

A. Kemmink en N. D. Dijkstra

*Instituut voor Veevoedingsonderzoek, Hoorn*

## De voederopname door grazende herkauwers

I. Chromoxide en polyethyleen als exogene indicatoren en chromogeen als endogene indicator voor de bepaling van de grasopname

with a summary

Feed intake by grazing ruminants

I. Chromic oxide and polyethylene as added faecal markers and chromogen as an endogenous marker for estimating grass intake



1968 *Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie*  
*Wageningen*

413476

© Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, 1968.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

No part of this book may be reproduced or published in any form, by print, photoprint, microfilm or any other means without written permission from the publishers.

# **Inhoud**

<b>1</b>	<b>INLEIDING</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>HET VERTEERBAARHEIDSONDERZOEK</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>HET CHEMISCH ONDERZOEK</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>VERKREGEN RESULTATEN</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>BESPREKING DER RESULTATEN</b>	<b>18</b>
	<b>SAMENVATTING EN CONCLUSIES</b>	<b>20</b>
	<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>22</b>
	<b>LITERATUUR</b>	<b>24</b>

## 1 Inleiding

Om verschillende redenen is het van belang te weten hoeveel gras door weidend vee wordt opgenomen. Tot de veel toegepaste mogelijkheden om de opname vast te stellen behoort de verstreking van een bepaalde hoeveelheid van een onverteerbare referentiestof aan het vee. Hierdoor kan de hoeveelheid geproduceerde mest bepaald worden.

Daarnaast kan de verteerbaarheid van het gras bepaald worden door middel van een van nature in de plant aanwezige indicator, waarvan de verteerbaarheid bekend is. Uit beide gegevens kan vervolgens de hoeveelheid opgenomen gras berekend worden. Van de vele referentiestoffen die gebruikt zijn ten einde de hoeveelheid mest te bepalen, zonder deze kwantitatief te verzamelen (chromoxide, kleurstoffen, titaanoxide, polyethyleenglycol, polyethyleen(plastic)poeder, bariumsulfaat, radioactieve verbindingen etc.) heeft vooral het door H. EDIN in 1918 geïntroduceerde chromoxide ingang gevonden. De laatste jaren is er daarnaast een groeiende belangstelling voor polyethyleenpoeder als indicator merkbaar.

Plastic poeder lijkt meer nog dan  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  te voldoen aan de eisen, die men aan een ideale referentiestof dient te stellen:

1. zij moet de verteringsprocessen niet beïnvloeden;
2. absorptie of retentie in het spijsverteringskanaal mag niet optreden;
3. de referentiestof moet een passagesnelheid hebben, die overeenkomt met die van het voer;
4. de bepaling van de stof in de faeces dient eenvoudig te zijn.

Voor enkele in de jaren 1966, 1967 en 1968 uit te voeren opnameproeven aan het Instituut voor Veevoedingsonderzoek 'Hoorn', was het noodzakelijk een keus te maken uit de mogelijke exogene en endogene indicatoren. Om dit verantwoord te kunnen doen, zijn enkele verteringsproeven met hamels genomen. Dit onderzoek is - om de hiervoor aangegeven redenen - in de eerste plaats op het polyethyleen toegespitst, terwijl in één proef ook aan het  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  aandacht is besteed.

In de eerste proef ontvingen drie hamels een mengsel van grasmael en polyethyleenpoeder. Van het grasmael was in een voorafgaande proef de verteerbaarheid bepaald. In de tweede proef werd gewerkt met twee fistelhamels, die naast gras van bekende verteerbaarheid, polyethyleenpoeder en chromoxide ontvingen. In deze proef is bovendien nagegaan of de in het gras aanwezige chromogenen gebruikt kunnen worden als endogene indicator voor de bepaling van de verteerbaarheid van het gras.

## 2 Het verteerbaarheidsonderzoek

### a. De verteringsproeven in 1966

In dit jaar werd met een drietal hamels - K, L en M - een tweetal verteringsproeven met grasmael genomen. In de eerste proef (V 773) ontvingen twee hamels (K en L) 1,200 kg grasmael per dag, terwijl het derde dier, hamel M, 1,000 kg van dit meel ontving. In de tweede proef (V 775) werd naast dezelfde hoeveelheden grasmael 50 gram polyethyleenpoeder per dier per dag verstrekt.<sup>1</sup>

De verteringsproeven bestonden uit een voorperiode van 8 dagen, gevolgd door een hoofdperiode van 10 dagen. In deze hoofdperiode werd de mest kwantitatief verzameld, terwijl in de proef waarin polyethyleen aan het grasmael was toegevoegd de mest ook in de voorperiode en gedurende 5 dagen na het beëindigen van de hoofdperiode kwantitatief verzameld werd.

In de proef met het grasmael zonder meer, werd een mengmonster van deze mest samengesteld uit gelijke percentages van de dagelijks verzamelde hoeveelheden. Dit monster werd, evenals dat van het grasmael, geanalyseerd op het gehalte aan droge stof, ruw eiwit, ruwe celstof, ruwe as en werkelijk eiwit. De mest van de hamels gevoerd met grasmael, waaraan polyethyleenpoeder was toegevoegd, werd in de voorperiode, in de hoofdperiode, alsook gedurende een vijftal dagen in de naperiode dagelijks geanalyseerd op het gehalte aan droge stof en plastic. Daarnaast werd wederom een mengmonster samengesteld van de monsters uit de hoofdperiode, dat op dezelfde wijze geanalyseerd werd als het mengmonster in de proef met uitsluitend grasmael, terwijl hierin bovendien het plasticgehalte bepaald werd.

### b. De verteringsproeven in 1967

In de tweede serie verteringsproeven werd naast de hamels L en M gebruik gemaakt van twee fistelhamels (Q en R). Op deze wijze was het mogelijk met beide normale hamels een verteringsproef met gras inplaats van met grasmael te nemen en de fisteldieren naast het gras, polyethyleenpoeder en chromoxide te verstrekken.

Grasmael kan gemakkelijk met polyethyleenpoeder en water tot een pap worden

<sup>1</sup> Het betreft hier het z.g. 'Microthene Polyethylene Powder - M(N) 710', met een s.g. van ca. 0,85, vervaardigd door U.S. Industrial Chemical Company. In Nederland wordt dit poeder geïmporteerd door 'Internatio' N.V. te Rotterdam.

gemengd, die door de hamels kwantitatief opgenomen wordt, de verstrekking van gras met plasticpoeder en chroomoxide is echter veel moeilijker en kan veruit het beste bij fistelhamels geschieden, waarbij de beide referentiestoffen in gelatine-capsules ('capsulae operculatae') via de fistel aan het dier worden toegediend.

Bij de bepaling van de verteerbaarheid van het verse (diepgevroren) gras ontvingen de hamels L en M hiervan 6,000 kg per dier per dag (V 814). De fistelhamels Q en R kregen dezelfde hoeveelheid gras en daarnaast via de fistel 8 gram polyethyleenpoeder en 8 gram chroomoxidepapierstrookjes<sup>2</sup> (hetgeen overeenkomt met ongeveer 2,5 gram Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) per dag (V 813). Ten opzichte van de hoeveelheid polyethyleenpoeder, die in 1966 werd verstrekt (50 gram per dier per dag) is er sprake van een sterke daling van de gift in 1967. Dit werd gedaan om een gehalte in de mest te vinden dat meer zou overeenstemmen met het gehalte, dat in de mest van fistelkoeien wordt gevonden, wanneer deze dieren 45 gram per dag aan polyethyleenpoeder ontvangen. Uit praktische overwegingen stuit nl. de verstrekking van meer dan 45 gram polyethyleenpoeder aan fistelkoeien (6 capsules van 7,5 gram) op bezwaren.

Evenals in 1966 bestonden de verteringsproeven uit een periode van 18 dagen, waarvan gedurende de laatste 10 dagen de mest kwantitatief verzameld werd. In het geval van het onderzoek naar de verteerbaarheid van het verse gras, werd een monster van het gras en een mengmonster van de uitgescheiden mest op het gehalte aan droge stof, ruw eiwit, ruwe celstof, ruwe as en werkelijk eiwit onderzocht. Bij het verteerbaarheidsonderzoek van het gras waaraan via een fistel polyethyleen en chroomoxide was toegevoegd, werden het mengmonster en de dagmonsters van de mest op dezelfde bestanddelen geanalyseerd, alsmede op het gehalte aan polyethyleenpoeder, chroomoxide en chromogenen, terwijl in dit geval ook in het verse gras het gehalte aan chromogenen werd bepaald.

<sup>2</sup> Dit papier ('shredded paper') was afkomstig van J. L. Corbett van het Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeenshire, Schotland (tegenwoordig van de University of New England, Armidale, New South Wales, Australië).

Wij mogen aannemen, dat dit papier uit gebleekte houtpulp, aluminiumsulfaat en Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bestaat (CORBETT e.a., 1958b). De oxidedeeltjes hechten zich onder invloed van het aluminiumsulfaat aan de celuloosevezels van het papier. Ook na een gedeeltelijke vertering van deze vezels, bleek een groot gedeelte van het oxide aan de vezels gebonden te zijn. Het passagepatroon van dit papier zou veel overeenkomst vertonen met dat van het voeder in het spijsverteringskanaal.

### 3 Het chemisch onderzoek

#### a. De bepaling van polyethyleen

Voor de bepaling van het gehalte aan polyethyleen in de mestmonsters van de verteringsproef V 775 werd in eerste aanleg een methode, beschreven door CHANDLER e.a. (1964), toegepast. De vrij hoge blankowaarden, welke deze analyse-techniek opleverde bij toepassing op plastic-vrije mestmonsters (ca. 0,20 %) vormden in deze verteringsproef geen groot bezwaar, aangezien de hoeveelheid verstrekt polyethyleenpoeder dusdanig groot was, dat in de droge mest gehalten van ca. 10 % werden gevonden. Zoals reeds vermeld werd in 1967 de hoeveelheid polyethyleenpoeder, die de dieren in de verteringsproef met gras (V 813) ontvingen, sterk verminderd. Hierdoor nam de betekenis van de gevonden blankowaarden belangrijk toe. Hetzelfde geldt voor de proefnemingen met grazend vee - waarvoor dit inleidend onderzoek werd opgezet en waarover later gerapporteerd zal worden - waarbij in de droge mest gehalten van slechts ca. 1,5 % polyethyleen gevonden werden.

Om deze reden hebben wij de methode van CHANDLER e.a. dusdanig gewijzigd, dat de blankowaarden beneden 0,1 % daalden, terwijl de reproduceerbaarheid hierdoor zeker niet minder werd. Een bijkomend voordeel is, dat de werkwijze tevens nog enigszins versneld werd. Het gewijzigde werkvoorschrift luidt nu als volgt:

#### Polyethyleen in mest

##### *Reagentia en hulpstoffen*

HNO<sub>3</sub> gec., technisch

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gec., technisch

chloroform

aceton

##### *Toestellen en hulpmiddelen*

balans, gevoeligheid 0,1 mg

elektrisch verwarmde en goed geventileerde droogstoof, met automatische temperatuurregeling

moffeloven, goed geventileerd, met automatische temperatuurregeling

exsiccator, met kraan in het deksel, gevuld met blauwgekleurd silicagel

waterbad

bekerglazen, 250 ml, met bijpassende horlogeglazen

scheitrechters, 250 ml, model Gilson (kraan onderin)

maatcilinders, 10 ml

maatcilinders, 25 ml  
afzuigkolven, met passende afzuiging  
porseleinen filterkroesjes, Weta 1A2 of 2A2

#### *Werkwijze*

Weeg in een bekersglas van 250 ml, nauwkeurig 2 g van de luchtdroge en gemalen mest (deeltjesgrootte < 1 mm) af. Voeg 25 ml HNO<sub>3</sub> gec., en 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gec., toe. Plaats het bekersglas, afgedekt met een horlogeglas, gedurende 2 uur op een kokend waterbad. Breng de inhoud kwantitatief over in een scheidrecther van 250 ml. Na een half uur staan, wordt de vloeistof in porties afgelaten: eerst van ca. 20 ml, daarna steeds kleinere porties. Giet 25 ml chloroform in de scheidrecther en schud even. Laat de chloroform af en herhaal deze handeling met nogmaals 25 ml chloroform.

Spoel de polyethyleendeeltjes met aceton uit de scheidrecther in een porseleinen filterkroesje. Zuig goed af.

Droog het kroesje met inhoud gedurende 1 uur bij 105°C. Laat het kroesje daarna 3/4 uur afkoelen in een exsiccator en weeg. Gloei vervolgens het kroesje gedurende 1/2 uur bij 600°C. Laat het kroesje 1 uur in een exsiccator afkoelen en weeg weer.

#### *Berekening*

$$\% \text{ plastic} = \frac{(D-G) \times 100}{p}$$

waarin:

D = gewicht porseleinen kroesje + plastic na drogen in g

G = gewicht porseleinen kroesje + plastic na gloeien in g

p = afgewogen hoeveelheid stof in g

Zoals uit tabel 4 blijkt werd in 1966 met deze aan dit Instituut ontwikkelde methode als gemiddelde van de 3 hamels 99,9 % van het polyethyleen teruggevonden tegenover 102,2 % met de methode van CHANDLER e.a.

De tendens om met deze methode een weinig meer dan 100 % van het verstrekte polyethyleen terug te vinden, treffen wij eveneens in de onderzoeken van CHANDLER e.a. (1966) en van KNAPKA e.a. (1967) aan, die respectievelijk 103 en 103,2 % terugvonden. Overigens vereisen beide analysemethodieken een belangrijke mate van vaardigheid, opdat een goede reproduceerbaarheid verkregen wordt.

Bij een gehalte van 1,38 % polyethyleen in de droge mest van een koe werd met de methode 'Hoorn', wanneer driemaal een serie van 8 monsters geanalyseerd werd, binnen één serie standaardafwijkingen voor een enkelvoudige bepaling van 0,01, 0,03 en 0,03 % gevonden. Voor het totaal van de 24 analyses vonden wij een standaardafwijking van 0,06. Voor schapenmest met een gehalte van 3,10 % in de droge stof waren de standaardafwijkingen binnen één serie respectievelijk 0,03, 0,05 en 0,05, terwijl voor alle 24 analyses hier 0,09 berekend werd.

#### **b. De bepaling van chromoxide**

Door het grote aantal analysemethoden, dat voor de bepaling van dit oxide ontwikkeld is, wordt een vergelijking van de resultaten van de vele onderzoeken, die met chromoxide als referentiestof zijn uitgevoerd, bemoeilijkt. Zo kan het



chromoxide titrimetrisch bepaald worden, nadat de mest langs natte weg gedestruëerd is. Voorbeelden hiervan zijn de methoden van COUP en LANCASTER (1952) en van PAAR en HAWKINS (1963).

Het is echter ook mogelijk droog te destrueren (verassen) om daarna hetzij direct hetzij indirect het chroom titrimetrisch te bepalen (MAUNSELL, 1944; BARNICOAT, 1945; GEHRKE e.a., 1950; KANE e.a., 1950; CHRISTIAN en COUP, 1954; PIATKOWSKI e.a., 1962). In het algemeen zijn deze titrimetrische methoden te omslachtig en vereisen zij een niet geringe vaardigheid in het uitvoeren van de analyse, alvorens reproduceerbare waarden gevonden worden. Uit deze overwegingen hebben wij onze aandacht geconcentreerd op spectrofotometrische methoden, welke meestal sneller en eenvoudiger uit te voeren zijn.

Een enkele onderzoeker ontsluit het te analyseren materiaal door verassen gevolgd door een natte destructie (STEVENSON en DE LANGEN, 1960; DEINUM e.a., 1962), anderen laten een spectrofotometrische bepaling van het chroom, meestal in de vorm van bichromaat, voorafgaan door uitsluitend een natte ontsluiting (BOLIN e.a., 1952; DAY, 1954; KIMURA en MILLER, 1957; HILL en ANDERSON 1958; CZARNOCKI e.a., 1961; CLARCKSON, 1967). Eén der bij de destructie gebruikte zuren is in de meeste gevallen perchloorzuur, een zuur waarmee wij bij voorkeur niet werken in verband met het explosiegevaar, wat hieraan verbonden is. Daar voorts een droge destructie minder arbeidsintensief is, kwam ons een spectrofotometrische methode voorafgegaan door een verassing van het te onderzoeken materiaal als het meest verkieslijk voor. Reeds in 1935 gaven PALOHEIMO en PALOHEIMO (1935) een methode aan, die als model gediend heeft voor door anderen gepubliceerde methodieken (SCHÜRCH e.a., 1950; DANSKY en HILL, 1952; SCHÜRCH, 1952; SCHÜRCH e.a., 1954; BRISSON, 1956). De methoden van DANSKY en HILL (1952) en SCHÜRCH e.a. (1954) vertonen weinig of geen verschil. SCHÜRCH e.a. werkten echter met geconcentreerdere oplossingen, waardoor zij geen rechtlijnig verband tussen de optische dichtheid en de concentratie (wet van Lambert-Beer) vonden, terwijl DANSKY en HILL in een gebied van 0-14 mg  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ /l werkten, waar de wet van Lambert-Beer wel geldt. Wij besloten de methode DANSKY en HILL te volgen, omdat, naast het voordeel van het gesignaleerde rechtlijnige verband, een eerste onderzoek leerde dat zowel de door ons gevonden absorptiecurve (met een maximum bij 370 NM) als de ijkcurve van natriumchromaat volledig met die van hen overeenstemden.

Minder juist leek het ons om de ijkcurve van natriumchromaat zonder meer ook voor chromoxidehoudende mest te gebruiken, aangezien een zekere invloed van deze mest op de ijklijn niet denkbeeldig is. Inderdaad vonden wij tussen de ijklijnen van natriumchromaat als zodanig en mest waaraan bekende hoeveelheden chromoxidepapier (in deze vorm werd het chromoxide ook aan de dieren verstrekt) waren toegevoegd en die volgens de methode DANSKY en HILL waren omgezet in natriumchromaat, een klein verschil. Dit verschil is echter van zeer geringe betekenis. Dat wij chromoxidepapier aan mest toevoegden, vond zijn oorzaak niet uitsluitend in de vorm waarin het chromoxide aan de dieren werd

verstrekt, maar ook in de kleine verschillen, die gevonden werden tussen de ijklijnen van mest waaraan bichromaat, chroomoxide of chroomoxidepapier werd toegevoegd. Het gehalte aan chroomoxide van de papierstrookjes werd bepaald volgens de methode CHRISTIAN en COUP (1954).

Hierbij is van belang te vermelden dat het droge-stofgehalte van de papierstrookjes wisselt, zodat steeds de gevonden gehalten op de droge stof omgerekend dienen te worden. (Bij de verstrekking aan het dier is met deze fluctuaties moeilijk rekening te houden, wat één van de nadelen van de chroomoxidepapiermethode is.)

Als gemiddelde van 15 bepalingen werd door ons gevonden  $32,60\% \pm 0,10$ , berekend op het droge papier. Voor de ijklijn vonden wij:

$$y = 0,4038 x - 2,424$$

waarin:

$$y = \gamma \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ per 25 ml}$$

$$x = \text{extinctie} \times 1000$$

Als werkvoorschrift gebruikten wij het hierna volgende:

#### Chroomoxide in faeces

#### *Reagentia en hulpstoffen*

natriumperoxide

#### *Toestellen en hulpmiddelen*

balans met een gevoeligheid van 0,1 mg

nikkelen kroezen,  $\varnothing$  60 mm, inhoud 130 ml

moffeloven, goed geventileerd, met automatische temperatuurregeling

bekerglazen, 400 ml

vouwfilters,  $\varnothing$  15 cm (b.v. Schleicher en Schüll, nr. 597<sup>1/2</sup>)

maatkolven, 250 ml

geijkte volpipet, 1 ml

maatkolfjes, 25 ml

spectrofotometer met bijpassende cuvetten (b.v. Optica CF<sub>4</sub>)

#### *Werkwijze*

Weeg in een nikkelen kroes nauwkeurig ongeveer 3 g van de luchtdroge en gemalen mest (deeltjesgrootte  $< 1$  mm) af. Veras gedurende ca.  $1\frac{1}{2}$  uur in een moffeloven bij  $600^\circ\text{C}$ . Verdeel na afkoelen ongeveer 3 g  $\text{Na}_2\text{O}_2$  gelijkmatig over de as en smelt ongeveer 15 min. bij  $600^\circ\text{C}$ . Zorg ervoor, dat alle asdeeltjes met de vloeibare laag samensmelten. Plaats de kroes na afkoelen in een bekersglas van 400 ml en los de inhoud van de kroes in heet ged. water op. Filtreer door een vouwfilter in een maatkolf van 250 ml. Was het filter goed uit, koel af, vul aan en meng. Pipetteer 1 ml in een maatkolfje van 25 ml, vul aan met ged. water en meng. Meet de kleur t.o.v. ged. water op de Optica-spectrofotometer bij 370 NM met behulp van de waterstoflamp.

#### *Berekening*

Bereken het gehalte aan  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (c) in mgram per gram uit de formule:

$$c = \frac{y}{4 p}$$

waarin:

$y = \gamma \text{ Cr}_2\text{O}_3$  per 25 ml van de gemeten vloeistof \*

$p =$  afgewogen hoeveelheid stof in g

\* (te berekenen uit de formule:  $y = 0,4038 x - 2,424$ , waarin  $x =$  gevonden extinctie  $\times 1000$ )

### c. De bepaling van chromogenen

Het zijn REID en zijn medewerkers geweest, die voor het eerst op de chromogenen, als mogelijke endogene indicatorstoffen voor de bepaling van de verhouding: opgenomen voer - uitgescheiden mest, hebben gewezen (REID e.a., 1950). Het door hen ontwikkelde voorschrift voor de bepaling van deze stoffen is vrij eenvoudig en leverde in hun onderzoekingen gunstige resultaten op. Het zijn in eerste instantie IRVIN e.a. (1953), gevolgd door DEIJS en BOSMAN (1954, 1955), die terecht de methode van REID e.a. bekritisieren. REID e.a. immers extraheerden de chromogenen uit gras en mest met 85 %-ige aceton en maten de optische dichtheid van deze extracten bij 406 NM, zonder er rekening mee te houden dat de extracten van gras en mest verschillende kleurstoffen bevatten, die hun absorptiemaxima niet in alle gevallen bij dezelfde golflengte vertonen. De verschillen in kleurstoffen ontstaan, wanneer tijdens het verteringsproces o.m. chlorofyl in feofytine wordt omgezet. De gedachte van IRVIN e.a., door DEIJS en BOSMAN in samenwerking met medewerkers van dit Instituut verder uitgewerkt, was om de extracten dusdanig te behandelen dat al het chlorofyl in feofytine wordt omgezet, waardoor de invloed van het verteringsproces gecompenseerd zou worden en steeds bij één golflengte gemeten zou kunnen worden. Voor deze behandeling werd oxaalzuur gekozen, waarvan bekend is, dat dit chlorofyl gemakkelijk in feofytine omzet. De door ons in het onderhavige onderzoek gebruikte methode is op deze modificatie van de methode REID e.a. gebaseerd en vertoont grote overeenkomst met de door DEIJS en BOSMAN (1954, 1956) gepubliceerde methode.

Bij het oriënterend onderzoek, dat aan het opstellen van een werkvoorschrift vooraf ging, is ons gebleken dat de stelling van KENNEDY e.a. (1959), al zou er weinig verschil bestaan tussen de concentratie aan chromogeen wanneer deze bij 415 NM of bij 406 NM bepaald werd, en dat toevoeging van oxaalzuur geen voordeel zou opleveren bij het meten bij 415 NM, zeker niet bevestigd kon worden.

De ervaring van LANCASTER en BARTRUM (1953b) dat de optische dichtheid van acetoneextracten oploopt, indien deze in het donker bewaard worden, werd ook door ons opgedaan. Het meten dient daarom niet al te lang na de extractie plaats te vinden. Licht heeft steeds een ongunstige uitwerking en dient dan ook bij de uitvoering van de analyse zoveel mogelijk buitengesloten te worden. De verse mest kan overigens zonder noemenswaardig bezwaar gedurende enkele weken in een koelkast bewaard worden: wij vonden geen invloed op de concentratie van het chromogeen door dit bewaren. Het onderzoek heeft tenslotte volgens onderstaand voorschrift plaatsgevonden:

## Chromogenen in gewas en faeces

### Reagentia en hulpstoffen

aceton, 85 %, 3,78 g oxaalzuur (2H<sub>2</sub>O) per liter bevattend

### Toestellen en hulpmiddelen

balans met een gevoeligheid van 0,1 mg

homogenisator, 30.000 toeren per minuut met bijpassende mengbekers van 150 ml

büchnertrechters, ø 9 cm

afzuigkolven, 1 liter, bekleed met zwart papier

maatkolven, 1 liter

rondfilters, ø 9 cm (b.v. Schleicher en Schüll 589<sup>o</sup>)

bekerglaasjes, 100 ml

waterstraalluchtpomp

spectrofotometer met bijpassende cuvetten (b.v. Optica CF<sub>4</sub>)

### Werkwijze

Weeg nauwkeurig ongeveer 2 g tot een deeltjesgrootte van ca. 3 cm gehakseld vers gras of 0,8 g verse mest in een bekglaasje van 100 ml af. Breng dit met ca. 50 ml 85 %-ige, oxaalzuurhoudende, aceton over in een mengbeker van 150 ml en roer gedurende 3 min. bij 30.000 t/min. Filtreer door een rondfilter in een tegen het licht beschermde afzuigkolf, waarbij voorzichtig wordt afgezogen. Breng filter met residu terug in de mengbeker, voeg ± 50 ml aceton toe en meng wederom 3 min. bij 30.000 t/min.

Filtreer op dezelfde wijze af, was uit met 85 %-ige aceton en breng het filtraat kwantitatief over in een maatkolf van 1 liter. Vul aan, meng en meet op de Optica CF<sub>4</sub> spectrofotometer bij 412 NM t.o.v. 85 %-ige oxaalzuurhoudende aceton. In het geval van mest, wordt voor de meting 25 ml extract met 85 %-ige aceton tot 100 ml verdund.

### Berekening

Bereken de concentratie van chromogenen (c) uitgedrukt als de optische dichtheid, veroorzaakt door 1 g droge stof, wanneer deze geëxtraheerd is met 1000 ml 85 %-ige oxaalzuurhoudende aceton, uit de formule:

$$c = \frac{100 E}{p \times D} \text{ voor vers gras}$$

$$\text{en } c = \frac{400 E}{p \times D} \text{ voor verse faeces}$$

waarin:

E = extinctie van de gemeten oplossing

D = gehalte aan droge stof van het onderzochte materiaal

p = afgewogen hoeveelheid materiaal in g

## 4 Verkregen resultaten

### a. De invloed van de toevoeging van polyethyleenpoeder en chroomoxide-papier op de verteerbaarheid

Zoals in de inleiding reeds werd gesteld, dient een goede referentiestof de verteringsprocessen niet te beïnvloeden. In 1966 ontvingen de hamels in de verteringsproef met grasmeel en polyethyleenpoeder 50 gram van dit poeder per dier per dag. In tabel 1 zijn de verteringscoëfficiënten van de verschillende bestanddelen van het grasmeel vermeld, wanneer dit meel uitsluitend en wanneer dit samen met het polyethyleenpoeder aan de drie hamels werd verstrekt.

Tabel 1. De verteringsproeven in 1966 met grasmeel en grasmeel gemengd met polyethyleenpoeder. Samenstelling der droge stof (%) en verteringscoëfficiënten.

	Droge stof	Orga- nische stof	Ruw eiwit	Overige kool- hydraten + vet	Ruwe cel- stof	As	Werke- lijk eiwit
<b>GRASMEEL/grassmeal (V 773)</b>							
samenstelling/composition	89,99	86,72	15,46	48,24	23,02	13,28	13,22
verteringscoëff./digestion coefficients:							
hamel/wether K	57,6	61,4	54,3	70,1	47,8	33,3	51,0
hamel/wether L	61,5	65,7	57,5	74,4	52,9	34,2	55,5
hamel/wether M	59,2	63,3	52,7	70,7	54,8	32,4	49,3
gemiddeld/average	59,4	63,5	54,8	71,7	51,8	33,3	51,9
<b>GRASMEEL + POLYETHYLEENPOEDER/grassmeal + polyethylene (V 775)</b>							
verteringscoëff./digestion coefficients:							
hamel/wether K	59,9	63,8	56,0	72,0	51,8	34,5	53,0
hamel/wether L	59,8	64,2	54,9	71,8	54,6	31,0	53,0
hamel/wether M	62,3	66,6	53,4	74,2	59,6	34,2	49,7
gemiddeld/average	60,7	64,9	54,8	72,7	55,3	33,2	51,9
				<i>N-free</i>			
	<i>Dry</i>	<i>Organic</i>	<i>Crude</i>	<i>extract</i>	<i>Crude</i>		<i>True</i>
	<i>matter</i>	<i>matter</i>	<i>protein</i>	<i>+ fat</i>	<i>fibre</i>	<i>Ash</i>	<i>protein</i>

Table 1. The digestibility trials in 1966 with grassmeal and grassmeal mixed with polyethylene powder. Composition of the dry matter (%) and digestion coefficients.

De overeenstemming van de verteringscoëfficiënten der verschillende bestanddelen blijkt bijzonder goed te zijn; zo werd voor de gemiddelde verteringscoëfficiënt van de organische stof van het grasmael als zodanig  $63,5 \pm 1,2$  gevonden en wanneer aan dit meel polyethyleenpoeder was toegevoegd  $64,9 \pm 0,9$ . Voor de bepaling van het polyethyleen werd in 1966 nog gebruik gemaakt van de methode CHANDLER e.a. Pasten wij later de door ons ontwikkelde methode toe, dan vonden wij voor de gemiddelde verteringscoëfficiënt van de organische stof  $64,8 \pm 0,8$ .

In 1967 werd de verteerbaarheid van gras vergeleken met die van hetzelfde gras samen gevoerd met polyethyleenpoeder en chroomoxidepapier. De hoeveelheid polyethyleenpoeder was nu verminderd tot 8 gram per dier per dag, maar de dieren ontvingen hierboven 8 gram chroomoxidepapier, hetgeen neerkomt op 2,5 gram  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  per dag. Uit tabel 2 blijkt dat de beide indicatoren de verteerbaarheid in het geheel niet beïnvloed hebben.

Tabel 2. De verteringsproeven in 1967 met gras en gras tezamen met polyethyleenpoeder en chroomoxidepapier. Samenstelling der droge stof (%) en verteringscoëfficiënten.

	Droge stof	Organische stof	Ruw eiwit	Overige koolhydraten + vet	Ruwe celstof	As	Werkelijk eiwit
<b>GRAS/grass (V 814)</b>							
samestelling/composition	13,66	90,99	13,32	48,90	28,77	9,01	10,72
verteringscoëff./digestion coefficients:							
hamel/wether L	72,5	75,3	65,9	75,7	78,8	44,4	59,4
hamel/wether M	71,3	73,8	69,0	73,8	76,0	46,2	62,7
gemiddeld/average	71,9	74,6	67,4	74,8	77,4	45,3	61,0
<b>GRAS + POLYETHYLEENPOEDER + CHROOMOXIDE/ grass + polyethylene powder + chromic oxide (V 813)</b>							
verteringscoëff./digestion coefficients:							
fistelhamel/fistulated wether Q	71,0	73,5	65,4	74,3	75,9	45,8	59,5
fistelhamel/fistulated wether R	72,0	74,1	67,5	74,8	76,0	50,7	61,7
gemiddeld/average	71,5	73,8	66,4	74,6	76,0	48,2	60,6
				<i>N-free</i>			
	<i>Dry matter</i>	<i>Organic matter</i>	<i>Crude protein</i>	<i>extract + fat</i>	<i>Crude fibre</i>	<i>Ash</i>	<i>True protein</i>

Table 2. The digestibility trials in 1967 with grass and grass together with polyethylene powder and chromic oxide paper. Composition of the dry matter (%) and digestion coefficients.

Deze maal werd voor de organische stof een verteringscoëfficiënt van  $74,6 \pm 0,8$  gevonden, indien het gras alleen werd gevoerd. Samen verstrekt met het polyethyleenpoeder en het chroomoxidepapier, vonden wij voor de verteringscoëfficiënt van de organische stof van het gras  $73,8 \pm 0,3$ .

b. De dagelijkse schommelingen in de uitscheiding van het polyethyleenpoeder, het chromoxide en de chromogenen

In figuur 1 is grafisch de uitscheiding per dag van het polyethyleen bij elk der drie hamels uit de verteringsproef van grasmeel met polyethyleenpoeder in 1966 weergegeven.

Fig. 1. Dagelijkse uitscheiding van polyethyleen (gram) in de mest tijdens de voor- en hoofdperiode van de verteringsproef met grasmeel en polyethyleenpoeder in 1966 en gedurende enkele dagen na het beëindigen van de verstrekking van het polyethyleenpoeder.

POLYETHYLEEN (g)  
polyethylene (g)

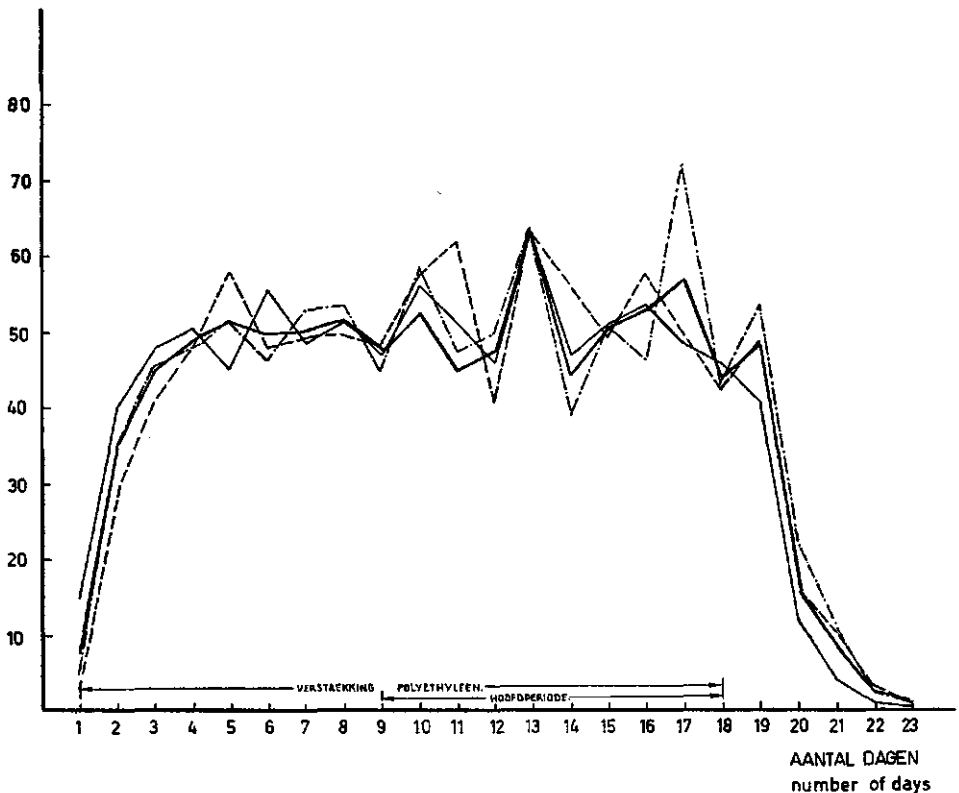


Fig. 1. Daily faecal output of polyethylene (grammes) in the preliminary and experimental period of the digestibility trial with grassmeal and polyethylene powder in 1966 and for some days after the last polyethylene powder had been given.

In deze proef werd niet slechts in de hoofdperiode iedere dag de hoeveelheid uitgescheiden polyethyleen bepaald, maar ook in de voorperiode en gedurende 5 dagen in de naperiode. In 1967 is de dagelijkse uitscheiding aan polyethyleen,

chromoxide en chromogenen uitsluitend in de hoofdperiode bepaald (figuur 2).

Fig. 2. Dagelijkse uitscheiding van chromogeen (optische dichtheid per liter), polyethyleen (gram) en chromoxide (gram) in de mest van de hoofdperiode tijdens de verteringsproef met gras, polyethyleenpoeder en chromoxidepapier in 1967.

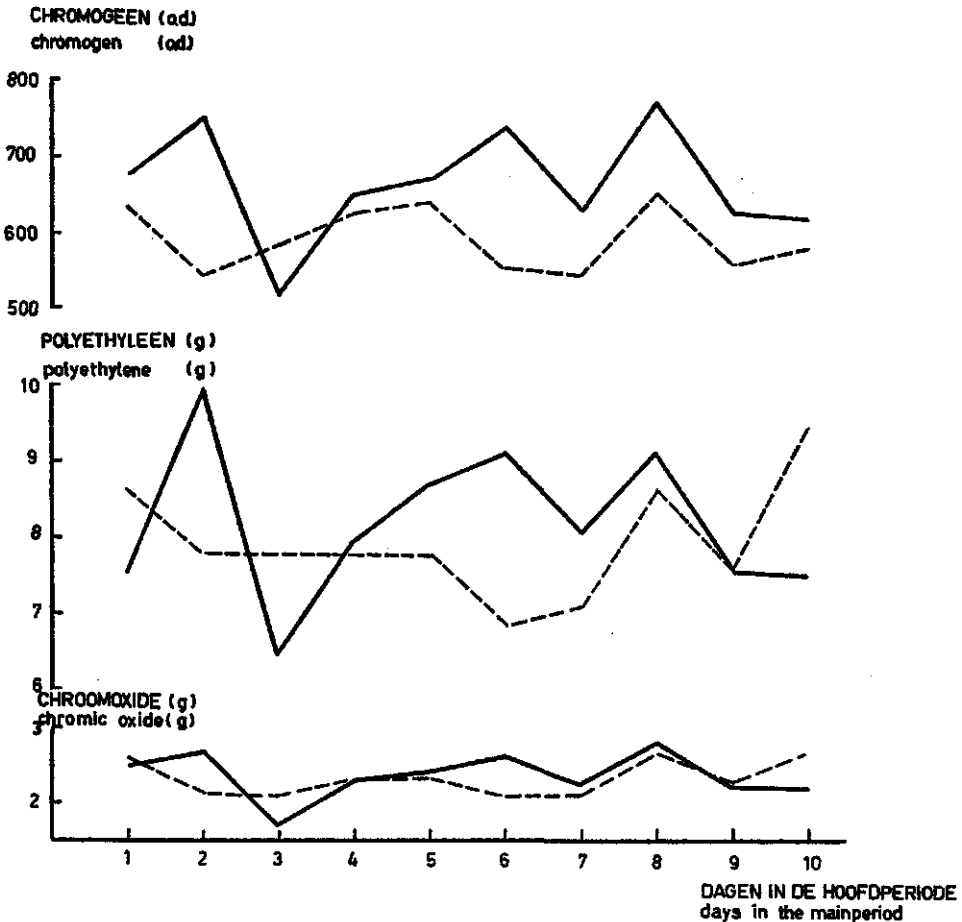


Fig. 2. Daily faecal output of chromogen (optical density per litre), polyethylene (grammes) and chromic oxide (grammes) in the experimental period of the digestibility trial with grass, polyethylene powder and chromic oxide paper in 1967.

De gemiddelde dagelijks uitgescheiden hoeveelheden van de drie indicatoren in de hoofdperiode van de verteringsproeven V 775 en V 813 zijn vermeld in tabel 3.



Tabel 3. Gemiddelde dagelijks uitgescheiden hoeveelheden polyethyleen, chroomoxide en chromogenen in de hoofdperioden van de verteringsproeven V 775 en V 813.

Indicator	Hamel	V 775			Hamel	V 813		
		gram per dag <sup>1</sup>	stand. afw. *	variatie coëff.		gram per dag <sup>2</sup>	stand. afw. *	variatie coëff.
POLYETHYLEEN/ <i>polyethylene</i>	K	50,0	5,1	10,0	Q	8,16	1,02	12,5
	L	51,7	8,0	15,5	R	7,91	0,77	9,7
	M	51,6	10,4	20,2				
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>					Q	2,34	0,32	13,7
					R	2,31	0,23	10,0
CHROMOGENEN/ <i>chromogens</i>					Q	662,3	76,0	11,5
					R	588,9	42,6	7,2
		<i>grammes/ day <sup>1</sup></i>	<i>S.D. *</i>	<i>coef. of variation</i>		<i>grammes/ day <sup>2</sup></i>	<i>S.D. *</i>	<i>coef. of variation</i>
<i>Indicator</i>	<i>Wether</i>	<i>V 775</i>			<i>Wether</i>	<i>V 813</i>		

\* van de enkelvoudige bepaling/of the single determination

<sup>1</sup> methode 'Chandler'/Chandler method

<sup>2</sup> methode 'Hoorn'/Hoorn method

Table 3. Mean daily faecal polyethylene, chromic oxide and chromogens in the experimental period of the digestibility trials V 775 and V 813.

### c. De teruggevonden hoeveelheden polyethyleen, chroomoxide en chromogenen in de beide proeven

Tabel 4 geeft een beeld van de mate waarin het in de verteringsproef van 1966 (V 775) verstrekte polyethyleenpoeder uit de mest kon worden teruggewonnen.

Indien het gehalte aan polyethyleen in het mengmonster van de dagelijks uitgescheiden mest volgens de methode CHANDLER e.a. werd bepaald, werd van de totaal 1500 gram polyethyleenpoeder 1533 gram teruggevonden, hetgeen een percentage van  $102,2 \pm 1,8$  % betekent. Wordt de hoeveelheid polyethyleen dagelijks vastgesteld, dan bleek de som eveneens 1533 gram ( $102,2 \pm 1,1$  %) te bedragen. Met de methode 'Hoorn' werd in het mengmonster 1499 gram ( $99,9 \pm 1,4$  %) teruggevonden.

In de laatste 5 dagen van de voorperiode waren de herwinningspercentages: hamel K: 100,5 %, hamel L: 100,7 % en hamel M: 100,8 % (steeds bepaald met de methode CHANDLER e.a.).

In 1967 werd uitsluitend de methode 'Hoorn' toegepast voor de bepaling van het polyethyleen in de mest van de hamels. In het mengmonster, samengesteld uit gelijke percentages van de dagmonsters uit de hoofdperiode, werd van de 160 gram

polyethyleen die verstrekt was, 154,3 gram teruggevonden ( $96,4 \pm 2,0 \%$ ). De som van de dagmonsters leverde 160,7 gram polyethyleen op ( $100,4 \pm 1,6 \%$ ), (zie tabel 5).

Wat het chromoxide betreft zijn de resultaten vermeld in tabel 6.

Tabel 4. Teruggevonden hoeveelheden polyethyleen in de mest van de hamels uit de verteringsproef in 1966 met grasmeel en polyethyleenpoeder (V 775).

	Methode 'Chandler e.a.'		Methode 'Hoorn'	
	gram	percentage	gram	percentage
verstrekt/supplied	500		500	
MENGMONSTER HOOFDPERIODE/mixed sample for experimental period				
hamel/wether K	493	98,6	488	97,6
hamel/wether L	519	103,8	512	102,4
hamel/wether M	521	104,2	499	99,8
totaal/total	1533	102,2	1499	99,9
DAGMONSTERS HOOFDPERIODE/daily samples in experimental period				
hamel/wether K	500	100,0		
hamel/wether L	517	103,4		
hamel/wether M	516	103,2		
totaal/total	1533	102,2		
	<u>grammes</u>	<u>percentage</u>	<u>grammes</u>	<u>percentage</u>
	Chandler method		Hoorn method	

Table 4. Recovered faecal polyethylene from wethers in the digestibility trial in 1966 with grassmeal and polyethylene powder (V 775).

Tabel 5. Teruggevonden hoeveelheden polyethyleen met de methode 'Hoorn' in de mest van de beide fistelhamels uit de verteringsproef in 1967 met gras, polyethyleen en chromoxide (V 813).

	Mengmonster in hoofdperiode		Dagmonsters in hoofdperiode	
	gram	percentage	gram	percentage
verstrekt/supplied	80		80	
hamel/wether Q	78,7	98,4	81,6	102,0
hamel/wether R	75,6	94,5	79,1	98,9
totaal/total	154,3	96,4	160,7	100,4
	<u>grammes</u>	<u>percentage</u>	<u>grammes</u>	<u>percentage</u>
	Mixed sample in exp. period		Daily samples in exp. period	

Table 5. Faecal polyethylene recovered by the Hoorn method from both fistulated wethers in the digestibility trial in 1967 with grass, polyethylene and chromic oxide (V 813).

Van de 49,8 gram chromoxide die verstrekt was, werd volgens de mengmonsters 43,9 gram ( $88,2 \pm 0,6 \%$ ) teruggevonden. Ook hier lag de som der dagmonsters uit de hoofdperiode hoger: 46,5 gram ( $93,4 \pm 0,6 \%$ ).

Tenslotte zijn in tabel 7 de hoeveelheden chromogenen opgenomen, die in beide verteringsproeven van 1967 (V 813 en V 814) werden gevonden.

Tabel 6. Teruggevonden hoeveelheden chromoxide in de mest van de beide fistelhamels uit de verteringsproef in 1967 met gras, polyethyleen en chromoxide (V 813).

	Mengmonster in hoofdperiode		Dagmonsters in hoofdperiode	
	gram	percentage	gram	percentage
verstrekt/ <i>supplied</i>	24,9		24,9	
hamel/ <i>wether</i> Q	22,1	88,8	23,4	94,0
hamel/ <i>wether</i> R	21,8	87,6	23,1	92,8
totaal of gemiddeld/ <i>total or average</i>	43,9	88,2	46,5	93,4
	<i>grammes</i>	<i>percentage</i>	<i>grammes</i>	<i>percentage</i>
	<i>Mixed sample in exp. period</i>		<i>Daily samples in exp. period</i>	

Table 6. Faecal chromic oxide recovered from both fistulated wethers in the digestibility trial in 1967 with grass, polyethylene and chromic oxide (V 813).

Tabel 7. Teruggevonden hoeveelheden chromogeen in de mest van de beide fistelhamels uit de verteringsproef met gras, polyethyleen en chromoxide (V 813) en in de mest van de hamels uit de verteringsproef met uitsluitend gras (V 814).

	Mengmonster in hoofdperiode		Dagmonsters in hoofdperiode	
	extinctie ds/ liter	percentage	extinctie ds/ liter	percentage
verstrekt in gras/ <i>supplied in grass</i>	5852		5852	
mest/ <i>faeces</i> :				
V 813: hamel/ <i>wether</i> Q	6017	102,8	6303	107,7
hamel/ <i>wether</i> R	5683	97,1	5889	100,6
V 814: hamel/ <i>wether</i> L	5757	98,4		
hamel/ <i>wether</i> M	6205	106,0		
gemiddeld/ <i>average</i>		101,1		104,2
	<i>optical density</i> <i>of dry matter/</i> <i>litre</i>	<i>percentage</i> <i>of intake</i>	<i>optical density</i> <i>of dry matter/</i> <i>litre</i>	<i>percentage</i> <i>of intake</i>
	<i>Mixed sample in exp. period</i>		<i>Daily samples in exp. period</i>	

Table 7. Faecal chromogens recovered from both fistulated wethers in the digestibility trial with grass, polyethylene and chromic oxide (V 813) and from wethers in the digestibility trial with grass only (V 814).

Van de totale hoeveelheid chromogenen welke met het gras werd opgenomen, vonden wij in de mengmonsters van de hoofdperiode van de 4 hamels uit beide verteringsproeven  $101,1 \pm 2,0$  % terug. De som van de dagmonsters uit de hoofdperiode kon slechts van de verteringsproef met gras met polyethyleen en chroomoxide bepaald worden, aangezien alleen in deze proef dagelijks de uitgescheiden faeces geanalyseerd werden. Als gemiddelde van de beide hamels werd voor de som der dagmonsters  $104,2 \pm 3,6$  % gevonden.

## 5 Bespreking der resultaten

CHANDLER e.a. (1964) vonden dat polyethyleen geen invloed had op de opname, wanneer dit tot een percentage van 30 % van het dieet (op basis van de droge stof) aan kalveren werd verstrekt. Storingen van het verteringsproces werden door hen evenmin geconstateerd. In de verteringsproef van 1966 met grasmeel waaraan polyethyleen was toegevoegd tot een gehalte van 4,6 % bij 2 hamels en 5,6 % bij het derde dier, berekend op de opgenomen hoeveelheid droge stof, werd geen invloed op de verteringscoëfficiënten van de diverse bestanddelen geconstateerd. Dit stemt overeen met de ervaringen van CHANDLER e.a. (1966), die bij kalveren evenmin enige invloed op de verteerbaarheid van het rantsoen konden vaststellen. Opmerkelijk is dat zij net als wij een kleinere variatie bij de plastic-methode dan bij de klassieke methode berekenden.

Het is niet verwonderlijk dat in 1967 evenmin een verschil tussen de verteringscoëfficiënten van gras en gras waaraan polyethyleenpoeder en chroomoxidepapier werd toegevoegd, gevonden werd. In deze proef werd immers slechts 1 % polyethyleenpoeder en 0,3 % chroomoxide (berekend op basis van de droge stof) verstrekt. Uit de uitscheidingscurve van het polyethyleen (figuur 1) blijkt dat reeds na ca. 3 dagen de hoeveelheid opgenomen polyethyleen in evenwicht is met de hoeveelheid uitgescheiden polyethyleen ('input = output'), zodat gesteld kan worden, dat 5 dagen zeker een veilige marge vormen. CHANDLER e.a. (1966) komen tot de slotsom dat minstens 7 dagen nodig zijn alvorens het plasticgehalte in de mest van kalveren maximaal is, indien 5 % van de droge stof van het dieet van deze dieren uit polyethyleen bestaat. Overigens blijkt uit figuur 1 dat 5 dagen na het beëindigen van de verstrekking van polyethyleen aan de schapen, nog slechts zeer kleine hoeveelheden van deze stof in de mest worden aangetroffen.

Uit figuur 2 en tabel 3 blijkt, dat de variatie in de dagelijkse uitscheiding van de drie indicatoren niet veel van elkaar verschilt. Slechts in één geval (hamel M in verteringsproef V 775) was de variatiecoëfficiënt duidelijk hoger.

Wat de teruggevonden hoeveelheden van de drie referentiestoffen betreft, valt polyethyleenpoeder bijzonder op. De ervaringen van CHANDLER e.a. (1964, 1966), die  $100,3 \pm 9,3$  en  $103,0 \pm 9,6$  % van het aan kalveren verstrekte poeder terugvonden en van KNAPKA e.a. (1967), die bij ezels  $103,2 \pm 3,4$  % herwonnen, konden bij schapen bevestigd worden. Het heeft er zelfs alle schijn van, dat de gemodificeerde analysemethode, welke aan dit instituut werd ontwikkeld, nog iets betere resultaten geeft. Dat wij in één geval (het mengmonster van de mest van verteringsproef V 813) slechts gemiddeld 96,4 % van het polyethyleen terug-

vonden, menen wij aan een niet geheel juiste bemonstering te moeten wijten. Deze opvatting wordt bevestigd door het beeld dat bij chroomoxide wordt aangetroffen (tabel 6) waar het mengmonster ook van de som der dagmonsters afwijkt. Voor het overige lagen de door ons gevonden standaardafwijkingen enigszins beneden die, welke door KNAPKA e.a. bij ezels werden gevonden en beduidend beneden de door CHANDLER e.a. bij kalveren gevonden waarden.

Ondanks dat het chroomoxide in de vorm van strookjes chroomoxidepapier verstrekt werd, hetgeen volgens vele onderzoekers de voorkeur verdient boven b.v. een poeder, een oliesuspensie of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  verwerkt in krachtvoerkorrels (CORBETT e.a., 1958b; CORBETT e.a., 1960a; CORBETT e.a., 1960b; CAWLISHAW en ALDER, 1963; JOHNSON e.a., 1964) en wel tweemaal per dag (AXELSSON en KIVIMÄE, 1951; RAYMOND en MINSON, 1955; HARDISON e.a., 1956; LAMBOURNE, 1957b; MURDOCK e.a., 1957; CORBETT e.a., 1958a; DAVIS e.a., 1958; CORBETT e.a., 1959; CORBETT e.a., 1960a; PIATKOWSKI e.a., 1962; LANGLANDS e.a., 1963; HOLMES e.a., 1966) werden ook nu, evenals in het verleden, te lage hoeveelheden  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  in de mest teruggevonden.

Laten wij de mengmonsters van verteringsproef V 813 buiten beschouwing, dan vonden wij als som der dagmonsters ook nu niet meer dan 93,4 % terug.

Hoewel het aantal onderzoekers dat beduidend meer uit de mest kon terugwinnen niet gering is (KANE e.a., 1950; AXELSSON en KIVIMÄE, 1951; CHANDA e.a., 1951; BRANNON e.a., 1953; HARDISON en REID, 1953a; HARDISON e.a., 1953b; KANE e.a., 1953a; KANE e.a., 1953b; KANE e.a., 1953c; LANCASTER e.a., 1953a; RAYMOND en MINSON, 1955; SMITH en REID, 1955; PUTNAM e.a., 1957; BRADLEY e.a., 1958; CORBETT e.a., 1960b; ELAM e.a., 1962; LANGLANDS e.a., 1963) vonden anderen zeer wisselende resultaten (BARNICOAT, 1945; CRAMPTON en LLOYD, 1951; SCHÜRCH, 1952; PIGDEN en BRISSON, 1956; MURDOCK e.a., 1957; CORBETT e.a., 1958a; HARDISON e.a., 1959; CLANTON, 1962; COWLISHAW en ALDER, 1963; JOHNSON e.a., 1964; PRYOR, 1966; CURRAN e.a., 1967).

Tenslotte is er een aantal onderzoekers dat net als wij te weinig  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  terugvond, in een enkel geval zelfs minder dan 70 %! (WOOLFOLK e.a., 1950; LAMBOURNE, 1957a; MOORE, 1957; TROELSEN, 1961; PIATOWSKI e.a., 1962; MCGUIRE e.a., 1966; ANDERSON e.a., 1967; HATTAN en OWEN, 1967; VAN 'T KLOOSTER, 1967; MCCANN, 1967; TOPPS e.a., 1968). Ons inziens kan hier naast absorptie (DEINUM e.a., 1962), wellicht van retentie in het spijsverteringskanaal sprake zijn (BARNICOAT, 1945).

Wanneer wij als laatste der in het onderhavige onderzoek betrokken indicatoren het chromogeen aan een nadere beschouwing onderwerpen, dienen wij allereerst op te merken dat de resultaten zeker niet tegenvallen. Hoewel de spreiding der resultaten vrij groot is (97,1 tot 106,0 % van het chromogeen in de mengmonsters teruggevonden en 100,6 tot 107,7 % in de dagmonsters) is de gemiddelde herwinning (101,1 resp. 104,2 %) zeer redelijk te noemen. De tendens om meer dan 100 % te vinden, waarop anderen reeds gewezen hebben (KANE e.a., 1953c; GREENHALGH en CORBETT, 1960; STEGER e.a., 1962) is, hoewel niet zo sterk, ook hier aanwezig.

## 6 Samenvatting en conclusies

Ten einde de waarde van de exogene indicatoren polyethyleenpoeder en chroomoxide en de endogene indicator chromogeen voor de bepaling van de opname van gras door rundvee in de weide vast te stellen, werden in de jaren 1966 en 1967 enkele verteringsproeven met hamels uitgevoerd. Elke verteringsproef bestond uit een voorperiode van 8 dagen en een hoofdperiode van 10 dagen, waarin de mest kwantitatief werd verzameld. In 1966 ontvingen 3 hamels naast grasmeel, waarvan de verteerbaarheid bekend was, 50 gram polyethyleenpoeder per dier per dag. Het jaar daarop ontvingen 2 fistelhamels naast gras, waarvan de verteerbaarheid eveneens bekend was, via de fistel 8 gram polyethyleenpoeder en 2,5 gram chroomoxide per dier per dag. Dit laatste was geïmpregneerd in strookjes papier.

Gedurende de hoofdperiode van beide proeven werd het voer en de mest geanalyseerd op de gebruikelijke bestanddelen: droge stof, ruw eiwit, ruwe as, ruwe celstof en werkelijk eiwit. Verder werd in de mest van de eerste proef het gehalte aan polyethyleen en van de tweede proef dat aan polyethyleen en chroomoxide vastgesteld. Bovendien werd in de tweede proef zowel in gras als in mest het gehalte aan chromogeen bepaald. In de proef met het grasmeel werd de mest ook in de voorperiode en gedurende een aantal dagen na beëindiging van de polyethyleen-toevoeging op het gehalte aan polyethyleen onderzocht.

Er werden gemodificeerde werkmethoden opgesteld voor de bepaling van het polyethyleen op basis van de methode van CHANDLER e.a. (1964), voor chroomoxide, gebaseerd op een voorschrift van DANSKY en HILL (1952) en voor de chromogenen, uitgaande van door DEJNS en BOSMAN ontwikkelde methoden (1954, 1956).

Uit de beide proeven blijkt, dat de toevoeging aan het rantsoen van ca. 5 % polyethyleenpoeder, danwel 1 % polyethyleenpoeder samen met 0,3 %  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , op basis van de hoeveelheid verstrekte droge stof, geen invloed heeft op de verteerbaarheid. Voor de verteringscoëfficiënt van de organische stof van het grasmeel werd zonder toevoeging  $63,5 \pm 1,2$  gevonden en in combinatie met polyethyleenpoeder  $64,8 \pm 0,8$  (tabel 1). Bij het verse gras was dit cijfer  $74,6 \pm 0,8$  tegen  $73,8 \pm 0,3$  voor gras met polyethyleenpoeder en chroomoxidepapier (tabel 2).

De uitscheidingscurven van de drie referentiestoffen (figuren 1 en 2; tabel 3) laten onderling weinig verschil zien. Na ongeveer 3 dagen blijkt de uitscheiding aan polyethyleen reeds in evenwicht met de toediening te zijn ('input = output') (figuur 1). Na beëindiging van de verstrekking van polyethyleenpoeder daalt het gehalte in de mest snel, maar nog enkele dagen worden sporen hiervan in de mest

aangetroffen. In 1966 werd van het verstrekte polyethyleen  $99,9 \pm 1,4$  % in het mengmonsters van de dagelijks uitgescheiden mest teruggevonden (tabel 4). In 1967 was dit herwinningspercentage op basis van de dagmonsters uit de hoofdperiode  $100,4 \pm 1,6$  % (tabel 5). Van het chroomoxide werd in dat jaar in de dagmonsters  $93,4 \pm 0,6$  % teruggewonnen (tabel 6), van de chromogenen  $101,1 \pm 2,0$  % (tabel 7).

Uit het onderzoek kunnen wij de volgende conclusies trekken:

1. Polyethyleenpoeder, althans de kwaliteit die in het hier beschreven onderzoek gebruikt is, kan als exogene indicatorstof in het verteerbaarheidsonderzoek het kwantitatief verzamelen van de mest overbodig maken, zonder dat dit aan de nauwkeurigheid der resultaten veel afdoet. Voor de bepaling van de opname door grazend vee kan het dezelfde rol vervullen. Hierbij is van essentieel belang, dat het verstrekte polyethyleen door het dier kwantitatief wordt opgenomen. Indien dit poeder gebruikt wordt, kan reeds 5 dagen na de eerste toediening met de bemonstering van de mest begonnen worden. Het poeder beïnvloedt het verteringsproces niet, is kennelijk niet onsmakelijk, zal door de grote fijnheid in passagesnelheid met het voer overeenstemmen, vertoont geen absorptie of retentie in het spijsverteringskanaal en is betrekkelijk eenvoudig te bepalen.
2. Chromoxidepapier is minder geschikt om als referentiestof gebruikt te worden. Afgezien van de praktische bezwaren, die aan de fabricage e.d. van de papierstrookjes kleven, is er sprake van absorptie en/of retentie waardoor minder dan 95 % van het verstrekte  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  in de mest wordt teruggevonden.
3. Chromogeen kan als endogene indicator - in combinatie met polyethyleenpoeder - voor de bepaling van de voederopname door grazend rundvee gebruikt worden.



## Summary and conclusions

In digestibility trials with wethers the reliability of various faecal markers was tested with a view to their use for estimating herbage intake by grazing dairy cattle. Each digestion trial had a preliminary period of 8 days and an experimental period of 10 days. In the 1966 trial 50 g polyethylene powder per day (5 % of the ration) was added to a ration of grassmeal of known digestibility for each of 3 wethers. In the 1967 trial 2 fistulated wethers were given grass of known digestibility and each received 8 g polyethylene powder (1 % of the ration) and 2.5 g chromic oxide (0.3 % of the ration) per day through the fistula. The chromic oxide was impregnated into shredded paper.

In the experimental period dry matter, crude protein, ash, crude fibre and true protein were determined in feed and faeces. Polyethylene was determined in faeces by a modification of the method of CHANDLER *et al.* (1964) and chromic oxide by a modification of the method of DANSKY and HILL (1952). In the 1967 trial chromogen in feed and faeces was determined by a method derived from those of DEJIS and BOSMAN (1954, 1956).

The added markers did not affect digestibility of the ration: digestibility of organic matter was for grassmeal without addition  $63.5 \pm 1.2$  and with polyethylene powder  $64.8 \pm 0.8$  (table 1). In the trial with fresh grass these figures were  $74.6 \pm 0.8$  without addition and  $73.8 \pm 0.3$  with polyethylene powder and chromic oxide paper (table 2).

The excretion curves of the 3 markers (fig. 2, table 3) were almost identical. For polyethylene, output balanced intake within 3 days; after the last quantity of marker had been given, it was excreted rapidly and only traces remained after 4-5 days (fig. 1).

Recovery of polyethylene in the experimental period from a sample of the total faeces in 1966 was  $99.9 \pm 1.4$  % (table 4) and in 1967 in the daily samples  $100.4 \pm 1.6$  % (table 5). Recovery in 1967 of chromic oxide was  $93.4 \pm 0.6$  % (table 6) and of chromogens  $101.1 \pm 2.0$  % (table 7).

### Conclusions

1. Polyethylene powder, of the quality used, is suitable as an added marker in digestion trials. Total collection of faeces is not essential for accuracy, if all the weighed polyethylene is ingested. Faeces may be sampled 5 days after first giving the marker. With its fine grade, its rate of passage will be similar to that of the

feed. The powder does not affect the palatability or digestibility of the ration. None of it is absorbed or retained in the gut. It is easily determined.

2. Chromic oxide paper is less suitable. Not only are there practical difficulties in the manufacture of the shredded paper and in its variation in moisture content, but also there is some absorption or retention in the gut so that less than 95 % is recovered.

3. In association with polyethylene powder, chromogen should be suitable for estimating intake by grazing ruminants.

## Literatuur

- ANDERSON, M. J., 1967 Influence of concentrate: forage ratios on digestibility using indicator techniques. *J. Dairy Sci.* 50: 988.  
 W. H. OLESON,  
 G. E. STODDARD
- AXELSSON, J., 1951 Comparison between the accuracies of the direct and indirect methods in digestion trials with wethers. *Acta Agric. Scand.* 1: 282.  
 A. KIVIMÄE
- BARNICOAT, C. R. 1945 Estimation of apparent digestibility coefficients by means of an inert "reference-substance". *N.Z.J. Sci. Techn.* 27: 202.
- BOLIN, D. W., 1952 A simplified method for the determination of chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) when used as an index substance. *Science* 116: 634.  
 R. P. KING,  
 E. W. KLOSTERMAN
- BRADLEY, N. W., 1958 Use of the chromic oxide method for determining digestible energy and protein in complete pelleted steer rations. *J. Animal Sci.* 17: 1199.  
 R. M. FORBES,  
 W. W. ALBERT,  
 G. E. MITCHELL jr.,  
 A. L. NEUMANN
- BRANNON, W. F., 1953 The influence of certain factors upon the digestibility and intake of pasture herbage by beef cattle. *J. Animal Sci.* 12: 938.  
 J. T. REID,  
 J. I. MILLER
- BRISSON, G. J. 1956 On the routine determination of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  in feces. *Canad. J. Agric. Sci.* 36: 210.
- CHANDA, R., 1951 The use of chromium sesquioxide to measure the digestibility of carotene by goats and cows. *J. Agric. Sci.* 41: 179.  
 H. M. CLAPHAM,  
 M. L. MCNAUGHT,  
 E. C. OWEN
- CHANDLER, P. T., 1964 Polyethylene as a reference substance for digestion studies with young ruminants. *J. Dairy Sci.* 47: 1426.  
 E. M. KESLER,  
 R. D. MCCARTHY
- CHANDLER, P. T., 1966 Excretion of polyethylene by dairy calves. *J. Animal Sci.* 25: 64.  
 E. M. KESLER,  
 G. M. JONES
- CRISTIAN, K. R., 1954 Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. VI. The determination of chromic oxide in faeces. *N.Z.J. Sci. Techn.* A36: 328.  
 M. R. COUP
- CLANTON, D. C. 1962 Variation in chromic oxide methods of determining digestibility of hand-fed beef cattle rations. *J. Animal Sci.* 21: 214.
- CLARKSON, E. M. 1967 A rapid method for the determination of chromium sesquioxide in faecal homogenates. *Clin. Chim. Acta* 16: 186.

- CORBETT, J. L., 1958a Excretion of chromium sesquioxide and polyethyleneglycol by dairy cows. *Brit. J. Nutrition* 12: 266.  
J. F. D. GREENHALGH,  
P. E. GWYNN,  
D. WALKER
- CORBETT, J. L., 1858b Paper as a carrier of chromium sesquioxide. *Nature* 182:  
1014.  
J. F. D. GREENHALGH,  
A. P. MACDONALD
- CORBETT, J. L., 1959 Distribution of chromium sesquioxide and polyethylene-  
glycol in the reticulo-rumen of cattle. *Brit. J. Nutrition* 13:  
337.  
J. F. D. GREENHALGH,  
E. FLORENCE
- CORBETT, J. L., 1960a Further studies on the administration of chromium sesqui-  
oxide as a component of paper. *Proc. Nutrition Soc.* 19: XX.  
G. W. REID,  
J. P. LANGLANDS,  
E. FLORENCE
- CORBETT, J. L., 1960b Excretion of chromium sesquioxide administered as a com-  
ponent of paper to sheep. *Brit. J. Nutrition* 14: 289.  
J. F. D. GREENHALGH,  
I. McDONALD,  
E. FLORENCE
- COUP, M. R., 1952 Determination of chromium sesquioxide in faeces samples.  
*N.Z.J. Sci. Techn.* A34: 347.  
R. J. LANCASTER
- COWLISHAW, S. J., 1963 A comparative study of paper and oils as carriers of  $Cr_2O_3$   
administered to grazing steers to determine their faecal  
output. *J. Brit. Grassland Soc.* 18: 328.  
F. E. ALDER
- CRAMPTON, E. W., 1951 Studies with sheep on the use of chromic oxide as an index  
of digestibility of ruminant rations. *J. Nutrition* 45: 319.  
L. E. LLOYD
- CURRAN, M. K., 1967 A note on the use of chromic oxide incorporated in a feed  
to estimate faecal output in ruminants. *Animal Prod.* 9: 561.  
J. D. LEAVER,  
E. W. WESTON
- CZARNOCKI, J., 1961 The determination of chromic oxide in samples of feed and  
excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Canad. J.*  
*Animal Sci.* 41: 167.  
I. R. SIBBALD,  
E. V. EVANS
- DANSKY, L. M., 1952 Application of the chromic oxide indicator method to  
balance studies with growing chickens. *J. Nutrition* 47: 449.  
F. W. HILL
- DAVIS, C. L., 1958 An evaluation of the chromic oxide methode for deter-  
mining digestibility. *J. Dairy Sci.* 41: 152.  
J. H. BYERS,  
L. E. LUBER
- DAY, K. M. 1954 Source of error in determination of chromic oxide using  
perchloric-sulfuric acid digestion method. *Science* 120: 717.
- DEINUM, B., 1962 The excretion of chromium sesquioxide in faeces by cows  
after administration of  $Cr_2O_3$ -containing paper. *Jaarb. I.B.S.,*  
*Wageningen*, 123.  
H. J. IMMINK,  
W. B. DEIJS
- DEIJS, W. B., 1954 De bepaling van de verteerbaarheid van voedingsstoffen met  
behulp van plantaardige gekleurde verbindingen, die in het  
voer voorkomen. I. Algemene beschouwingen en colori-  
metrie. *Verslag C.I.L.O. over 1953*: 155  
M. S. M. BOSMAN
- DEIJS, W. B., 1955 Plant pigments in digestion trial studies. *Rec. Trav. Chim.*  
*Pays-Bas* 74: 1207.  
M. S. M. BOSMAN
- DEIJS, W. B., 1956 De bepaling van de verteerbaarheid van voedingsstoffen met  
behulp van plantaardige gekleurde verbindingen, die in het  
voer voorkomen. V. Voederproeven met vers gras op stal.  
*Verslag C.I.L.O. over 1955*: 181.  
M. S. M. BOSMAN

- ELAM, C. J., 1962 Digestibility studies by means of chromic oxide, lignin and total collection techniques with sheep. *J. Animal Sci.* 21: 189.  
P. J. REYNOLDS,  
R. E. DAVIS,  
D. O. EVERSON
- GEHRKE, C. W., 1950 The quantitative determination of chromic oxide in feeds and feces. An improved method applicable in digestibility studies with farm animals. Univ. Missouri Agric. Exp. Stat. Bull. 469.  
D. T. MAYER,  
E. E. PICKETT,  
C. V. RUNYON
- GREENHALGH, J. F. D., 1960 The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. 1. Nitrogen and chromogen as faecal index substances. *J. Agric. Sci.* 55: 371.  
J. L. CORBETT
- HARDISON, W. A., 1953a Use of indicators in the measurement of the dry matter intake of grazing animals. *J. Nutrition* 51: 35.  
J. T. REID
- HARDISON, W. A., 1953b A procedure for measuring pasture herbage consumption. *J. Dairy Sci.* 36: 583.  
J. T. REID,  
C. M. MARTIN
- HARDISON, W. A., 1956 Fecal chromic oxide concentration in 12 dairy cows as related to time and frequency of administration and to feeding schedule. *J. Nutrition* 58: 11.  
R. W. ENGEL,  
W. N. LINKOUS,  
H. C. SWEENEY,  
G. C. GRAF
- HARDISON, W. A., 1959 Observations on the use of chromic oxide for estimating the fecal output of dairy animals. *J. Dairy Sci.* 42: 346.  
W. N. LINKOUS,  
R. W. ENGEL,  
G. C. GRAF
- HATTAN, G. L., 1967 Digestibility analyses with dairy cows comparing shortterm total collections and chromic oxide methods with seven-day total collection. *J. Dairy Sci.* 50: 1011.  
F. G. OWEN
- HILL, F. W., 1958 Comparison of metabolizable energy and productive energy determinations with growing chicks. *J. Nutrition* 64: 587.  
D. L. ANDERSON
- HOLMES, W., 1966 Feed intake of grazing cattle. *Animal Prod.* 8: 47.  
J. G. W. JONES,  
C. ADELIN
- IRVIN, H. M., 1953 The role of plant pigments in digestion trial studies. *J. Animal Sci.* 12: 541.  
H. G. WISEMAN,  
J. C. SHAW,  
L. A. MOORE
- JOHNSON, D. E., 1964 Rate of passage of chromic oxide and composition of digesta along the alimentary tract of wethers. *J. Animal Sci.* 23: 499.  
W. E. DINUSSON,  
D. W. BOLIN
- KANE, E. A., 1950 A comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. *J. Nutrition* 41: 583.  
W. C. JACOBSON,  
L. A. MOORE
- KANE, E. A., 1953a A comparison of various digestion trial techniques with dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 36: 325.  
R. E. ELY,  
W. C. JACOBSON,  
L. A. MOORE
- KANE, E. A., 1953b The estimation of the dry matter consumption of grazing animals by ratio techniques. *J. Dairy Sci.* 36: 582.  
W. C. JACOBSON,  
R. E. ELY,  
L. A. MOORE

- KANE, E. A.,  
W. C. JACOBSON,  
R. E. ELY,  
L. A. MOORE 1953c The estimation of the dry matter consumption of grazing animals by ratio techniques. *J. Dairy Sci.* 36: 637.
- KENNEDY, W. K.,  
A. H. CARTER,  
R. J. LANCASTER 1959 Comparison of faecal pigments and faecal nitrogen as digestibility indicators in grazing cattle studies. *N.Z.J. Agric. Res.* 2: 627.
- KIMURA, F. T.,  
V. L. MILLER 1957 Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. *J. Agric. Food Chem.* 5: 216.
- KLOOSTER, A. TH. VAN 'T 1967 De toestand van calcium, magnesium en enkele andere mineralen in darminhoud en mest van herkauwers in verband met hun resorptie. *Med. Landb. Hogesch. Wageningen* 67: 5.
- KNAPKA, J. J.,  
K. M. BARTH,  
D. G. BROWN,  
R. G. CRAGLE 1967 Evaluation of polyethylene, chromic oxide and cerium-144 as digestibility indicators in burros. *J. Nutrition* 92: 79.
- LAMBOURNE, L. J. 1957a Measurement of feed intake of grazing sheep. I. Rate of passage of inert reference materials through the ruminant digestive tract. *J. Agric. Sci.* 48: 273.
- LAMBOURNE, L. J. 1957b Measurement of feed intake of grazing sheep. II. The estimation of faeces output using markers. *J. Agric. Sci.* 48: 415.
- LANCASTER, R. J.,  
M. R. COUP,  
J. C. PERCIVAL 1953a Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. III. Marker technique for investigating the faeces output of grazing cows. *N.Z.J. Sci. Techn.* A35: 117.
- LANCASTER, R. J.,  
M. P. BARTRUM 1953b Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. IV. A source of error in the chromogen technique of estimating the digestibility of fodders. *N.Z.J. Sci. Techn.* A35: 489.
- LANGLANDS, J. P.,  
J. L. CORBETT,  
I. McDONALD 1963 The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. 3. Regressions of digestibility on faecal nitrogen concentration: effects of species and individuality of animal and of the method of determining digestibility upon the relationships. *J. Agric. Sci.* 61: 221.
- MAUNSELL, P. W. 1944 Estimation of chromium sesquioxide. *N.Z.J. Sci. Techn.* B26: 94.
- MCCANN, C. P. 1967 Evaluation of the lignin ratio and chromic oxide indicator methods. *J. Animal Sci.* 26: 936.
- MCGUIRE, R. L.,  
N. W. BRADLEY,  
C. O. LITTLE 1966 Effects of frequency of feeding on excretion of chromic oxide, crude protein and gross energy and on nutrient digestibility by steers. *J. Animal Sci.* 25: 185.
- MOORE, J. H. 1957 Diurnal variations in the composition of the faeces of pigs on diets containing chromium oxide. *Brit. J. Nutrition* 11: 273.
- MURDOCK, F. R.,  
A. S. HODGSON,  
V. L. MILLER,  
F. KIMURA 1957 Observations on the application of the chromic oxide technique to pasture nutrition studies. *J. Dairy Sci.* 40: 618.
- PAAR, G. E.,  
G. E. HAWKINS 1963 Automatic titration of fecal indicator chromium and micro-Kjeldahl nitrogen. *J. Dairy Sci.* 46: 239.

- PALOHEIMO, L.,  
I. PALOHEIMO 1935 Eine photometrische Methode zur Bestimmung des  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  bei Verdaulichkeitsuntersuchungen nach sog. quantitativen Indikatorverfahren. *Tierernahrung* 7: 317.
- PIATKOWSKI, B.,  
H. STEGER,  
F. PÜSCHEL 1962 Bestimmung sowie Ausscheidung von Chromoxyd bei im Stall gefütterten und weidenden Milchkühen. *Arch. Tierernahrung* 12: 137.
- PIGDEN, W. J.,  
G. J. BRISSON 1956 Effect of frequency of administration of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  on its fecal excretion pattern by grazing wethers. *Canad. J. Agric. Sci.* 36: 146.
- PRYOR, W. J. 1966 Some techniques for determining fecal output and digestibility of range forage by cattle. *Dissertation Absts. (B)* 27: 12-B.
- PUTNAM, P. A.,  
J. K. LOOSLI,  
R. G. WARNER,  
S. R. SEARLE 1957 Diurnal excretion of chromium oxide and ash by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 40: 618.
- RAYMOND, W. F.,  
D. J. MINSON 1955 The use of chromic oxide for estimating the faecal production of grazing animals. *J. Brit. Grassland Soc.* 10: 282.
- REID, J. T.,  
P. G. WOOLFOLK,  
C. R. RICHARDS,  
R. W. KAUFMANN,  
J. K. LOOSLI,  
K. L. TURK,  
J. I. MILLER,  
R. E. BLASER 1950 A new indicator method for the determination of digestibility and consumption of forages by ruminants. *J. Dairy Sci.* 33: 60.
- SCHÜRCH, A. F.,  
L. E. LLOYD,  
E. W. CRAMPTON 1950 The use of chromic oxide as an index for determining the digestibility of a diet. *J. Nutrition* 41: 629.
- SCHÜRCH, A. 1952 Die Chromoxyd-Indikator-Methode zur Verdaulichkeitsbestimmung. *Mitt. Geb. Lebensmittel Hyg.* 43: 335.
- SCHÜRCH, A.,  
J. BARBORIAK,  
M. FINDRIK 1954 Neuere Erfahrungen mit der kolorimetrischen Chromoxydbestimmung. *Mitt. Geb. Lebensmittel Hyg.* 45: 66.
- SMITH, A. M.,  
J. T. REID 1955 Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of pasture herbage by grazing cows. *J. Dairy Sci.* 38: 515.
- STEGER, H.,  
B. PIATKOWSKI,  
F. PÜSCHEL 1962 Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Verdaulichkeit des Weidegrases mit Hilfe der Chromogenmethode. *Arch. Tierernahrung* 12: 121.
- STEVENSON, A. E.,  
H. DE LANGEN 1960 Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. VII. Modified wet digestion method for determination of chromic oxide in faeces. *N.Z.J. Agric. Res.* 3: 314.
- TOPPS, J. H.,  
R. N. B. KAY,  
E. D. GOODALL 1968 Digestion of concentrate and of hay diets in the stomach and intestines of ruminants. 1. Sheep. *Brit J. Nutrition* 22: 261.
- TROELSEN, J. E. 1961 Preliminary observations in the use of a sustained release pellet for administration of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  to sheep in digestibility studies. *Canad. J. Animal Sci.* 41: 71.

WOOLFOLK, P. G.,  
C. R. RICHARDS,  
R. W. KAUFMAN,  
C. M. MARTIN,  
J. T. REID

1950 A comparison of faecal nitrogen excretion rate, chromium oxide and "chromogen(s)" methods for evaluating forages and roughages. *J. Dairy Sci.* 33: 385.