgetauten Proben noch in derselben Größenordnung wie im frischen Urin.

Die Versuche mit frischem Gras (GRASS), Luzerne (ALF) und extrudiertem Stroh (STRe) konnten entsprechend dem Versuchsplan durchgeführt werden. Bei Stroh (STR) reduzierte ein Pferd die Futteraufnahme. Deshalb wurden die Harnsäurer bei allen Pferden reduziert. Trotzdem fraß das betreffende Pferd seine Ration auch anschließend nicht vollständig und musste deshalb aus dem Versuch genommen werden. Innerhalb der durchgeführten Versuchstage zeigte dieses Pferd bereits eine deutliche Säuerung des Harns. Auch bei Betrachtung der übrigen drei Pferde war eine signifikante Harnsäuerung, zum Teil unter pH 6, erkennbar. Dies zeigt, dass der Effekt bei dem Pferd mit reduzierter Futteraufnahme nicht auf diesen Umstand zurückzuführen sein dürfte. Dagegen spricht auch, dass in dem Versuch mit Silage (SIL), bei dem ebenfalls nicht die ganze Ration gefressen wurde, keine Harnsäuerung auftrat. Dieser Versuch wurde nach zwei bis drei Tagen abgebrochen, weil die Pferde nicht mehr fraßen. Trotz hoher Zulagen an Harnsäurern, die letztlich zur Futtermittelverweigerung führten (auch bei separater Verabreichung mit einer Spritze wurde die Grundration nicht mehr gefressen) kam es hier nicht zu einer Harnansäuerung, sondern zu einem signifikanten Anstieg des pH-Wertes verglichen mit einer vorher gefütterten Heurration. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der Versuchsgruppe (Tag 0 pH $7,25 \pm 0,21$, Tag 2 pH $7,59 \pm 0,21$) ermittelt werden. Dies spricht sehr dagegen, dass bei längerer Fütterung doch noch eine Harnsäuerung eingetreten wäre.

B. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie konnte die Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen (STÜRMER 2005; BERCHTOLD 2009) bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Rationen reich an frischem oder konserviertem Grünfutter der Urin-pH-Wert vom Pferd auch bei Verfütterung stark acidierender Zusätze nicht unter 7 sank. Bildet hingegen ein anderes Futtermittel die Hauptkomponente der Ration, konnte der pH-Wert von Pferdeurin, wie bei anderen Tierspecies, ob Alles- oder Fleischfresser (KIENZLE et al. 1991; BEHNSEN 1992; DOBENECKER et al. 1999), angesäuert werden. In den bisher vorliegenden Studien konnte bei den kraftfutterreichen Rationen mit wenig grünem Pflanzenmaterial nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der stärkere säuernde Effekt der Zulagen mit einer Dickdarmacidose zusammenhing, die bei kraftfutterreichen Rationen leicht entstehen kann. Zwar wurden keine Kot-pH-Werte in einem Bereich gemessen, der auf eine Dickdarmacidose hinweist, jedoch schließt dies wegen der Länge des Verdauungskanals eine solche nicht mit absoluter Sicherheit aus (KIENZLE et al. 2006; BERCHTOLD 2009).

In der eigenen Untersuchung kann bei den Rationen mit Stroh, bei welchen eine Harnsäuerung eintrat, eine Dickdarmacidose als höchst unwahrscheinlich betrachtet werden. Trotzdem trat eine Harnsäuerung ein, wenn Harnsäurer gegeben wurden. Daher muss der Effekt auf anderen Ursachen als einer möglichen subklinischen Dickdarmacidose beruhen.

Der „pH-stabilisierende“ Effekt von grünen Pflanzen könnte in einer unterschiedlichen wahren Verdaulichkeit verschiedener Mengenelemente, wie zum Beispiel einer höheren scheinbaren Calcium- oder einer niedrigeren Phosphorverdaulichkeit begründet sein. Dadurch ergäbe sich eine Verschiebung der KAB der absorbierten Anionen beziehungsweise Kationen. Nach MEYER et al. (1982 und 1992) weisen Calcium und Phosphor aus Raufutter (Heu) und Kraftfutter - auch unabhängig vom Ca/P-Verhältnis - Unterschiede in der scheinbaren Verdaulichkeit auf. Weder STÜRMER (2005) noch BERCHTOLD (2009) noch die eigene Untersuchung konnten solche systematischen Unterschiede eindeutig bestätigen. Eine statistische Auswertung mittels two-way ANOVA der scheinbaren P- und Ca-Verdaulichkeit aus Daten von STÜRMER (2005), BERCHTOLD (2009) und aus den eigenen Daten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Rationen mit, beziehungsweise ohne grüne Pflanzen und zwischen Versuchs- und Kontrollrationen. Eine Wechselwirkung wurde nicht beobachtet. Eine Meta-Analyse von KIENZLE und BURGER (2011) zeigte, dass die wahre

Verdaulichkeit von Calcium unabhängig von Futtermittelarten ist. Der Effekt der Futtermittel auf die scheinbare Verdaulichkeit ist daher möglicherweise vor allem ein Effekt unterschiedlicher Aufnahme von Calcium und Phosphor. Abb. 2 zeigt die eigenen Daten zur Ca-Aufnahme und faecalen Ca-Exkretion im Kontext mit der von KIENZLE und BURGER (2011) aus Schrifttumsdaten errechneten Regressionsgeraden zwischen diesen beiden Parametern.

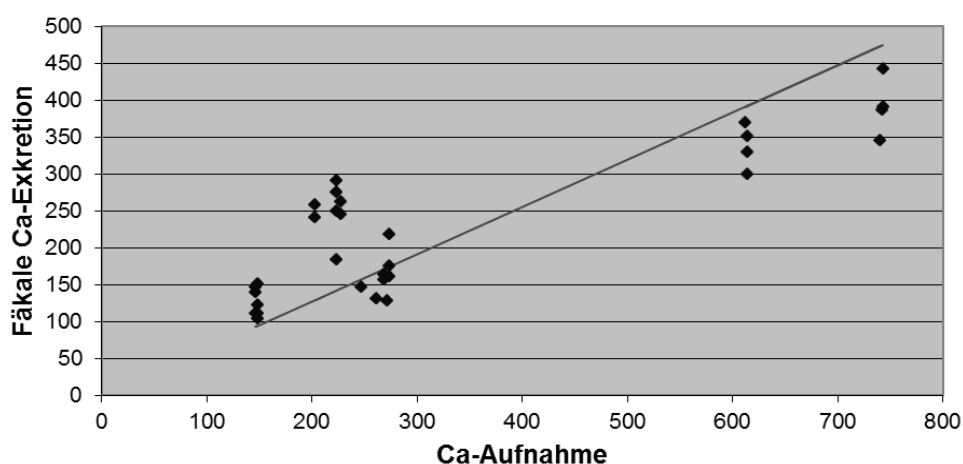


Abb. 2: Relation von Ca-Aufnahme zu faecaler Ca-Exkretion in den eigenen Untersuchungen im Vergleich zu einer entsprechenden Regressionsgeraden aus der Meta-Analyse von KIENZLE und BURGER (2011)

Auch bei der faecalen P-Abgabe gab es zwischen den eigenen Untersuchungen und den nach KIENZLE und BURGER (2011) zu erwartenden Werten keinen systematischen Unterschied. Dies galt auch für Magnesium und Kalium.

Die Strohration zeigte in der Kontrollgruppe eine auffällig niedrige scheinbare Natriumverdaulichkeit; dieses Bild konnte in anderen Studien mit Stroh, welche diese Parameter bestimmten, nicht nachgewiesen werden (SCHIELE 2008; LINDEMANN 1982; GÜLDENHAUPT 1979; SCHMIDT 1980; MUNDT 1978). Die Ursache dieser Abweichung zu anderen Studien bleibt unklar. Wird weniger Natrium absorbiert, so müsste die Ration weniger alkalisierend wirken als aufgrund der KAB anzunehmen ist. Die Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe würde dadurch eher abgeschwächt als verstärkt. Keinesfalls kann dadurch ein Effekt der Harnsäurerer vorgetäuscht worden sein. Die scheinbare Cl-Verdaulichkeit zeigte sich in allen Versuchen hoch, insbesondere wenn Chlorid der Ration zugesetzt wurde (z.B. Ammoniumchlorid).

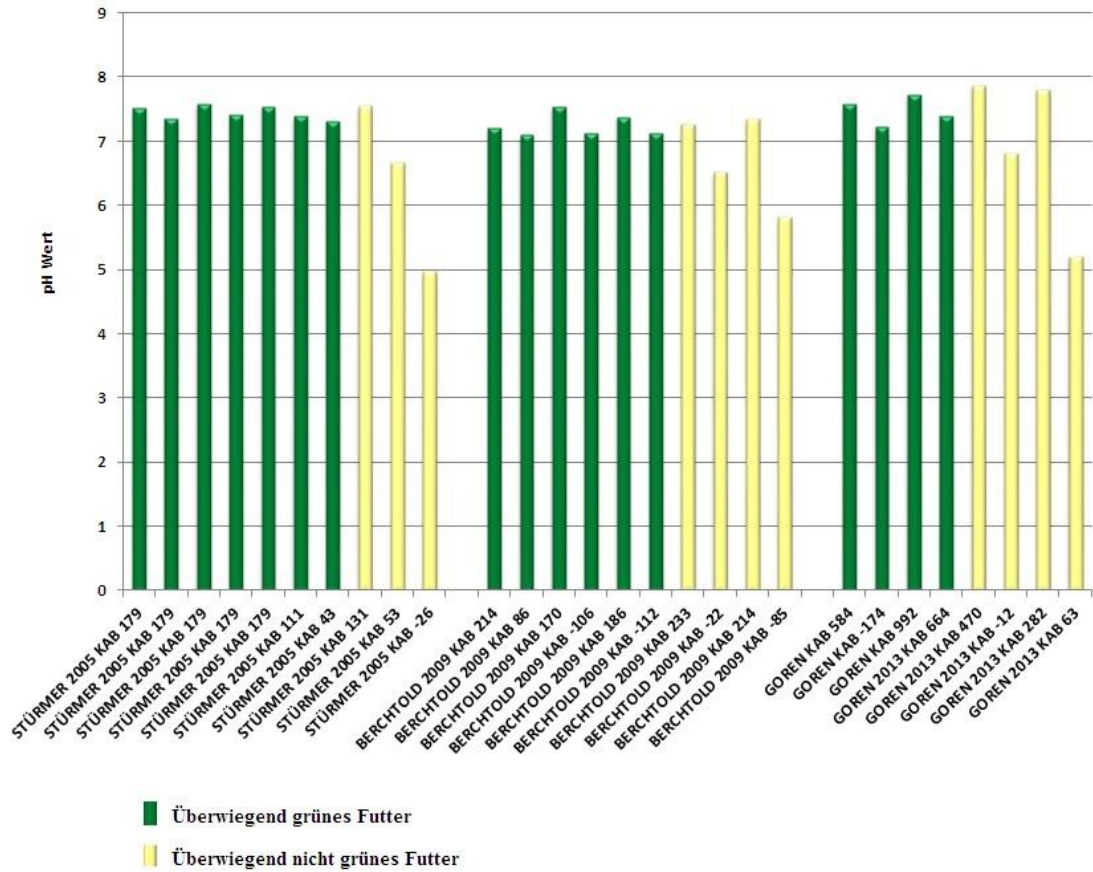


Abb. 3: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zum Harn-pH- Wert von STÜRMER (2005) und BERCHTOLD (2009) sowie der eigenen Studie.

V. Zusammenfassung

In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass bei Pferden, die überwiegend Heu erhielten, eine Ansäuerung des Harns unter einen pH-Wert von 7 auch mit Hilfe von drastischen Harnsäuerern nicht möglich ist. In der vorliegenden Untersuchung sollte überprüft werden, ob dieser Effekt des Heus auf die Struktur oder die chemische Zusammensetzung von Heu zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden Futtermittel, welche entweder eine ähnliche Struktur wie Heu und/oder eine ähnliche Zusammensetzung wie Heu aufweisen mit und ohne Harnsäurer auf ihre Wirkung auf den Harn-pH-Wert und andere Parameter des Säuren-Basen-Haushaltes geprüft. Für die Untersuchungen standen vier Pferde zur Verfügung (230-384 kg). Als Hauptbestandteil der jeweiligen Rationen wurde frisches Gras (GRASS), Luzernenheu (ALF), Grascobs (COBS), Silage (SIL), Stroh (STR) oder extrudiertes Stroh (STRe) gewählt. Um die Aufnahme der Harnsäurer zu gewährleisten wurden geringe Mengen an Hafer zugegeben, außerdem musste aus Gründen des Tierschutzes bei den Rationen STR, STRe und COBS etwas Heu zugegeben werden. Die zugeteilten Futtermengen entsprachen dem Erhaltungsbedarf. Der Versuch verlief nach dem „cross-over“ Modell, jeweils zwei Pferde bildeten eine Gruppe. Der Versuchsgruppe wurden täglich Harnsäurer (Ammoniumchlorid, Methionin, Monocalciumphosphat je nach Zusammensetzung der Ration) verabreicht. Die Kationen-Anionen-Bilanz (KAB) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{KAB (mmol/kg TS)} = 49.9\text{Ca} + 82.3\text{Mg} + 43.5\text{Na} + 25.6\text{K} - 59\text{P} - 28.2\text{Cl} - 62.4\text{S} \text{ (g/kg TS)}$$
. Die KAB ist in Tab. 2 angegeben. Die Rationen wurden je nach Versuchsverlauf 2-10 Tage verfüttert. Die Versuche (COBS) und (SIL) wurden abgebrochen nachdem die Pferde der Versuchsgruppe eine Futterverweigerung zeigten. Im Versuch (STR) wurden die Harnsäurer von den Pferden nicht vollständig aufgenommen. Daraufhin wurde die Harnsäurermenge in diesem Versuch reduziert. Ein Tier verweigerte die Futteraufnahme auch bei reduzierten Mengen an säuernden Zulagen, sodass bei diesem Pferd der Versuch abgebrochen wurde. Harn- und Kot-pH-Wert wurden in allen, auch den verkürzten Versuchen bestimmt. In den übrigen Versuchen wurden außerdem pH-Wert, Blutbicarbonat und der Basenexcess im Blut analysiert sowie Mineralstoffbilanzen durchgeführt.

In allen Versuchsdurchgängen mit erheblichen Anteilen an grünem Pflanzenmaterial konnte der Harn-pH-Wert durch Harnsäurer nicht unter pH 7 gesenkt werden. Bei den Rationen STR und STRe kam es dagegen zu einer hochsignifikanten Reduktion des Harn-pH-Wertes durch Harnsäurer (Tab. 2). Der Kot-pH-Wert wurde durch Harnsäurer nicht systematisch beeinflusst.

Tab. 2: Einfluss von Harnsäurern auf den Harn-pH-Wert des Pferdes bei verschiedenen Rationen (Messungen am letzten Tag des jeweiligen Versuchs)

		Versuchsgruppe	Versuchsgruppe	Kontrolle	Kontrolle
Ration	Letzter Tag	KAB mmol/kg TS	Harn-pH	KAB mmol/kg TS	Harn-pH
GRASS	10	-174	7,23±0,17 ^a	584	7,58±0,23a
ALF	10	664	7,4±0,17 ^a	992	7,73±0,22a
COBS	4	-109	7,6±0,4a	662	7,63±0,37a
SIL	2	-4	7,59±0,21a	840	7,91±0,31a
STRe	10	-12	6,81±0,53b	470	7,87±0,3a*
STR	11/ bei 1 Pferd 4	-63 bis 60	5,2±0,38c	282	7,8±0,25a***

Mittelwerte in einer Spalte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind unterscheiden sich signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, Holm-Sidak-Test, $p < 0,001$)

** kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe (paariger t-Test, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)*

Der Blut-pH-Wert ging postprandial bei allen Rationen zurück, wobei der Rückgang bei den Rationen ohne grünes Pflanzenmaterial besonders ausgeprägt war. Entsprechend verhielten sich Blutbicarbonat und der Basenexcess im Blut (Tab. 3). Die Veränderungen des Blut-pH-Wertes ließen sich praepandial vor der nächsten Morgenmahlzeit nur noch bei STR zeigen. Auch hier verhielten sich Blutbicarbonat und Basenexcess gleichsinnig (Tab. 3).

V. Zusammenfassung

Tab. 3: Einfluss von Harnsäurern auf den Basenexcess in arteriellem Blut des Pferdes bei verschiedenen Rationen nach einer Anfütterungszeit von mindestens 7 Tagen

Ration	Versuchsgruppe		Kontrolle		N
	praeprandial	postprandial	praeprandial	postprandial	
GRASS	3.70±1.49 ^{ac*#}	-1.33±0.31 ^{a*}	3.95±0.74 ^{ac#}	1.98±0.64 ^a	4
ALF	5.28±1.54 ^{a*#}	2.38±1.72 ^{b*}	7.30±1.84 ^b	5.40±2.18 ^b	4
STR	-1.13±1.53 ^{b*}	-4.43±2.49 ^{c*}	4.20±1.76 ^c	2.90±1.18 ^a	3
STRe	1.73±1.29 ^{c*#}	-1.83±0.89 ^{a*}	5.00±1.52 ^{bc#}	2.50±0.86 ^a	4

Mittelwerte in einer Spalte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind unterscheiden sich signifikant (einfaktorielle Varianzanalyse, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

** kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe (paariger t-test, $p < 0.05$)*

kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen prae- und postprandiale Basenexcess-Werte im Blut (paariger t-test, $p < 0.05$)

Die faecale und die renale Ausscheidung sowie die scheinbare Verdaulichkeit der Mineralstoffe wurden weder durch die Art der Ration noch durch die Gabe von Harnsäurern systematisch verändert. Lediglich Chlorid zeigte eine höhere scheinbare Verdaulichkeit, wenn es als Ammoniumchlorid zugegeben wurde als wenn es aus dem Futter stammte.

Als Erklärung der Wirkung von grünem Pflanzenmaterial auf den Säuren-Basen-Haushalt des Pferdes wurde die Hypothese entwickelt, dass Chlorophyll und seine Metaboliten eine starke Pufferwirkung ausüben können und eine Protonenausscheidung über die Galle ermöglichen.

VI. Summary

Previous studies showed that a reduction of urine pH in horses fed with large percentages of hay in their diet is impossible. Urine pH did not decrease below 7, not even after the addition of drastic acidifiers. The present study investigated whether a structural or a chemical quality of hay causes the buffering effect. Feed either similar to hay in structure or in composition were tested with and without acidifiers.

Four adult horses (230-384kg BW) were available for the study. The different types of feed used as a major percentage of the ration were fresh grass (GRASS), alfalfa hay (ALF), grass cobs (COBS), grass silage (SIL), straw (STR) and extruded straw (STRe). Small amounts of oats were used to ensure the intake of the acidifiers. For animal welfare reasons, small amounts of hay were added in the experiments STR, STRe and COBS. All rations were fed for maintenance in a “cross over” design with two horses in each group, one group (experimental group) receiving acidifiers (ammonium chloride, methionine, mono calcium phosphate depending on the composition of the ration) and the other only received the feed without acidifiers (control group). Cation-anion-balance (CAB) in the food was calculated by the following equation: $CAB \text{ (mmol/kg dry matter [DM])} = 49.9Ca + 82.3Mg + 43.5Na + 25.6K - 59P - 28.2Cl - 62.4S$ (minerals in g/kg DM). The CAB is shown in tab. 4. Experiments were conducted for 2-10 days each. The experiments COBS and SIL were terminated after the horses in the experimental group stopped eating. In the case of STR some of the acidifiers were not completely eaten, therefore the amount of acidifiers was reduced. One horse did not eat even after the reduction of acidifiers and therefore it was removed from the experiment.

Urine and faecal pH were measured in all trials. In the trials which were completed blood pH, bicarbonate and base excess analyzed and balances of minerals carried out.

In rations based primarily on green plant material, urine pH could not be reduced below 7. However, in the STR and STRe experiments, acidifiers reduced urine pH considerably (tab. 4).

VI. Summary

Tab. 4: Effect of acidifiers on urine pH in horses in relation to diet
(measurements on last day of experiment)

		acidifiers	acidifiers	control	control
group	last day of experiment	CAB mmol/kg DM	urine pH	CAB mmol/kg DM	urine pH
GRASS	10	-174	7.23±0.17a	584	7.58±0.23a
ALF	10	664	7.4±0.17a	992	7.73±0.22a
COBS	4	-109	7.6±0.4a	662	7.63±0.37a
SIL	2	-4	7.59±0.21a	840	7.91±0.31a
STRe	10	-12	6.81±0.53b	470	7.87±0.3a*
STR	11/4 in 1 horse	-63 to 60	5.2±0.38c	282	7.8±0.25a***

$CAB \text{ (mmol/kg [DM])} = 49.9Ca + 82.3Mg + 43.5Na + 25.6K - 59P - 28.2Cl - 62.4S$ (minerals in g/kg DM)

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.001$)

* marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

Blood pH was influenced by both the type of fodder and the addition of acidifiers. Concentration of blood bicarbonate showed no significant changes in preprandial runs when using acidifiers. Significantly low measurements concerning preprandial blood bicarbonate could only be observed in the STR experiment. Postprandial urine pH was in all groups receiving acidifiers lower than preprandial. Base excess and bicarbonate in blood showed an analogue manner (tab. 5).

VI. Summary

Tab. 5: Effect of acidifiers on base excess in arterial blood in relation to diet after at least one week of adaptation

diet	acidifiers		control		n
	preprandial	postprandial	preprandial	postprandial	
GRASS	3.70±1.49 ^{ac*#}	-1.33±0.31 ^{a*}	3.95±0.74 ^{ac#}	1.98±0.64 ^a	4
ALF	5.28±1.54 ^{a*#}	2.38±1.72 ^{b*}	7.30±1.84 ^b	5.40±2.18 ^b	4
STR	-1.13±1.53 ^{b*}	-4.43±2.49 ^{c*}	4.20±1.76 ^c	2.90±1.18 ^a	3
STRe	1.73±1.29 ^{c*#}	-1.83±0.89 ^{a*}	5.00±1.52 ^{bc#}	2.50±0.86 ^a	4

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$)

** marks a significant difference between acidified diet and control diet (paired t-test, $p < 0.05$)*

marks a significant difference between pre- and postprandial blood base excess (paired t-test, $p < 0.05$)

Neither the type of feed nor the addition of acidifiers had any systematic influence on renal and faecal excretion and on the apparent digestibility of minerals. Only chloride added as inorganic chloride salt had a better apparent digestibility compared to a ration with chloride originating only from feed.

Feeding horses with fresh or preserved green fodder and observing the influences on the acid-base-balance was the cause of developing a hypothesis of the buffering characteristics of chlorophyll and its metabolites in the horse.

VII. Literaturverzeichnis

Arighi, M.; Baird, J. D.; Hulland, T. J., 1984: Equine exertional rhabdomyolysis. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 6.

Baker, L.A.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Teeter, R.G.; Breazile, J.W., 1992: Effect of dietary cation-anion balance on acid-base status in horses. Journal of Equine Veterinary Science, 12: 160-163.

Baker, L.A.; Wall, D.L.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Teeter, R.G.; Breazile, J.E.; Wagner, D.G., 1993: Effect of dietary cation-anion balance on mineral balance in anaerobically exercised and sedentary horses. Journal of Equine Veterinary Science, 13: 557-561.

Baker, L.A.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Teeter, R.G.; Stoecker, B., 1998: The comparison of two forms of sodium and potassium and chloride versus sulfur in the dietary cation-anion difference equation: effects on acid-base status and mineral balance in sedentary horses. Journal of Equine Veterinary Science, 18: 389-395.

Behnsen, K., 1992: Einfluss der Fütterung auf pH-Wert und spezifisches Gewicht im Harn des Hundes. Diss. med. vet., Hannover.

Berchtold, L., 2009: Untersuchungen zum Einfluss der Anionen-Kationen-Bilanz auf den Mineralstoff- und Säure-Basen-Haushalt bei Ponys. Diss. med. vet., München.

Broser, W.; Lautsch, W., 1951: Über Säure-Base-Gleichgewichte bei Chlorin-e₆-dimethylester-6-säureäthylamid. Naturwissenschaften. 38: 209.

Bürgi, E.; Traczewski, C. F. v.; Bass, S.; Braunstein, A.; Fridkiss, S., 1919: Über die biologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Chlorophylls.

Biochem. Zeits., 98: 256-83.

Carlström, B., 1931: Über die Ätiologie und Pathogenese der Kreuzlähme des Pferdes. Skandinavisches Archiv Für Physiologie, 61(1): 161-224.

Clare, N. T., 1955: Photosensitization in animals.

Adv. Vet. Sci, 2: 182-211.

Cooper, S.R.; Kline, K.H.; Foreman, J.H.; Brady, H.A.; Frey, L.P., 1998: Effects of dietary cation-anion balance on pH, electrolytes, and lactate in standardbred horses

Journal of Equine Veterinary Science, 18: 662-666.

Cooper, S.R.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Breazile, J.E.; Geisert, R.D., 2000:

Effect of dietary cation-anion difference on mineral balance, serum osteocalcin concentration and growth in weanling horses.

Journal of Equine Veterinary Science, 20: 39-44.

Dawson, R.M.C.; Hemington, N., 1974: Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen.

British Journal of Nutrition, 32: 327-340.

Dobenecker, B.; Beker, S.; Kienzle, E., 1999: Investigations on the adjustment of urinary pH in sows.

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, 8: 92.

Duesterdieck-Zellmer, K. F., 2007: Equine urolithiasis.

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 23(3): 613-629.

Ford, E.J.; Gopinath, C., 1974: The excretion of phylloerythrin and bilirubin by the horse.

Research in veterinary science, 16: 186-198.

Foreman, J.H., 1996: Metabolic causes of equine exercise intolerance. The Veterinary Clinics of North America: Equine practice, 12: 537-554.

Franco, D. A.; Lin, T. L.; Leder, J. A., 1992: Bovine congenital erythropoietic porphyria. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 14.

Fulton, J. F. Jr., 1922: Animal Chlorophyll: Its Relation to Haemoglobin and to other Animal Pigments.

Contribution from the Bennuda Biological Station for Research, No. 132.

Magdalen College, Oxford.

Gordonoff, T., 1927: Über die pharmakotherapeutische Bedeutung des Chlorophylls.

Research in Experimental Medicine, 54(1): 294-312.

Grigoriew,R., 1919: "Über die Blutbildenden Eigenschaften des Chlorophylls".

Biochem. Zeits., 98: 284-93.

Güldenhaupt, V., 1979: Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines Alleinfutters für Pferde in Kombination mit Stroh.

Diss. med. vet., Hannover.

Hellgren, L. I., 2010: Phytanic acid - an overlooked bioactive fatty acid in dairy fat?

Annals of the New York Academy of Sciences, 1190 (2010): 42-49.

Ignatov, N. V.; Litvin, F. F., 1994: Photoinduced formation of pheophytin/chlorophyll-containing complexes during the greening of plant leaves.

Photosynthesis Research, 42(1): 27-35.

Janczikowski, M., 2008: Untersuchungen zur Schwefelbilanz von Hunden bei Supplementierung des Futters mit unterschiedlichen S- Verbindungen (Cystein, CaSO₄, S-Blüte) und S-Gehalten.

Diss. med. vet., Hannover.

Kienzle, E.; Burger, A., 2011: Übers. Tierernährung. 39, 2: 69-104. DLG Verlag.

Kienzle, E.; Schuknecht, A.; Meyer, H., 1991: Influence of food composition on the urine pH in cats.

The Journal of nutrition, 121: 87-88.

Kienzle, E.; Stürmer, K.; Ranz, D.; Clauss, M., 2006: A high roughage/concentrate ratio decreases the effect of ammonium chloride on acid-base balance in horses.

The Journal of nutrition, 136: 2048-2049.

Klimov, V. V., 2003: Discovery of pheophytin function in the photosynthetic energy conversion as the primary electron acceptor of Photosystem II.

Photosynthesis research, 76 (1-3): 247-53.

Kraft, W.; Dürr, U.M., 2005: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

Schattauer Verlag, Stuttgart, 5. Auflage.

Krohn, U., 1993: Beeinflussung des Säure-Basen-Haushalts von Zuchtsauen durch Futterzusätze.

Diss. med. vet., Hannover.

Latscha, H. P.; Klein, H. A., 1994: Chemie Basiswissen.

Springer Verlag, 514-515.

Lennon, E.J.; Lemann, JR.; Litzow, J.R., 1966: The effects of diet and stool composition on the net external acid balance of mineral subjects.

Journal of Clinical Investigation, 45: 1601-1607.

Lindemann, G., 1982: Untersuchungen über den Einfluss von Lactose- und Stärkezulagen auf die Verdaulichkeit von NH₃-aufgeschlossenem Stroh beim Pferd.

Diss. med. vet., Hannover.

Marek, J.; Wellmann, O., 1932: Die Rachitis, Biochemischer Teil.

Gustav Fischer Verlag, Jena.

McKenzie, E.C.; Valberg, S.J.; Godden, S.M.; Pagan, J.D.; Carlson, G.P.; Macleay, J.M.; Delacorte, F.D., 2002: Plasma and urine electrolyte and mineral concentrations in Thoroughbred horses with recurrent exertional rhabdomyolysis after consumption of diets varying in cation-anion balance.

American journal of veterinary research, 63: 1053-1060.

Meyer, H.; Schmidt, M.; Lindemann, G.; Muuß, H., 1982: Praecaecale und postileale Verdaulichkeit von Mengen- (Ca, P, Mg) und Spurenelementen (Cu, Zn, Mn) beim Pferd. Adv. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 13: 61–69.

Meyer, H.; Stadermann, B.; Schnurpel, B.; Nehring, T., 1992: The influence of type of diet (roughage or concentrate) on the plasma level, renal excretion, and apparent digestibility of calcium and magnesium in resting and exercising horses.

Journal of Equine Veterinary Science, 12: 233-239.

Mueller, R.K.; Cooper, S.R.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Macallister, C.; Carter, S.D., 2001: Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and energy digestibility in sedentary horses fed varying levels and types of starch.

Journal of Equine Veterinary Science, 21: 498-502.

Mundt, H.C., 1978: Untersuchungen über die Verdaulichkeit von aufgeschlossenem Stroh beim Pferd.

Diss. med. vet., Hannover.

Patience, J.F.; Chaplin, R.K., 1997: The relationship among dietary undetermined anion, acid-base balance and nutrient metabolism in swine.

Journal of animal science, 75: 2445-2452.

Popplewell, J.C.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Breazile, J.E., 1993: Effects of dietary cation-anion balance on acid base balance and blood parameters in anaerobically exercised horses.

Journal of Equine Veterinary Science, 13: 552-555.

Remillard, R.L.; Modransky, P.D.; Welker, F.H.; Thatcher, C.D., 1992: Dietary management of cystic calculi in a horse.

Journal of Equine Veterinary Science, 12: 359-363.

Romanowski, K.; Hacke, S.; Vernunft, A.; Kanitz, W.; Kienzle, E.; Fürll, M.; Zeyner, A., 2011: Effects of different doses of oral sodium chloride on acid-base and mineral balance of exercised horses fed a hay-based diet.

Proc. of the 15th ESVCN Congress, 83.

Römpps Chemie Lexikon, Otto-Albrecht Neumüller, 1979, I, 726.

Schiele, K., 2008: Einfluss reduzierter Futterzuteilung zweier verschiedener Heuqualitäten auf Passagedauer und Verdaulichkeit bei Ponies.

Diss. med. vet., München.

Schmidt, M., 1980: Untersuchungen über die Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines pelletierten Mischfutters für Pferde in Kombination mit Heu und NH₃-aufgeschlossenem Stroh.

Diss. med. vet., Hannover.

Schuknecht, A., 1991: Untersuchungen zum Einfluß der Fütterung auf den Harn-pH-Wert und die renale Mineralstoffausscheidung bei der Katze.

Diss. med. vet., Hannover.

Singh, K.; Pannu, M. S.; Singh, P.; Singh, J., 2010: Effect of Wheat Grass Tablets on the Frequency of Blood Transfusions in Thalassemia Major.

The Indian Journal of Pediatrics, 77 (1): 90-91.

Stegelmeier, B. L., 2002: Equine photosensitization.
Clinical Techniques in Equine Practice, 1(2): 81-88.

Stürmer, K., 2005: Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung auf den Säure-Basen-Haushalt bei Ponys.
Diss. med. vet., München.

Stutz, W.A.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Tucker, W.B.; Breazile, J.W.; Wall, D.L., 1992:
Effect of dietary cation-anion balance on blood parameters in exercising horses.
Journal of Equine Veterinary Science, 12: 164-167.

Topliff, D.R.; Kennerly, M.A.; Freeman, D.W., 1989: Changes in urinary and serum calcium and chloride concentrations in exercising horses fed varying cation-anion balances.
Proc. of the 11th Equine Nutr Physiol Symp., 1-2.

Ulmer, G.A., 1997: Gesundheitswunder Chlorophyll.
Albert Ulmer Verlag.

Valberg, S.; Häggendal, J.; Lindholm, A., 1993: Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses to exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis.
Equine Veterinary Journal, 25: 17-22.

Wall, D.L.; Topliff, D.R.; Freeman, D.W.; Wagner, D.G.; Breazile, J.W.; Stutz, W.A., 1992:
Effect of dietary cation-anion balance on urinary mineral excretion in exercised horses.
Journal of Equine Veterinary Science, 12: 168-171.

Zeyner, A.; Romanowski, K.; Müller, A. M.; Vernunft, A.; Kanitz, W.; Wolf, C.; Kienzle, E.; Harris, P., 2008: Effects of different doses of sodium chloride on the acid-base balance of horses.
Proc. of the 12th ESVCN Congress, 29.

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für die engagierte und zuverlässige Betreuung bedanken. Ohne ihren wertvollen akademischen Rat wäre diese Arbeit nicht entstanden. Ich bedanke mich für Ihre wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung, sowie für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik Oberschleißheim, vor allem Frau Dr. Dillitzer und Frau Dr. Fritz für die freundliche und geduldige Einarbeitung in den praktischen Teil dieser Arbeit sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und bereitwillige Beantwortung jeglicher Fragen ihres Fachgebiets. Auch Herrn Christian Overdiek möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Analytik der Proben danken.

Dem gesamten Team von OWF, besonders Gabi Reder, für die schöne Zeit während der Versuche, den Transport und die Lagerung der Futter- und Sammelproben, die Vorbereitung einiger Proben für die Analytik, sowie die tägliche Verpflegung und Versorgung der Pferde. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Bettina Hipp, die mir als Promotionskollegin stets tatkräftig zur Seite stand.

Bei Frau Dr. Julia Mack, Frau Dr. Caroline Schreiber, Herrn Franz Spirk und meiner Frau Antonia Goren für bereitwilliges Korrekturlesen, und nicht zuletzt danke ich besonders herzlich meinen Eltern für die Förderung und Ermöglichung meiner Ausbildung.