

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vliv krmení biocharu na obsah
fermentačních produktů ve výkalech a
stravitelnost krmiva u koní**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Denisa Tichá

Obor studia: Výživa zvířat a dietetika

Vedoucí práce: Ing. Miroslav Joch, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv krmení biocharu na obsah fermentačních produktů ve výkalech a stravitelnost krmiva u koní" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou velice poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Miroslavu Jochovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, nápady a ochotu při konzultacích a zpracování diplomové práce. Děkuji mu také za trpělivost a nadšení, kterým inspiruje své studenty k hlubšímu studiu oboru.

Dále velmi děkuji kolegyním Bc. Michaele Blovské, Bc. Lucii Beranové, Bc. Anně Tomáškové a Bc. Kateřině Kletečkové za pomoc a spolupráci při studiu, četné konzultace a rady.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému partnerovi, rodině a blízkým za neocenitelnou podporu během studia.

Vliv krmení biocharu na obsah fermentačních produktů ve výkalech a stravitelnost krmiva u koní

Souhrn

Mikrobiální fermentace se ve velké míře podílí na zpracování koněm přijaté rostlinné potravy. Složení střevního mikrobiomu koně hraje důležitou roli nejen při trávení vlákniny, ale také ve smyslu komplexního zdraví trávicího traktu zvířete. Náhlá změna krmné dávky, nevhodně zvolený poměr krmných surovin nebo intoxikace nežádoucími látkami v krmivech mohou způsobit rozsáhlou disbalanci prostředí střeva a tím i změnu mikrobiomu a mikrobiální fermentace. Moderní výživa koní se tedy musí zabývat postupy, jak takovým stavům předcházet. Jedním ze slibných řešení problémů spojených s nežádoucími změnami prostředí střeva je využití nových krmných aditiv. Od roku 2010 je takovým aditivem stále více diskutovaný biochar.

Tato práce se věnovala pravidelnému využití biocharu v krmné dávce koní. Biochar má vysokou schopnost adsorpce a díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem působí také jako mediátor redoxních reakcí. Ve výživě zvířat může nacházet uplatnění jako adsorbent nežádoucích látek v krmivu, případně usnadněním přenosu elektronů může zefektivnit katabolické procesy probíhající při metabolismu živin mikroorganismy. V experimentu byl krmen v poměru 1 % sušiny krmné dávky a byly sledovány jeho účinky na stravitelnost krmiv, zastoupení fermentačních parametrů ve výkalech a zvýšení pH výkalů.

Po vyhodnocení pokusu nebyl zaznamenán statisticky významný účinek biocharu ($P > 0,05$) na stravitelnost krmné dávky. Přesto však byla u všech sledovaných parametrů, s výjimkou stravitelnosti škrobu, pozorována číselně vyšší stravitelnost krmné dávky, ve které byl biochar obsažen. Biochar neměl prokazatelný vliv ($P > 0,05$) na obsah fermentačních parametrů výkalů. Bylo však pozorováno významné ($P < 0,05$) zvýšení pH výkalů u koní krmených krmnou dávkou s obsahem biocharu.

Předkládaná práce nastínila možnost využití biocharu v krmné dávce koní, protože u použitého aditiva nebyl pozorován negativní dopad na stravitelnost krmné dávky. Cílem dalších studií je potvrdit, zda je biochar možné využít jako preventivní agens proti disbalanci střevního mikrobiomu koní. Při prokázání jeho pozitivních účinků na stálost prostředí střeva by biochar mohl nalézt využití při potlačování rozvinutí alimentárních chorob koní, jakými jsou průjmová onemocnění, kolika nebo schvácení kopyt.

Klíčová slova: biochar, kůň, stravitelnost, těkavé mastné kyseliny, pH

Effects of Feeding Biochar on the Content of Fermentation Products In feces and Digestibility of Feed in Horses

Summary

Microbial fermentation is largely involved in the digestion of plant tissues by horses. The composition of the horse's intestinal microbiome plays an important role in the digestion of fiber as well as in the health of the animal's digestive tract. Sudden changes in feed ration, improperly selected feeds or intoxication with certain substances in feeds can cause extensive imbalance of the intestinal environment, change in the proportion of microorganisms, and the efficiency of microbial fermentation. Modern horse nutrition must address ways to prevent such conditions.

New feed additives are a promising solution to these problems. Since 2010, biochar has been much discussed.

This diploma thesis was devoted to the regular use of biochar in the feed ration of horses. Due to its physical and chemical properties, biochar has a high adsorption capacity and also acts as a mediator of redox reactions. In animal nutrition, biochar can be used as an adsorbent of undesirable substances in the feed. Also, by facilitating the electron transfer, biochar can make the catabolic processes involved in the metabolism of nutrients by microorganisms easier. In our experiment, biochar was fed at a rate of 1% feed dry matter. We observed its effects on feed digestibility, fermentation parameters, and pH in faeces.

After the evaluation of the experiment, no statistically significant effect of biochar was observed ($P > 0.05$) on the digestibility of the feed ration. However, for all monitored parameters, with the exception of starch digestibility, a numerically higher digestibility of the feed containing biochar was observed. Biochar had no effect ($P > 0.05$) on the content of faecal fermentation parameters. However, a significant ($P < 0.05$) increase in faecal pH was observed in horses fed with biochar.

This presented diploma thesis outlined the possibility of using biochar in the feed ration of horses, because no negative impact on the digestibility of the feed was observed. The aim of further studies is to confirm whether biochar can be used as a preventive agent against imbalance of the intestinal microbiome of horses. If the positive effects of biochar on the intestinal environment are demonstrated, this additive can be used to suppress alimentary diseases in horses, such as diarrhea, colic or laminitis.

Keywords: biochar, horse, digestibility, volatile fatty acids, pH

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1	Cíl práce	9
2.2	Hypotézy	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Alimentární nemoci koní	10
3.1.1	Kolika	11
3.1.2	Toxemie a endotoxemie	12
3.1.3	Mykotoxiny	14
3.1.4	Průjmová onemocnění	16
3.1.5	Laminitida	17
3.1.6	Výživa a alimentární onemocnění koní	19
3.2	Biochar	20
3.2.1	Výroba a získávání biocharu	21
3.2.1.1	Pyrogenní uhlíkaté materiály	21
3.2.1.2	Vstupní suroviny pro výrobu biocharu	22
3.2.1.3	Pyrolýza	23
3.2.1.4	Aktivace	24
3.2.1.5	Analytické složení krmného biocharu	24
3.2.2	Vlastnosti biocharu	25
3.2.2.1	Redoxní aktivita biocharu	26
3.2.2.2	Adsorpce	26
3.2.3	Využití biocharu	27
3.2.3.1	Adsorpce toxických látek	27
3.2.3.2	Biochar jako součást krmné dávky	29
3.2.3.3	Použití biocharu ve výživě koní	30
4	Metodika	31
4.1	Biochar	31
4.2	Zvířata a design experimentu	31
4.3	Krmná dávka	32
4.4	Sběr vzorků výkalů a jejich analýza	33
4.5	Krevní parametry	34
4.6	Fermentační parametry výkalů	34
4.7	Statistická analýza	35

5	Výsledky	36
5.1	Stravitelnost krmné dávky	36
5.2	Krevní parametry	37
5.3	Obsah fermentačních produktů ve výkalech a vliv biocharu na pH výkalů...38	
6	Diskuze	39
6.1	Ovlivnění stravitelnosti krmiv	39
6.2	Ovlivnění krevních parametrů	40
6.3	Fermentační parametry výkalů	42
6.4	Budoucnost zkrmování biocharu koním	43
7	Závěr	45
8	Literatura.....	46

1 Úvod

Díky moderním technologiím a novým výzkumným postupům je současná výživa koní uprostřed kýženého rozvoje. Když byly v roce 1949 vydány první Požadavky pro výživu koní (NUTRIENT REQUIREMENTS OF HORSES), autoři sestavovali krmné dávky často dle požadavků na energetické nároky dojného skotu (NRC 1961). Hintz v roce 1990 píše, že rozvoj krmivářského poradenství zažívá velký rozvoj a majitelé koní tuto službu vyžadují čím dál častěji (Hintz 1990^a). V současné době pozorujeme zájem pochopit souvislosti mezi výživou koní a jejich komplexním zdravím. Zajímavou oblastí tohoto oboru je sekvenování DNA mikrobiální komunity trávicího traktu. Mikrobiotám a mikrobiální fermentaci, probíhající v trávicím traktu zvířat, se všeobecně věnuje významná pozornost. Poslední studie naznačují, že interakce mikrobiot s hostitelem mají značný dopad na celkové zdraví zvířete a v případě disbalance mohou mikroorganismy způsobovat různá onemocnění nejen trávicího traktu, ale i alergie, záněty a rakovinové bujení či mohou zapříčinit změny chování a nálady zvířat (Costa & Weese 2018).

V souvislosti se zkoumáním mikrobiomu a jeho dopadů na zdraví a výkonnost zvířat jsou prováděny i studie zabývající se složením krmných dávek a výzkumem nových krmných komponentů a aditiv. Onemocnění spojená s trávicím traktem byla historicky nejčastější příčinou úmrtí koní a tato skutečnost se ani v současnosti příliš nezměnila (Baker & Ellis 1981; Piezeran et al. 2009; USDA 2017; Tapprest et al. 2019). Nová perspektivně vyhlížející krmná aditiva, jako například biochar, by tedy mohla sehrát významnou roli v podpoře růstu a metabolismu trávicího traktu prospěšných mikrobiot a tím předcházet závažným onemocněním trávicího traktu, jakými jsou endotoxemie, kolika, průjmová onemocnění nebo schvácení kopyt.

Biochar je uhlíkatá látka vznikající pyrolýzou biomasy (Antal & Grønli 2003). Pro své adsorbční schopnosti a redoxní aktivitu byl v minulosti často využíván v rostlinné výrobě pro zvyšování využitelnosti půd, filtraci vody (Major 2010) či snížení ztrát živin z hnoje a kejdy (Godlewska et al. 2017). Od roku 2010 je biochar hojně diskutovaným krmným aditivem (Schmidt et al. 2019). Studie zabývající se dlouhodobým zařazením biocharu do krmné dávky zaznamenaly úspěchy v oblasti zvýšení konverze krmiv u intenzivně chovaných druhů zvířat včetně pozorování zvýšení produkce a kvality vajec, masa i mléka (Toth & Dou 2016). Biochar má také předpoklady pozitivně působit na obranyschopnost organismu. Při několika provedených studiích byl pozorován významný vliv biocharu na snížení počtu parazitů i patogenních bakterií ve výkalech zvířat (Watarai & Tana 2005; Watarai & Koiwa 2008; Chu et al. 2013^b). Dále byla sledována jeho vysoká schopnost adsorbovat toxiny a jiné nežádoucí látky ze svého okolí (Galvano et al. 1996; Naka et al. 2001; Döll et al. 2004; Di Natale et al. 2009; Gerlath et al. 2014); dokonce se předpokládá jeho využití ve snaze snížit emise methanu, který vzniká při mikrobiálním rozkladu v batoru přežvýkavců (Hansen et al. 2012).

Biochar má pro své fyzikálně chemické vlastnosti a prokazatelně pozitivní účinky na trávicí trakt zvířat potenciálně široké využití v živočišné výrobě. Přes stále vzrůstající počet nových probíhajících studií ale dosud nejsou zcela známy mechanismy adsorpce a redoxních dějů ani princip působení biocharu na symbiotické či parazitární mikroorganismy trávicího traktu. Tyto mechanismy je třeba objasnit a jsou tedy předmětem dalšího výzkumu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit účinky podávání biocharu na stravitelnost krmiva a fermentační aktivitu v tlustém střevě koní.

2.2 Hypotézy

Podávání biocharu koním zvýší fermentační aktivitu mikrobiomu ve slepém a tlustém střevě koní. Výsledkem bude:

- vyšší zastoupení fermentačních produktů (těkavých mastných kyselin) ve výkalech koní
- nižší pH výkalů
- vyšší stravitelnost krmné dávky

3 Literární rešerše

3.1 Alimentární nemoci koní

Jedním z ukazatelů kvalitního chovu koní je zdraví chovaných zvířat a jejich dobrá tělesná kondice. Nemocné zvíře snižuje svou výkonnost, a to ve smyslu užítkovosti, sportovních úspěchů i reprodukce (Dušek et al. 2011). Povinností a zájmem chovatele je přizpůsobit management chovu tak, aby zvířata byla zdravá a prospívala. Jakékoliv onemocnění znamená zvýšené finanční náklady spojené se sníženou užítkovostí v chovu i sportu. I u zájmově chovaných koní je léčba nemocného zvířete spojená s vyššími výdaji za veterinární péči.

Nejčastějším onemocněním, které vede k úhynu dospělých koní bez ohledu na jejich využití, je onemocnění trávicího traktu (Baker & Ellis 1981; Piezeran et al. 2009; USDA 2017; Tapprest et al. 2019).

Studie zabývající se mortalitou koní přisuzují alimentárním onemocněním často přední příčky. Baker & Ellis (1981) publikovali studii zabývající se příčinami úmrtí v Anglii chovaných koní v letech 1958 až 1980. Zjistili, že nejčastější příčinou úmrtí koní od 4. roku věku byly nemoci spojené s gastrointestinálním traktem (GIT), jmenovitě strangulace, perforace a malabsorpce, následovány nespecifickými záněty trávicího ústrojí. Podíl úhynu zvířat na tato onemocnění byl 33 %. Podobně rozsáhlou studii publikovali Piezeran et al. (2009). Data pocházela z Brazílie z let 1968 až 2007. Z 335 koní zemřelo na následky onemocnění GIT 23,6 % z nich. Novodobější data o příčinách úhynu koní lze získat také z databází pojišťoven či centralizovaných databází veterinárních lékařů. Resumé od autorů Tapprest et al. (2019) přisuzuje onemocněním trávicího traktu až 47 % úmrtí dospělých koní. Anglická studie autorů Ireland et al. (2011) se zabývá důvody úmrtí či eutanázie starých koní. I v tomto případě je onemocnění GIT na předních příčkách: 20,7 % koní umírá nebo je utraceno z důvodu kolikového onemocnění. Dle takových výsledků můžeme soudit, že zdraví trávicího traktu hraje v dlouhověkosti koní zásadní roli.

Primární funkcí trávicího traktu je příjem potravy, její natrávení, absorpce metabolizovaných látek a vody. Gastrointestinální trakt dále udržuje stálost vnitřního prostředí těla tím, že reguluje charakter těchto adsorbovaných látek a také jejich množství. Onemocnění GIT narušují jeho primární funkce a projevují se abnormalitami motility, sekrece, samotného trávení i poruchami absorpce (Radostits et al. 2006).

Mezi častá onemocnění trávicího traktu ovlivňujících jednu či více primárních funkcí GIT řadíme koliku, endotoxemii, otravu mykotoxiny, průjmová onemocnění a laminitidu.

3.1.1 Kolika

Kolika je soubor bolestivých projevů břicha. Provází ji charakteristické chování koně a je ukazatelem probíhajícího onemocnění trávicího traktu (Mair & Hillyer 1997).

Ročně kolika postihuje až 10,6 % domestikovaných a chovaných koní (Archer & Proudman 2006). Počty případů koliky u koní jednotlivých chovatelů se liší. Můžeme tedy předpokládat, že důležitým faktorem ve vzniku onemocnění trávicí soustavy není pouze predispozice zvířete, ale také management chovu (Cohen 2009).

Radostits et al. (2006) uvádí systém klasifikace kolikového onemocnění u koní podle důvodu jejího vzniku. Příčiny koliky rozděluje na:

- Obstruktivní
- Obstruktivní a strangulační
- Nonstrangulační infarktivní
- Zánětlivá

Autoři koliku dále klasifikují i podle fáze jejího trvání, a to na akutní, chronickou a opakující se. Kolika se projevuje bolestí břicha a neklidem, kůň často ulehá a vstává. Zvířata postižená kolikou se do bolestivého břicha také šťouchají nebo kopou. Bolesti provází častější močení a kálení.

Etiologie koliky je rozsáhlá (Frape 2006) a kromě příčin, jakou je prostá obstrukce trávicí trubice například potravou nebo ischemie části trávicího ústrojí, Radostits et al. (2006) uvádí i zánětlivou reakci sliznice žaludku a střev. Jako původce tohoto zánětu zmiňuje kromě chemických dráždivých i bakterie rodu *Salmonella* nebo druh *Actinobacillus equuli*.

Jako u každé nemoci i u koliky platí, že je snadnější onemocnění předcházet než ho léčit. Mnoho autorů se proto zabývá rizikovými faktory, díky kterým můžeme případnou náchylnost zvířete ke kolice předpovídat. Mimo faktory vnitřní, jakým je pohlaví, věk nebo plemeno, se ve studiích setkáváme i s dalšími spouštěcími mechanismy, mezi které patří technika krmení, kvalita a složení krmné dávky, ale třeba i způsob a frekvence napájení zvířat. Autoři se zaměřují i na parazitární onemocnění nebo hledají spojení mezi předchozí medikací koně (která se nemusí vždy nutně týkat právě léčení kolikových onemocnění) s budoucím propuknutím kolikových příznaků (Gonçalves et al. 2002). Chovatelé často nemají možnost ovlivnit rizikové vnitřní faktory svého zvířete, podobně nemohou ovlivnit ani předchozí medikaci koně. Vzdělaný chovatel a zootechnik by ale měl být seznámený s rizikovými faktory pojícími výskyt koliky se složením krmné dávky a managementem chovu. Častější propuknutí nemoci spojují Geor et al. (2013) například s vysokým podílem jádra v krmné dávce, nedostatečnou či omezenou pastvou, nekvalitními krmnými surovinami a náhlými změnami v krmné dávce.

Rizikové faktory koliky spojené s krmením koní pozorovali také autoři Hudson et al. Svou rozsáhlou studii dokončili v roce 2001 a výsledky ročního pozorování, do kterého se zapojilo 25 veterinárních lékařů a více než 360 koní, napomohly bližšímu pochopení příčin

vzniku koliky. Studie poukazuje mimo jiné na problematiku kvality sena a jeho skladování. Z výsledků vyplývá, že větší riziko koliky představuje zkrmování kulatých balíků vícedruhového lučního sena než například sena volně loženého či balíkového, avšak jednodruhového. Zvýšený výskyt koliky byl navíc zaznamenán vždy s počátkem zkrmování nového balíku. V tomto případě může hrát významnou roli nevhodné skladování, při kterém se v seně mohou vytvářet podhoubí plísní. Jak již bylo zmíněno dříve, u jednodruhového vojtěškového a troskutového sena (čeleď lipnicovité) příznaky koliky nebyly zaznamenány. Naopak u méně kvalitního sena s vyšším obsahem vlákniny, a tedy nižší celkovou stravitelností sušiny, trpěla zvířata kolikou častěji. Náhlá úprava dávky jaderného krmiva nebo obměna druhu jádra byla také původcem křečových stavů u pozorovaných koní. Je známo, že změna krmné dávky v tomto případě způsobuje snížení pH ve slepém a tlustém střevě koní a zvyšuje koncentraci laktátu ve střevě. Jsou pozorovány i změny v zastoupení iontů v trávenině. Mikrobiom střeva se mění, což vede k možným potížím s trávením (Clarke et al. 1990).

Doporučenou léčbou koliky je – kromě podávání analgetik a manuálního uvolnění překážek trávicího traktu – zejména korekce trávicích šťáv, nastolení acido-bazické rovnováhy a rovnováhy elektrolytů (Radostits et al. 2006). Autoři také nabádají k výběru kvalitních krmných surovin do krmných dávek.

Shrneme-li výsledky posledních studií a poznatky z praxí veterinárních lékařů, nutně dojdeme k závěru, že nejlepší prevencí kolikového onemocnění je kontrola kvality krmných surovin a péče o zdraví trávicího traktu zvířete. Správné fungování střeva koně dále ovlivňuje jeho ustálené mikrobiální prostředí (Geor et al. 2013).

3.1.2 Toxemie a endotoxemie

Toxemie je obranný mechanismus organismu, který se projevuje při poranění tkání a průniku bakteriálních toxinů do krevního řečiště. Jednou z forem toxemie u velkých zvířat je endotoxemie, kterou nejčastěji způsobuje nadlimitní koncentrace lipopolysacharidů buněčné stěny gram-negativních bakterií v krvi. (Radostits et al. 2006).

Endotoxemie a následný syndrom systémové zánětové odpovědi (SIRS) patří mezi jevy provázející mnoho onemocnění trávicího traktu (Bryant & Moore 2008). Historicky byla endotoxemie považována za primární onemocnění, avšak v současnosti je spíše zastáván názor, že tato zánětlivá odpověď je pouze následkem jiných probíhajících chorob (Moore 1988). Kromě zánětlivých onemocnění vnitřních orgánů (Radostits et al. 2006) spojujeme endotoxemii s výskytem koliky či s nadměrným příjmem škrobu v nevyvážené krmné dávce (Frape 2006).

Při popisu toxemií se můžeme setkat s jejich dodatečným řazením do skupin podle agens, které spouštějí imunitní reakci. Vznik endotoxemie je spojován s několika typy toxinů, které lze dělit na metabolické a antigenní. Metabolické toxiny jsou toxiny tělu vlastní, které tělo kvůli selhání detoxikačních mechanismů nebo kvůli jejich obrovskému množství není schopné bezpečně vyloučit (Radostits et al. 2006). Mezi antigenní toxiny řadíme exotoxiny, enterotoxiny a endotoxiny (Burrows 1981).

- Exotoxiny jsou produktem bakterií, které je jako odpad svého metabolismu šíří do svého okolí (Radostits et al. 2006). Onemocnění zvířat nejčastěji způsobují exotoxiny produkované druhem *Clostridium* spp., což je běžný komenzál střev koní (Jullian & Grimm 2016). Nemoci spojené s uvolňováním těchto exotoxinů postihují i skot, u koní se otrava toxiny clostridií nazývá botulismus.
- Enterotoxiny účinkují zejména na mukózu GIT. Způsobují poruchy propustnosti střeva a disbalanci elektrolytů. Nejznámějším zástupcem je enterotoxin bakterie *E. coli* způsobující těžké průjemy u mláďat.
- Endotoxiny jsou lipopolysacharidy pocházející z buněčných stěn bakterií. Do prostředí střeva se dostávají při masivní proliferaci buněk či častěji během rozpadu buněčných stěn odumírajících gram-negativních bakterií. Tyto bakterie jsou běžnou součástí střevního mikrobiomu koní, stejně tak jsou běžně přítomny i endotoxiny. Vlivem zánětu, změnou pH ve střevě či jiným narušením prostředí střeva se endotoxiny dostávají přes střevní stěnu do krve. Při nadměrném průniku endotoxinů do krve selhává schopnost těla tyto látky filtrovat a bezpečně likvidovat. Následkem tohoto stavu je úhyn zvířete (Radostits et al. 2006).

Velmi častým typem endotoxemie u koní je ten spojený s masivním průnikem endotoxinů přes lumen střeva do krve. V tomto případě však nehraje roli jen přítomnost endotoxinů, nýbrž i změněné prostředí trávicího traktu. Lumen střeva i za normálních okolností obsahuje velké množství gram-negativních bakterií. Ty při své proliferaci i zániku uvolňují endotoxiny do okolí, což způsobuje, že ve střevě je jejich koncentrace poměrně vysoká. V průniku do oběhové soustavy zvířete jim brání mukózní bariéra střeva, složená z epiteliálních buněk a jejich sekretů. Součástí této slizniční bariéry jsou mimo jiné i buňky dalších komenzálních bakterií. Ochranná bariéra ale není úplně nepropustná. Endotoxiny pronikající do krve jsou však aktivně fagocytovány v játrech a organismu, a tedy nezpůsobují žádné větší potíže. Propustnost slizniční membrány mohou naneštěstí narušit některé nemoci jako ischemie střevní stěny, záněty nebo zmíněný nadměrný příjem škrobu a s ním spojené změny prostředí ve střevě. Průnik endotoxinů do krve je v tomto případě tak velký, že monocyty nestačí částice fagocytovat (Moore & Barton 2003). Endotoxiny mají kvůli přehlcení retikulohistiocytárního systému volnou cestu i do peritoneální dutiny, odkud mohou volně přecházet do periferního krevního oběhu. Následuje masivní zánětlivá reakce organismu, kdy endotoxiny pronikají do jednotlivých tkání orgánů. Kaskáda dalších reakcí těla zahrnuje i poruchy kardiopulmonárního systému, které vedou k nedostatečnému prokrvování orgánů a periferní hypoxii. Pokud tento stav není diagnostikován a léčen, může vést až k úhynu zvířete (Kelmer 2009).

Při včasné odhalení příznaků endotoxemie je nutné urychleně zahájit léčbu. Moore a Barton (2003) ji rozděluje do 4 skupin:

- Prevence průniku endotoxinů do krevního oběhu
- Neutralizace endotoxinů
- Prevence nebo redukce syntézy či uvolnění mediátorů zánětu

- Přerušeni reakce buněk na přítomnost endotoxinů

Pro boj s endotoxemií již byla vyvinuta i vakcína (Lohmann & Barton 2014), její plošné využití v chovech koní ale bohužel není povoleno. V EU se v léčbě endotoxemie využívá několik málo anti-endotoxinových látek jako Pentoxifylin a Polymyxin B (Evropská komise 2013). Nejlepší léčbou tedy stále zůstává prevence zánětlivých a kolikových onemocnění vhodným managementem chovu (Bryant & Moore 2008).

3.1.3 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou chemické látky produkované plísněmi. Nalézáme je v objemných i koncentrovaných krmivech (Osweiler 2001) a považujeme je za nežádoucí látky. Plísně produkují mykotoxiny jako sekundární metabolity, takže spíše než při růstu jsou do prostředí uvolňovány při stresu jako obranný mechanismus houby. (Geor et al. 2013). Mezi stresové faktory patří sucho, teplota vyšší nebo nižší než životní optimum plísně, změna vlhkosti prostředí a porušení houbového mycelia hmyzem nebo mechanicky, například při sklizni rostlin, na kterých plíseň roste. Vláknité houby potřebují pro svůj růst zdroj sacharidů (škrob nebo celulózu), vlhké prostředí, kyslík a vhodnou teplotu, obvykle v rozpětí 12 až 25 °C (Osweiler 2001).

Koně jakožto monogastriční zvířata mohou být vůči plísním a jejich produktům náchylnější (Liesener et al. 2010). Hintz (1990^b) toto tvrzení ve svém článku zpochybňuje a poukazuje na častá onemocnění dalších domácích zvířat spojených s mykotoxikózou. Zároveň však dodává, že přítomnost plísní v krmivu u koní často způsobuje koliky, aborty, hemoragie a respirační problémy. Všechna tato onemocnění mohou vést až ke smrti zvířete.

Existuje více než 100 tisíc druhů plísní, jen málo z nich je však zdraví škodlivých a některé jsou zvířatům či lidem prospěšné (Hintz 1990^b). Cole a Cox (1981) shrnují poznatky o dosud zkoumaných druzích plísní a počet škodlivých druhů produkujících mykotoxiny odhadují na 300. Liesener et al. (2010) prováděli rozsáhlou studii komerčně vyráběných a prodávaných krmiv pro koně, kde stanovoval obsah mykotoxinů legislativně vytyčených druhů, ale také mykotoxinů, pro které EU zatím oficiálně limit nestanovila. Rozbory byly provedeny u 62 vzorků krmiv, nejvíce zastoupeným kompletním krmivem bylo müsli. Autoři pro svou studii nastavili poměrně přísná kritéria a například T-2 a HT-2 mykotoxin byli schopni určit již od obsahu 0,1 µg na kg krmné směsi. Není proto překvapením, že tyto dva toxiny spolu s deoxynivalenolem byly obsaženy ve všech vzorcích. 98 % vzorků také obsahovalo zearalenon s limitní hodnotou pro zachycení látky 5 µg na kg vzorku. Fuminosin byl obsažen v 94 % krmiv s limitní hodnotou detekce 2 µg na kg vzorku. Z provedené studie můžeme vyvodit, že mykotoxiny jsou často součástí krmiv a krmných dávek produkčních i mimoprodukčních zvířat. Je tedy otázkou, jaký obsah mykotoxinů již ohrožuje zdraví zvířete.

Komise evropské unie nařizuje kontrolovat obsah aflatoxinu B1 a námelových alkaloidů v krmivech a krmných surovinách. Kontrola koncentrace ochratoxinu A, zearalenonu,

deoxynivalenolu a fumonisinu je evropskou komisí zatím stále jen doporučena. Konkrétní směrná hodnota pro krmiva určená koním je stanovena jen pro fuminosin a odpovídá množství 5 mg mykotoxinu na kg krmné směsi. Pro ostatní mykotoxiny jsou limitní hodnoty odvoditelné z limitů pro krmnou směs či surovinu (Evropská komise 2011; Evropská komise 2016). Je tedy povinností chovatele či krmiváře, aby dbal na kvalitu krmných surovin a krmivo zasažené plísněmi nekrmil, případně využil přípravků či postupů ke zmírnění účinků jejich jedovatých produktů.

V současné době jsou nejvíce sledovanými mykotoxiny námelové alkaloidy, aflatoxin, zearalenon a fumonisiny.

Ergotamin a ergometrin jsou námelové mykotoxiny. Produkuje je houba paličkovice nachová, parazitující zejména na žitě, ale i dalších travách. Její vyšší zastoupení v seně nebo pastvě může způsobovat otravy, aborty, kolísání krevního tlaku a změnu průchodnosti cév (Frape 2006).

Aflatoxin je produkován plísní rodu *Aspergillus flavus*, způsobuje léze na mozku, srdci a játrech, které vedou až ke smrti zvířete, a to už od koncentrace 1 mg na kilogram krmiva. Cysewski et al. (1982) zaznamenali rozvoj závažných onemocnění již při experimentálních dávkách 0,075 mg na kg krmné dávky. Vážná onemocnění vedoucí k utracení zvířat byla při této dávce pozorována po 36 až 39 dnech. Maximální možná hodnota obsahu aflatoxinu v krmné surovině je nařízením evropské komise stanovena na 0,02 mg/kg, u doplňkových krmných směsí na 0,01 mg/kg. Pro dojnice a mláďata je stanoven limit 0,005 mg aflatoxinu na kilogram krmné dávky. Pro koně žádná konkrétní limitní hodnota obsahu aflatoxinu v krmivu stanovena není (Evropská komise 2011).

Jedním z významných toxinů, který produkuje plísně rodu *Fusarium*, je bezpochyby zearalenon. Způsobuje poruchy reprodukce u domácích zvířat, zejména samic. Zatímco dříve zmíněný aflatoxin je plísněmi produkován až při skladování krmné suroviny, zearalenon je na rostlině přítomný již při jejím růstu. (Frape 2006). Geor et al. uvádí bezpečnou limitní hodnotu zearalenonu v kilogramu krmiva 5 µg, maximální přípustnou hodnotu pak 2-3 mg na kilogram krmné dávky denně. Evropská unie konkrétní limitní hodnotu zearalenonu v krmivech u koní neurčuje (Evropská komise 2011).

Dalšími mykotoxiny spadajícími pod produkty plísní rodu *Fusarium* jsou fumonisin, T-2 toxin, HT-2 toxin a deoxynivalenol, známý také jako vomitoxin. Fumonisin jsou často spojovány s otravami při krmení kukuřice a jejích produktů. U koní jsou původcem equinní leukoencefalomalacie (ELEM) (Osweiler 2001). Při pokusném podávání fuminosinů v krmné dávce stačilo množství 0,6 mg na kilogram krmné směsi pro vznik těžkého ELEM (Wilson et al. 1990). T-2 toxin, HT-2 toxin a vomitoxin souhrnně řadíme mezi trichotheceny. Trichotheceny postihují kukuřici a další obilniny, nejvíce se jim daří v chladnějších zeměpisných oblastech, kde se častěji střídají vysoké a nízké teploty vzduchu. Jejich přítomnost v krmivu způsobuje snížený příjem krmné dávky. Při zkrmování surovin znehodnocených T-2 toxinem u zvířat pozorujeme kožní léze, záněty trávicího traktu a průjem. Dlouhodobě

vystavení T-2 toxinu vede k selhání kardiovaskulárního systému a ke smrti. Nesnadno řešitelnou je u trichothečenů jejich významná stabilita. Odolávají zvýšenému tlaku, vysokým teplotám i změnám pH (Osweiler 2001).

Mykotoxikózám lze předcházet například omezeným zkrmováním krmných komponentů s obsahem vody nad 20 %, ve kterých mají plísňě ideální podmínky pro množení. Je také na uvážení chovatele, zda krmit plodiny, které jsou houbami napadány již při růstu. Například *Claviceps* spp. parazituje na žitě i jiných lipnicovitých a zvíře může být jejím toxinům vystaveno již při pastvě. Vhodné je také omezit zkrmování viditelně plesnivého sena. Ačkoli ne všechny plísňe mykotoxiny vytvářejí, není takové krmivo vhodné krmit ve větším množství. Aktivním opatřením může být i ošetření porostů fungicidy nebo přidání krmných aditiv ke krmné dávce. Mezi taková aditiva patří zvláště absorbenty, například biochar, bentonit a zeolit (Radostits et al. 2006).

3.1.4 Průjmová onemocnění

Častější kálení, změna struktury výkalů, abnormální pach spojený s defekací nebo atypické příměsi ve výkalech jsou známkou průjmového onemocnění (Chapman 2009). Akutní diarea je příznakem probíhajícího onemocnění střev, nejčastěji doprovází zánět tlustého střeva. Zhoršená absorpční funkce střevní výstelky se – kromě vodnatých výkalů – dále projevuje kolikou, dehydratací a endotoxemií. Tyto stavy postupně uvádí organismus do šoku a v některých případech vedou až k úhynu zvířete. Základní příčinou průjmu je narušení přirozeného střevního mikrobiomu, které vede k pomnožení nežádoucích patogenů, změnám střevní motility, ztrátám střevních šťáv a disbalanci elektrolytů. U hřibat jsou příčiny průjmů jiné než u dospělých koní, přesto u více než 60 % případů není zjištěna primární příčina (Oliver & Stämpfli 2006).

Průjem trvající 7 až 14 dní považujeme za chronický (Mair 2002). Při chronických obtížích se střídají období optimální skladby výkalů s etapami, kdy mají výkaly změněnou strukturu a připomínají spíše výkaly skotu (Valle et al. 2013). Při defekaci nebo nezávisle na ní u koní pozorujeme i vylučování výkalů prosté vody. Tato tekutina způsobuje potřísnění ocasu a zadních nohou a je spojována s kožními vyrážkami a lézemi na zadních končetinách koní (Kienzle et al. 2016). U dospělých koní je příčinou chronického průjmu téměř výhradně zánět tlustého střeva, konkrétně céka, anebo kolonu. Záněty jsou způsobeny mechanickým poraněním střevní stěny nebo poruchou fyziologických funkcí střeva (Mair 2002). Kromě těchto nejčastějších příčin mohou průjem dále způsobovat parazitární a bakteriální infekce a poruchy sliznice, které znemožňují vstřebávání natrávených látek. Záněty způsobuje i písek přítomný v trávenině nebo probíhající medikace nesteroidními léky (Valle et al. 2013). Samostatnou kapitolou je narušení mikrobiomu při léčbě antibiotiky (Harlow et al. 2013).

Případy akutních i chronických průjmů mají stejného činitele a tím je nerovnováha prostředí střeva, následována změnou mikrobiomu. Kromě tak invazivních příčin, jakým je

například mechanické poškození stěny střeva, může ideální prostředí pro mikroorganismy ovlivnit i na první pohled banální změna krmné dávky.

Pro zažívací trakt koně – zejména pro slepé střevo, uzpůsobené pro trávení potravy s vysokým obsahem vlákniny – je koncentrované krmivo rizikovým faktorem (Geor et al. 2013), protože tenké střevo koňovitých produkuje poměrně nízké množství alfa-amylázy a koně škrob nejsou schopni dostatečně zpracovat a strávit (Richards et al. 2004). Nestrávený škrob slouží jako výborný zdroj energie pro acidofilní sacharolytické druhy mikroorganismů, které jsou za normálních okolností ve střevě přítomny v omezené míře. Jejich rychlý rozvoj a pomnožení mění prostředí střeva, což vede ke kaskádě událostí zakončenou narušením mukózní bariéry kaudální části trávicího traktu (Geor et al. 2013).

3.1.5 Laminitida

Termínem laminitida, v české terminologii schvácení kopyt (Švehlová 1999), nazýváme zánětlivou reakci škáry kopyta nebo paznehtu (Hood 1999). Schvácení kopyt je způsobeno poškozením primárních a sekundárních lamel škáry, které vede k rozvolnění spojů mezi kopytní stěnou a kostí třetího článku prstu (Pollitt 2004).

V současnosti se na laminitidu pohlíží spíše jako na syndrom než na samostatné onemocnění (Geor et al. 2013). Pokud dnes mluvíme o laminitidě, máme na mysli typické klinické projevy, například typický postoj a kulhání, výrazně hřející kopyta a nepravidelný puls prstové tepny (Hood 1999). Přestože za vznikem laminitidy může být mnoho pozorovaných příčin, Harris a Geor (2010) rozřadili původce vzniku degradace škáry do tří kategorií:

1. Sepse/systémová zánětlivá odpověď organismu
2. Endokrinní/metabolické příčiny
3. Mechanické přetížení (Obr. č. 1)

KATEGORIE	JEDNOTLIVÉ PŘÍČINY
SEPSE/SYSTÉMOVÁ ZÁNĚTLIVÁ ODPOVĚĎ ORGANISMU	Gastrointestinální choroby, metritida, pneumonie, nadměrný příjem škrobu
ENDOKRINNÍ/METABOLICKÉ PŘÍČINY	Insulinová rezistence, obezita, malfunkce šišinky
MECHANICKÉ PŘETÍŽENÍ	Syndrom přetížení podpůrné končetiny při úrazech

Obr. č. 1: Kategorie příčin vzniku laminitidy, Harris a Geor (2010)

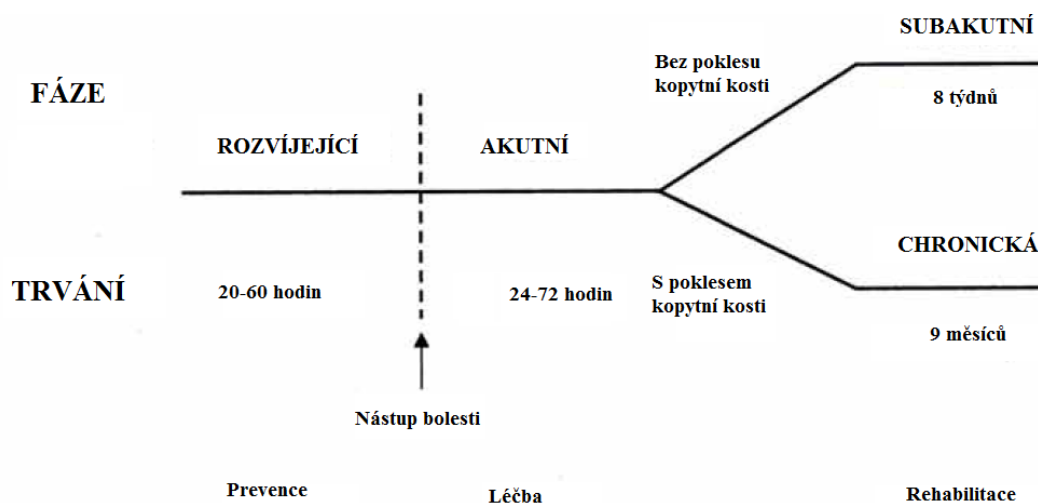
Výživa koní je jedním z důležitých faktorů vzniku laminitidy. Už kolem roku 350 před naším letopočtem Aristoteles použil výrazu „ječná nemoc“ jako jasný odkaz na vznik laminitidy po zkrmení nadměrného množství ječmene. Od sedmdesátých let dvacátého století hraje

překrmění škrobem největší úlohu při pokusech snažících se laminitidu experimentálně vyvolat (Harris 2011). Vznik laminitidy je tedy spojován s desítkami možných příčin, početné vědecké studie jich zatím prokázaly pouze pět. Následující látky způsobují zánět kopytní škáry, pokud jsou přijímány ve zvýšeném množství a organismus je současně nedokáže dostatečně rychle využít či odbourat. Jmenovitě je to již dříve tolikrát zmiňovaný škrob, dále oligofruktóza, fruktóza, inzulín a antinutriční látky obsažené v ořešáku černém (Heymering 2010).

Vrátíme-li se k syndromu schvácení kopyt, mnoho autorů řadí projevy zánětu škáry do několika stádií. Detailní popis zpracoval například Eustace (2010):

- Rozvíjející se fáze onemocnění – časový úsek mezi událostí způsobující laminitidu (dieta, toxiny, ...) a jejím projevem ve fyziologii kopyta či chování zvířete.
- Laminitida – objevuje se kulhání charakteristické pro toto onemocnění a je hmatný zvýšený tep na cévách zásobujících krví postižený prst. Tah hlubokého ohybače prstu na kost třetího článku prstu není z druhé strany kompenzován tahem elastické tkáně. V důsledku poškození škárových lamel táhne zmíněný sval prst za sebou, kost se vzdaluje od kopytního pouzdra a přibližuje se k chodidlovému okraji. Tento proces je vysoce bolestivý. Postižené zvíře se snaží ulevit tlaku špičky kosti na chodidlový okraj kopyta a zaujímá typický postoj s vahou na patkách a odlehčenými špičkami kopyta. Pokud je postižena jen jedna končetina, kůň přenáší váhu na zdravou nohu.
- Akutní pokles kopytní kosti – kůň v tomto stavu se označuje jako „Founder“. Projevují se klinické příznaky laminitidy, na korunkové obrubě lze pozorovat propad směrem dovnitř kopyta. Ten je způsobován změnou polohy kosti prstu, konkrétně jejím sestupem k chodidlovému okraji. Čím větší je pokles hrotu kopytní kosti, tím hlubší je prohlubeň obruby.
„Sinker“ – tak je označován kůň s extrémními klinickými projevy nemoci. Postižené zvíře není schopno pohybu, obrubová prohlubeň je patrná po celé délce obvodu kopyta.
- Chronický pokles kopytní kosti – kopyto postiženého zvířete se vyznačuje vypouklým konkávním tvarem dorzální kopytní stěny, abnormálně širokou bílou čarou a přítomností tzv. „růstových kruhů“ po obvodu kopyta. Tyto kruhy představují abnormálně narostlou rohovinu způsobenou poklesem kopytní kosti a tím i poklesem obrubového okraje. Patologické změny jsou nejvíce patrné na patkách kopyta, kde jsou kruhy nejširší. Patky často přerůstají. Obruba však už nevykazuje žádné morfologické změny a fyziologicky navazuje na kůži spěnky.

V návaznosti na časovou osu onemocnění vytvořil Hood (1999) přehledný graf (Obr. č. 2):



Obr. č. 2. Fáze laminitis. Převzato a upraveno od Hood (1999)

3.1.6 Výživa a alimentární onemocnění koní

Výživa koní se v současnosti zabývá prakticky stejnými krmivářskými výzvami jako v minulém století. Je nutné pamatovat na to, že sestavujeme krmnou dávku pro zvíře, které se během své evoluce po většinu dne páslo na chudých pastvinách (Pratt-Phillips et al. 2011). Zatímco u koní a poníků chovaných pro rekreační účely můžeme tento způsob výživy zachovat, u sportovně využívaných koní je komplexní krmivářství, zahrnující vytvoření krmné dávky vyhovující jak energetickou hodnotou, tak složením a působením na trávicí trakt koně, často výzvou. Koně krmení špatně sestavenou krmnou dávkou nezřídka trpí některou z alimentárních nemocí (Frape 2006).

Moderní výživa koní má však možnost ve svůj prospěch využít řadu kvalitních krmivářských plodin a aditiv. V posledním desetiletí se jedním ze slibných krmných aditiv jeví biochar (McHenry 2010). Díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem by mohl figurovat při prevenci kolik, laminitidy či průjmových onemocnění (Schmidt et al. 2019). Adsorpční schopnosti biocharu by mohly být využity pro vyvazování mykotoxinů a jiných nežádoucích látek z krmiva (Villalba et al. 2002), stejně jako pro potlačení rozvoje škodlivých mikroorganismů v trávicím traktu (Watarai & Tana 2005). Mnohé studie zabývající se využitím biocharu ve výživě hospodářských zvířat prokázaly jeho pozitivní účinky na jejich zdraví i užitkovost. Ačkoliv je pravidelné zkrmování biocharu zatím jen předmětem studií, můžeme snad v budoucnu očekávat jeho častější využívání v běžné krmné dávce hospodářských i zájmových zvířat (Toth & Dou 2016).

3.2 Biochar

Biochar je látka bohatá na uhlík, která vzniká procesem pyrolýzy (Antal & Grønli 2003). Má pórovitý povrch a díky němu i bohatou sorpční schopnost, škála jeho použití je proto značně široká. Biochar je ve velké míře využíván v zemědělství – zlepšuje vlastnosti půd a detoxikuje vodu. V posledním desetiletí je stále častěji využíván jako krmné aditivum s účelem pozitivně ovlivnit vlastnosti krmné dávky vysokoprodukčních hospodářských zvířat (Man et al. 2021).

Biocharu podobné látky na bázi uhlíku, označované jako živočišné nebo aktivní uhlí, jsou známým léčivým přípravkem. V humánní i veterinární medicíně se jich stále hojně užívá jako léku proti poruchám trávení a při akutních intoxikacích (Decker & Corby 1970). Pro účely krmivářství se termín biochar používá od roku 2010 a jedná se o označení aditiva, vznikajícího z konkrétních surovin přírodního původu za stanovených fyzikálních podmínek (Hagemann et al. 2018). Na rozdíl od dříve zmiňovaného aktivního uhlí, které je indikováno jako léčivý přípravek při akutních zdravotních obtížích, je primárním účelem biocharu jeho pravidelné a dlouhodobé podávání spolu s krmnou dávkou. Díky svým pozitivním účinkům na gastrointestinální trakt by toto aditivum mohlo sloužit jako prevence onemocnění trávicího traktu a intoxikací nežádoucími látkami v krmivech (Toth & Dou 2016).

Primární oblastí využití biocharu je bezpochyby odvětví rostlinné výroby a ekologie půd. Uhlík obsažený v biocharu podléhá pomalejší degradaci, a v půdách tak zůstává po mnoho let. Biochar má také příznivý vliv na zadržování vody a nutrientů v půdě, mimo jiné je využíván i v zemích třetího světa pro zvýšení produkce potravin a krmiv (Major 2010). Přimíchávání biocharu do kompostu, kejdy či hnoje vedlo k vyšší stabilizaci nutrientů v těchto materiálech a došlo tak ke zvýšení obsahu živin, které rostliny mohly čerpat (Godlewska et al. 2017). Biochar obecně zamezuje ztrátám živin z hnojiv, například snižuje míru uvolňování dusíku při zrání kompostů (Steiner et al. 2010).

Biochar vznikající pyrolýzou biomasy je netoxický, a tedy jedlý. Při požití neprochází v trávicím traktu katabolickými procesy a zvířata ho vylučují s výkaly v nezměněné formě, další výzkumy se proto zabývaly možností toto aditivum zvířatům přímo krmit. Kromě obohacení budoucího hnoje biocharem tyto praktiky vedly i ke snížení uvolňování zápachu z výkalů, a tedy ke zlepšení mikroklimatu ve stájích (Schmidt et al. 2019). Biochar se však přímo do stájového steliva přidává i nadále. Kromě omezení zápachu výkalů a moče bylo při přimísení 5–10 % biocharu do podestýlky pozorováno snížení výskytu onemocnění paznehtů a kopyt (O'Toole et al. 2016). V praxi se užívá i mísení biocharu do jímek s kejdou. V jímkách toto aditivum tvoří na povrchu kejdy kompaktní vrstvu, která pomáhá redukovat zápach a uchovávat v ní nutrienty pro pozdější přihnojování rostlin (Kammann et al. 2015).

Od roku 2010 je biochar stále častěji diskutován jako krmné aditivum. Pro své adsorbční schopnosti je míchán do siláže nebo jiných komponentů krmných směsí. Jedním z důvodů jeho používání je vazba nežádoucích látek, které mohou být v těchto krmivech obsažené, na svůj aktivní povrch (Pereira et al. 2014).

3.2.1 Výroba a získávání biocharu

Biochar je látka pevného skupenství, která vzniká termochemickým rozkladem organických látek za částečně nebo úplně omezeného přístupu kyslíku (Ahmad et al. 2014). Dle definice Mezinárodní iniciativy pro biochar (International Biochar Initiative – IBI) je za tento termochemický rozklad považována pyrolýza (pyrolysis) nebo zplyňování (gasification) (IBI 2018^a). V některých studiích se tento výrobní proces souhrnně označuje jako karbonizace (Cha et al. 2016) a biochar ho sdílí s dalšími látkami s převážně uhlíkatým základem sušiny – dřevěným a aktivním uhlím. Zmíněné látky označujeme jako pyrogenní uhlíkaté materiály (Lehmann & Joseph 2015).

3.2.1.1 Pyrogenní uhlíkaté materiály

Dřevěné uhlí (charcoal) je využíváno pro potřeby vytápění a vaření. Vstupní surovinou pro jeho výrobu je nejčastěji palivové dřevo. Je vyráběno prostou pyrolýzou bez následné aktivace a jiných úprav (Man et al. 2021).

Aktivní uhlí (activated charcoal) na svůj povrch adsorbuje kontaminanty a rezidua nežádoucích chemických sloučenin z půd, vody i vzduchu. Ve velké míře je využíváno při filtraci a purifikaci vod (Hagemann et al. 2018). V humánní i veterinární medicíně je indikováno při intoxikacích, otravách nebo při předávkování léčivy. Doporučuje se podávat jako podpůrný doplněk stravy při léčbě průjmových onemocnění, nadýmání nebo jiných poruchách trávení. Vstupní surovinou pro výrobu aktivního uhlí jsou dřevěné piliny, rašelina, hnědé a černé uhlí, ropný koks aj. Výrobní proces zahrnuje pyrolýzu při vysoké teplotě a následnou aktivaci. Aktivace je prováděna chemicky – kyselinami nebo anorganickými solemi, po ní následuje aktivace fyzikální – vodní parou nebo oxidem uhličitým či ozonem (Man et al. 2021).

Biochar se původně ve větší míře uplatňoval zejména při sanaci a úpravách půd. Lze jej použít i pro purifikaci vody a zlepšení schopností půd zadržovat živiny a vodu. Pro své adsorbční a detoxikační vlastnosti je stále častěji také využíván jako krmné aditivum s předpokladem využití jeho kladných vlastností v běžné krmné dávce (Schmidt et al. 2019). Fyzikální a chemické vlastnosti biocharu jsou ovlivněny několika faktory, mezi které patří volba vstupního materiálu, teplota, při které látka vzniká, a doba chemicko-fyzikálního výrobního procesu (Downie et al. 2009).

Evropská unie nemá pro konkrétní složení biocharu jako krmného aditiva oporu v legislativě. V příloze Registru krmných aditiv nacházíme jen definici černého uhlí, navíc jen jako schváleného barviva (European Commission (EC) 2020). O kvalitativní vlastnosti komerčně produkovaného biocharu se tak zaslouhují organizace, které pod sebe sdružují výrobce tohoto aditiva a udělují certifikáty kvality. International Biochar Initiative (IBI) je organizace zabývající se kvalitou, výrobou a distribucí biocharu zejména pro environmentální využití (IBI 2018^b). V Evropě působí European Biochar Certification (EBC), která určuje pravidla pro udělení evropského certifikátu kvality pro biochar. EBC stanovuje jasné parametry i pro biochar

využívány ke krmným účelům a certifikát obdrží jen výrobci, kteří splňují přísná kvalitativní a výrobní kritéria (EBC 2021).

3.2.1.2 Vstupní suroviny pro výrobu biocharu

Environmentálně využívaný biochar je vyráběn z početné škály surovin (Obr. č. 3). Často jsou to materiály, které vznikají jako druhotný produkt při výrobě a zpracování dřeva a potravin (Novak et al. 2009). Běžně se také setkáváme s využitím odpadních surovin, jako je čistírenský kal (Mašek et al. 2018) nebo separát z bioplynových stanic (ÚKZÚZ 2016). Kritéria pro vstupní materiál krmných biocharů jsou přísnější, obecně lze krmit jen biochar pocházející z rostlinné biomasy (EBC 2012). Vstupní suroviny pro výrobu biocharu se od sebe liší zastoupením prvků, obsahem půdních či prachových částic, obsahem celulózy, hemicelulózy a ligninu a původní vlhkostí materiálu. Výběrem specifického složení vstupního materiálu vzniká aditivum přizpůsobené konkrétnímu účelu svého využití (Boehm 1994).



Obr. č. 3. Příklad vstupních surovin pro výrobu biocharu. Převzato a upraveno od Mašek et al. (2018)

Pro výrobu krmných biocharů je podle EBC (2012) jedinou povolenou vstupní surovinou rostlinná biomasa. Pro tento účel lze využít jednoleté i víceleté plodiny pěstované na orné půdě, biomasu ze sezónně sklizených výmladkových lesů i dřevo získané prořezáváním vinic či sadů. Z lesnické produkce lze jako materiál pro výrobu biocharu využít odpadní suroviny vznikající při mechanickém zpracování dřeva, tedy kůru, piliny, hobliny a jiný, chemicky neošetřený dřevní materiál. Z potravinového průmyslu je možné využít matoliny, slupky, stopky, extrudovaný šrot nebo výlisky, dále zbytky koření, ovoce, melasy, olejin a odpady, které vznikají při výrobě škrobu z brambor, kukuřice či rýže. V neposlední řadě se při výrobě

biocharu využívají i odpadní suroviny kávového a kakaového průmyslu nebo rostliny pocházející z vodního hospodářství (EBC 2020).

3.2.1.3 Pyrolýza

Pyrolýza je proces degradace biomasy, který probíhá za působení vysoké teploty při snížené koncentraci kyslíku nebo jeho úplné nepřítomnosti (Amonette & Joseph 2009). Výsledkem tohoto procesu je soubor uhlovodíkových látek pevného, kapalného a plynného skupenství (Demirbas & Arin 2002). Poměr zastoupení těchto vznikajících látek je dán parametry pyrolýzy, zejména teplotním rozpětím a tlakem, a také dobou jejich působení na vstupní surovinu (Cheah et al. 2016).

Materiály obsahující lignin a celulózu procházejí během pyrolýzy třemi pyrolytickými fázemi:

1. fáze tvorby biocharu a plynných složek
2. fáze tvorby kapalných uhlovodíků a dehtu
3. fáze zplynování a karbonizace

Výsledkem těchto fází jsou různé produkty a jejich zastoupení závisí na nejvyšší dosažované teplotě v procesu pyrolýzy, rychlosti, jakou se přetváří a vypařují těkavé látky, a době působení vysokých teplot na materiál (Amonette & Joseph 2009).

Lee et al. (2017) tyto fáze pro zjednodušení popisují jako fázi pre-pyrolytickou, fázi hlavní pyrolýzy a fázi karbonizace. Pre-pyrolytická fáze probíhá až do dosažení teploty 200 °C a materiál při ní ztrácí vlhkost, s vodou se odpařují také lehké těkavé látky. Ztráta vlhkosti s sebou nese porušení některých chemických vazeb, formují se hydroperoxydy a sloučeniny obsahující skupiny -COOH a -CO (Cárdenas-Aguitar et al. 2017). Ve fázi hlavní pyrolýzy je při teplotách 200-500 °C rozkládána hemicelulóza a celulóza (Ding et al. 2014). Hemicelulóza se rozkládá jako první, a to při teplotách 200–260 °C. Celulóza je pyrolýzována při teplotách 240–350 °C (Demirbas & Arin 2002). V poslední fázi, která probíhá v teplotách nad 500 °C, dochází k rozložení ligninu a dalších látek s pevnými vazbami (Cárdenas-Aguitar et al. 2017).

Teplota, za které pyrolýza probíhá, má velký vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti biocharu, jakými je pH, velikost aktivního povrchu a typy funkčních skupin na něm navázaných (Ding et al. 2014). Při vysokých teplotách vzniká vysokoteplotní biochar (high-temperature biochar) s rozsáhlým aktivním povrchem, vysokým zastoupením karbonizovaných frakcí, zásaditým pH a s vysokým obsahem těkavých látek. Snižuje se však jeho schopnost jako elektronového mediátoru a na jeho povrchu je přítomno menší množství povrchových funkčních skupin (Tomczyk et al. 2020).

Dle EBC (2012) by se teplota pyrolýzy měla pohybovat v rozmezí 350–1000 °C a neměla by během celého pyrolytického procesu kolísat o více než 20 %. Vyroběný biochar následně může projít procesem aktivace (Lua et al. 2004).

3.2.1.4 Aktivace

Účelem aktivace biocharu je tvorba pórů na povrchu materiálu, čímž je dosaženo zvýšení schopnosti adsorpce (Viswanathan et al. 2009). Poměr a velikost pórů na povrchu biocharu se odvíjí od výběru vstupního materiálu pro pyrolýzu a typu aktivačního plynu (Cha et al. 2016). Metody aktivace se dělí na fyzikální a chemické (Hui & Zaini 2015).

Fyzikální aktivace, také plynná aktivace, využívá k aktivaci biocharu účinku páry, CO₂ anebo ozonu při teplotě nad 700 °C. Tento proces probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku dochází k rozkladu nestrukturálních složek (dehtu) na povrchu materiálu. Uhlík přítomný v původním materiálu přitom krystalizuje a vznikají tak póry. Nové struktury zvětšují plochu povrchu. Ve druhém kroku, díky stále probíhajícím chemickým reakcím, je povrch dále transformován a vznikají další, ještě menší póry (mikropóry). Současně také může docházet ke zvětšování pórů, které vznikly již v prvním kroku aktivace (Hagemann et al. 2018). Rychlost tvorby pórů fyzikální aktivací závisí na obsahu popela v karbonizovaném materiálu (Cha et al. 2016).

Chemická aktivace probíhá za nižších teplot než aktivace fyzikální, nejčastěji v rozmezí 400–700 °C. Jejím prvním krokem je vysušení materiálu – v materiálu přítomná voda se nechává odpařit nejčastěji přes noc. Následně se biochar impregnuje chemickým činidlem (Hui & Zaini 2015). Základními chemickými látkami využívanými při tomto typu aktivace jsou KOH, NaOH, NH₃, K₂CO₃ a ZnCl₂. Lze použít i různé anorganické kyseliny, například H₃PO₄, H₂SO₄ a HCl (Cha et al. 2016). Chemická aktivace je preferovaným způsobem úpravy povrchu environmentálně využívaných biocharů, protože probíhá za nižších teplot a je často účinnější. Působením chemických látek na karbonizovaný materiál navíc vznikají specifické funkční skupiny na jeho povrchu (Hui & Zaini 2015). Úskalím chemické aktivace biocharu je nutná kontrola finálního produktu a nutnost biochar čistit či promývat, aby byl zbaven reziduí anorganických sloučenin (Viswanathan et al. 2009).

3.2.1.5 Analytické složení krmného biocharu

V závislosti na druhu vstupního materiálu pro výrobu biocharu se u tohoto aditiva mění i finální zastoupení prvků. V sušině biocharů vyráběných z rostlinných materiálů je nejvíce zastoupen uhlík (biochary vznikající pyrolytickým zpracováním dřeva obsahují kolem 75 % uhlíku) (Ippolito et al. 2015). Biochary dále obsahují vodík (H), kyslík (O), popeloviny a stopová množství dusíku (N) a síry (S) (Cha et al. 2016). Pro výrobu biocharu směřujícího do rostlinné výroby se často používají takové vstupní materiály, jakým je hnůj nebo čistírenské kaly. Složení těchto biocharů je v zastoupení jednotlivých prvků odlišné (Tab. č. 1) od těch vyráběných z rostlinných pletiv (Appolito et al. 2015).

Dle požadavků na certifikaci biocharů od EBC (2014) na zastoupení jednotlivých prvků v sušině je nutné dosáhnout obsahu uhlíku v biocharu minimálně 50 % včetně. Dále je požadováno stanovení obsahu popelovin, makroprvků (N, P, K, Mg, Ca), vody, těžkých kovů, PAU (polycyklických aromatických uhlovodíků), PCB (polychlorovaných bifenyly) a PCDD

(polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů). Dále je u komerčně vyráběných biocharů třeba stanovit hodnotu pH, molární poměry H/C_{org} (maximálně 0,7) a O/C (maximálně 0,4), elektrickou vodivost ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), objemovou hmotnost, povrchovou plochu (alespoň $150\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) a obsah těkavých látek (procentuálně vzhledem k sušině).

Tabulka č. 1: Průměrná koncentrace prvků u biocharů vyrobených z různých materiálů (ve vztahu k sušině) (Appolito et al. 2015).

Vstupní materiál	C (%)	N (%)	P (g/kg)	K (g/kg)	S (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	Fe (g/kg)	Cu (g/kg)
Tvrdé dřevo	74,4	0,72	1,14	9,47	15,6	10,1	9,53	1,8	4,76
Měkké dřevo	74,6	0,79	0,74	16,9	0,23	20,7	18	9,64	1,38
Kukuřice	58,8	1,06	2,35	19	0,37	8,64	7,1	7,3	115
Pšenice	60,8	1,41	---	1,26	---	12,6	9,88	1,94	---
Traviny	64,9	1,16	1,62	14,4	1,3	5,92	3,31	1,35	66,2
Drůbeží trus	35,3	2,15	33,1	60,2	9,26	103	12,2	2,91	513
Kravský hnůj	58,1	2,37	8,59	17,2	2,7	26,9	11,8	5,87	107
Čistírenský kal	23,8	1,12	42,4	---	---	---	---	---	222

--- pod hranicí určení nebo nestanovováno

3.2.2 Vlastnosti biocharu

Biochar je poměrně nové krmné aditivum vznikající jako produkt pyrolytického zpracování biomasy (Teoh et al. 2019). Materiál biocharu je vysoce porézní, což tomuto aditivu zajišťuje velkou sorpční plochu (Thies & Rilling 2009). Tato látka je proto známá pro svou schopnost adsorpce plynů a uhlíku. Vazbou chemických sloučenin na svůj povrch je schopna detoxikovat své prostředí a také poskytuje prostor pro rozvoj a metabolismus žádoucích mikroorganismů (Hansen et al. 2012; Leng 2014; Jeffery et al. 2016). Díky funkčním skupinám na svém povrchu má biochar bohaté elektrochemické vlastnosti (Sun et al. 2017), a funguje tedy jako elektronový mediátor v biologických redoxních reakcích (Yu et al. 2015). Poslední zmíněná vlastnost přispívá k vyšší konverzi krmiva a snížení vylučování skleníkových plynů zvířaty (Leng et al. 2012; Chu et al. 2013^a; Chu et al. 2013^b; Kamman et al. 2017).

Podobně jako aktivní uhlí je biochar schopen vázat nežádoucí látky ze svého prostředí. Využití má při vazbě mykotoxinů, rostlinných jedů, pesticidů, ale také toxických metabolitů nebo patogenů (Schmidt et al. 2019).

Z toxikologického hlediska jsou účinky biocharu založené na jednom z následujících mechanismů:

- Selektivní adsorpce toxinů
- Adsorpce částice krmiva obsahující toxin
- Adsorpce následovaná chemickou reakcí, která toxin ničí
- Uvolnění dříve pohlcených látek (Gerlach & Schmidt 2012)

Neméně důležitou vlastností je vysoký redoxní potenciál aktivovaných biocharů (Joseph et al. 2010).

3.2.2.1 Redoxní aktivita biocharu

Biochar je chemicky více reaktivní než původní surovina, ze které je vyroben. K této zvýšené reaktivnosti přispívají částice povrchu s konkrétním chemickým složením, například oblasti grafitu, různé funkční skupiny, ale také kovy s redoxní aktivitou. Zatímco funkční skupiny, jako například fenolické skupiny, jsou hlavními poskytovateli elektronů (tj. reduktory), chinony a polykondenzované aromatické funkční skupiny jsou složkami, které elektrony přijímají (oxidanty). Redoxní kapacita biocharu závisí na vlastnostech vstupní suroviny a podmínkách pyrolýzy (Yuan et al. 2017).

Redoxní aktivita a proces trávení

Během mikrobiálního rozkladu organických látek v trávicím traktu jsou z metabolizovaných sloučenin štěpeny elektrony. Elektrony nemohou existovat ve volném stavu a buňka je samostatně nedokáže skladovat. Mikroorganismy tedy potřebují koncový akceptor elektronů, aby se zbavily přebytečných elektronů, které se během degradace organických molekul hromadí (Kothe 2011).

Organismy jsou závislé na dostupnosti jak donoru elektronů (např. metabolizované organické hmoty), tak akceptoru, ke kterému lze přebytečné elektrony přenést. K tomuto přenosu dochází v takzvaných redoxních reakcích, kdy molekuly nebo atomy, které jsou donorem elektronu, jsou spojeny prostřednictvím elektrochemických reakcí s molekulami nebo atomy, které elektron přijímají. Aby byl přenos elektronů možný, musí tyto chemické nebo biochemické redoxní reakce obvykle probíhat ve velmi těsné (molekulární) blízkosti. Předání elektronů navíc mohou usnadňovat tzv. elektronové mediátory, které přenos elektronu zprostředkují. Mezi známé mediátory elektronů patří thionin, taniny, methylová modř nebo chinon, které mají srovnatelné elektronové kapacity jako dosud ne tak prozkoumané huminové kyseliny nebo biochar (Bhatta et al. 2012; Liu et al. 2012; Klüpfel et al. 2014).

Biochar se chová jako „geobaterie“ a „geokonduktor“: může přijmout, uskladnit a zprostředkovat elektrony pro biochemické reakce (Sun et al. 2017). Dostatečné početní zastoupení elektronových donorů, akceptorů i mediátorů je významné pro efektivní využití plného potenciálu krmné dávky. Tento fakt nabývá na významu zejména u současných komplexních krmných dávek bohatých na energii, ve kterých je počet elektronových mediátorů často nedostatečný (Schmidt et al. 2019). Díky použití krmných aditiv, jakým je biochar nebo huminové kyseliny, mohou některé redoxní reakce proběhnout efektivněji (Liu et al. 2012; Leng et al. 2013). To může vést k lepšímu využití krmiva a vyššímu dennímu příjmu krmiv.

3.2.2.2 Adsorpce

Díky svému poréznímu povrchu se biochar využívá k dekontaminaci vod i půd (Cha et al. 2016). Stejně jako aktivní uhlí se také využívá při léčbě otrav nebo poruch trávení. Výborné

adsorpční schopnosti těchto uhlíkatých materiálů byly zkoumány na případech otrav herbicidy nebo léky už v 70. letech minulého století (Decker & Corby 1970; Dobson et al. 1971). Současné studie se adsorpčními vlastnostmi biocharu zabývají i nadále. Preventivním přidáváním biocharu jako krmného aditiva do krmných dávek se předpokládá snížení negativních dopadů nežádoucích látek v krmivech (jako jsou mykotoxiny, pesticidy a jiné toxiny z prostředí) na gastrointestinální trakt a zdraví zvířat. Biochar lze navíc využít i při intoxikaci léčivými či jedovatými rostlinami. V neposlední řadě by biochar mohl díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem sloužit jako prvek regulující prostředí střeva, a to nejen jako mediátor chemických reakcí, ale také jako adsorbent bakteriálních patogenů a jejich metabolitů (Schmidt et al. 2019).

3.2.3 Využití biocharu

Komerční využití biocharu v živočišné výrobě by mohlo přinést zlepšení výsledků konverze krmiv v intenzivních chovech a zvýšení produkce a kvality vajec, masa i mléka. Jeho podávání v krmné dávce má pozitivní vliv i na obranyschopnost organismu (Toth & Dou 2016). Pravidelným zkrmováním biocharu byly zaznamenány úspěchy ve snížení počtu patogenních bakterií i parazitů ve výkalech zvířat (Watarai & Tana 2005; Watarai & Koiwa 2008; Chu et al. 2013^a), byl pozorován také pozitivní vliv biocharu na prodloužení klků ve střevě prasat (Mekbungwan et al. 2004).

Biochar nachází využití i ve výživě přežvýkavců s cílem snížit emise metanu, který vzniká zejména při mikrobiálním rozkladu potravy v batoru. Možnosti využití biocharu v živočišné produkci jsou nespočetné, ale i přes stále vzrůstající počet probíhajících studií nejsou konkrétní mechanismy adsorpce a ovlivňování redoxních dějů v gastrointestinálním traktu zvířat zcela známy. Efekt biocharu na trávení krmiva i konkrétní průběh detoxikačních reakcí je tedy předmětem dalšího studia (Toth & Dou 2016).

3.2.3.1 Adsorpce toxických látek

Velký potenciál biocharu leží v jeho adsorpčních schopnostech. Při pravidelném přidávání do krmné dávky působí jako adsorbent nežádoucích látek v krmivu.

Mykotoxiny jsou zřejmě nejčastější nežádoucí látkou nacházející se v krmných surovinách. Každoročně je jimi zasaženo až 25 % produktů rostlinné výroby (Mézes et al. 2010). Tyto produkty plísní jsou většinou velmi odolné tepelnému, chemickému i jinému technologickému zpracování krmiv (Alshannaq & Yu 2017). Proces odstranění mykotoxinů z krmných surovin zahrnuje působení chemických nebo fyzikálních faktorů. Chemicky se mykotoxiny odstraňují ozonem (McKenzie et al. 1997) nebo amoniakem (Park 1993). Kvůli možným reziduíům těchto chemických látek v krmných směsích se ale v praxi více využívá fyzikálních metod, které zahrnují přimíchávání vhodných adsorbentů do krmné dávky. Kromě aluminosilikátů (např. zeolitu), polymerů a kvasnic se k detoxikaci krmiv využívá i biochar (Huwig et al. 2001).

Významným mykotoxinem je aflatoxin. Je považován za nejjedovatější mykotoxin a způsobuje rozsáhlé ekonomické škody ve všech zemědělských odvětvích (Alshannaq & Yu 2017). Jeho vyvázáním z krmných surovin se proto zabývá početná skupina studií. Galvano et al. (1996) pozorovali snížení koncentrace aflatoxinu v krmivu až o 74 % a v mléce až o 45 % po přidání biocharu do krmiva. Prokazatelného účinku bylo dosaženo vmícháním 2% podílu aditiva na celkové sušině do krmné dávky. V tomto množství sice biochar ovlivnil barvu krmiva, denní příjem sušiny krmné směsi se ale nijak nezměnil. Také Diaz et al. (2004) zkoumali účinek biocharu na hladiny aflatoxinu v mléce. Biochar byl dávkován v množství 0,25 % krmné dávky. V tomto případě nebyly zaznamenány žádné prokazatelné účinky aditiva na obsah aflatoxinů. Autoři však poté v diskusi uvedli, že navržený obsah biocharu v krmné dávce mohl být příliš nízký. Některé další studie, tentokrát probíhající in vitro, zkoumaly adsorpci aflatoxinu přímo z mléka. Výzkum, který prováděli Di Natale et al. (2009), prokázal snížení obsahu aflatoxinu v mléce o více než 90 % při vmíchání 0,5% podílu biocharu do testovaného média. Dalšími studiemi in vitro se zabývali autoři Döll et al. (2004), kteří zkoumali vliv šesti komerčně dostupných krmných aditiv na snížení obsahu deoxynivalenolu a zearalenonu. Aditivum na bázi aktivního uhlí bylo v porovnání s ostatními aditivy nejúspěšnější. Biochar snížil obsah deoxynivalenolu o 67 % a obsah zearalenonu dokonce o 100 % oproti kontrolnímu vzorku.

Erickson et al. (2011) publikovali studii zabývající se zkrmováním siláží o nižší krmivářské kvalitě se zhoršenými organoleptickými vlastnostmi. Holštýnským dojnicím byla při ní krmena nekvalitní siláž obsahující deoxyvalenol v koncentraci 800–1500 µg/kg krmiva. Biochar byl krmen se záměrem pohltnout pachy nekvalitní siláže, čímž mělo být dosaženo zvýšení příjmu krmiva zvířaty. Očekávané výsledky byly skutečně pozorovány. Při krmení 20 resp. 40 g biocharu s krmnou dávkou se prokazatelně zvýšil příjem sušiny, u skupiny krmené krmnou dávkou s 20 g aditiva byla pozorována i její zvýšená stravitelnost. Příjem a stravitelnost sušiny byl dokonce vyšší u nekvalitní siláže krmené spolu s biocharem než u siláže vysoké kvality bez přidaného aditiva. Autoři nicméně v druhém pokusu prokázali, že pokud si zvířata mohou vybrat, přijímají raději kvalitní siláž. Parametry mléka při vyhodnocování výsledků studie bohužel nebyly zkoumány. Vliv biocharu na přestup deoxyvalenolu do mléčné žlázy tedy nebyl zjištěn.

Dalším předpokládaným důsledkem pravidelného zkrmování biocharu je ovlivnění složení střevního mikrobiomu ve prospěch symbiotických mikroorganismů. Bakteriální patogeny a jejich metabolity ovlivňují nejen užitkovost zvířat, ale také jejich zdraví a pohodu. Několik studií in vitro proto zkoumalo vliv biocharu na složení střevního mikrobiomu. Naka et al. (2001) pozorovali, že biochar na svůj povrch poměrně dobře váže *E. coli*, zatímco ostatní přirozené druhy trávicího traktu, jakými jsou *Enterococcus*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, neměly k aditivu tak vysokou afinitu. Přidání 10 mg biocharu do 1 ml roztoku stačilo k adsorpci jak řetízků *E. coli* (v počtu $8,2 \times 10^6$ bakterií), tak k navázání jejího metabolitu – verotoxinu 2. Podobných výsledků dosáhli i Ilomuanya et al. (2011). Autoři však během studie pozorovali postupný nový nárůst *E. coli* po 10 hodinách od začátku experimentu. Watarai & Tana (2005) provedli studii zabývající se adsorpcí patogenu *Salmonella enterica* u kuřat. Adsorbentem byl biochar smíchaný s dřevným octem. Test podstoupily tři skupiny kuřat – kontrolní skupina,

skupina imunizovaná vakcínou proti *S. enterica* a skupina krmená krmnou směsí s 1% obsahem biocharu. Po 10 dnech od imunizace a začátku krmení aditiva byla kuřata orálně infikována *S. enterica*. Skupina kuřat krmená biocharem vykazovala prokazatelně nižší počty bakterií v trusu než první dvě skupiny. Patnáctý den testu byly faeces této skupiny salmonelózy prosté.

Prospěšné účinky biocharu byly pozorovány i u managementu parazitických onemocnění. Studie probíhající in vivo a in vitro zkoumala adsorbční schopnosti biocharu na protozoálních parazitech *Cryptosporidium parvum*. In vivo byla prokázána efektivní adsorpce parazitických oocyst. Dojnice, kterým byl biochar podáván v krmné dávce, prokazatelně méně trpěly průjmem a v jejich výkalech se nacházelo méně oocyst (Watarai & Koiwa 2008).

Aktivní uhlí a biochar hrály významnou roli i v mnoha studiích zabývajících se adsorpcí pesticidů, insekticidů, herbicidů a jiných toxinů z prostředí. Tématem aktuálních výzkumů je zejména glyfosát, který je využíván pro ošetřování geneticky modifikované kukuřice, řepky a sóji (Schmidt et al. 2019). Biochar má pozitivní vliv na dekontaminaci glyfosátu z vod i půdy (Hall et al. 2018). Gerlach et al. (2014) proto provedli studii se 380 dojnicemi, které byly záměrně krmené krmnou dávkou kontaminovanou glyfosátem. Biochar byl přidáván do krmné směsi společně s huminovými kyselinami nebo šťávou z kysaného zelí, protože bylo zjištěno, že glyfosát se lépe váže k biocharu v prostředí s nízkým pH (Herath et al. 2016). Směs biocharového aditiva (200 g) a šťávy z kysaného zelí (500 ml) v denní dávce během 4 týdnů prokazatelně snížila množství glyfosátu vylučovaného močí testovaných zvířat (Gerlach et al. 2014).

3.2.3.2 Biochar jako součást krmné dávky

Ačkoliv terapeutické využití pyrogenních uhlíkatých látek je známo již několik desítek let, o použití biocharu jako aditivu, které je pravidelnou součástí krmné dávky, se uvažuje až od roku 2010. Zkrmování biocharu se stalo běžnou praxí zejména v evropských zemích, jakými je Německo, Švýcarsko a Rakousko. Početnější komplexní studie o konkrétních účincích biocharu na fyziologii zvířat ale zatím chybí (Schmidt et al. 2019). Toth a Dou (2016) vypracovali obsáhlou rešerši a sumarizovali studie zabývající se přínosy biocharu pro živočišnou produkci. Ze 150 publikací se 51 z nich zaměřovalo na efektivitu vazby toxinů na povrch biocharu a 49 studií zkoumalo pozitivní účinky krmení biocharu na užitkovost a zdraví zvířat při jeho podávání v dlouhodobém měřítku. Schmidt et al. (2019) tento výběr zúžili na 27 nejvíce citovaných studií, které se zabývaly pravidelným zkrmováním biocharu. Jeho kontinuální využívání jako krmného aditiva se v žádné z výše jmenovaných studií neprojevovalo negativními účinky na zdraví nebo welfare zvířat. Nejčastěji sledované pozitivní přínosy biocharu v krmné dávce byly následující:

- Zvýšení příjmu krmiva
- Zvýšený hmotnostní přírůstek
- Zvýšení využitelnosti krmiva
- Vyšší snáška a kvalita vajec

- Posílení imunitního systému
- Zlepšení kvality masa
- Zvýšení hygienických standardů stáje a snížení zápachu
- Snížení počtu případů onemocnění kopyt, paznehtů a drápků
- Snížené náklady na veterinární péči

Cílem dalších studií by mělo být dostatečné prokázání pozitivních přínosů na zdraví a užitkovost zvířat. Studie in vitro dosahují pozitivních výsledků při adsorpci toxických a jiných nežádoucích látek (Schmidt et al. 2019). Při použití in vivo se ale můžeme setkat s komplikacemi. Prostředí střeva a chemické látky produkované organismem při procesu trávení potravy mohou na pozitivní vlastnosti biocharu působit tlumivě. Problémy může způsobit i případná přednostní interakce biocharu s jinými než původně zamýšlenými cílovými látkami (Huwig et al. 2001).

3.2.3.3 Použití biocharu ve výživě koní

O využití biocharu ve výživě koní byla, dle komplexních rešerší autorů Man et al. (2021) i Schmidt et al. (2019), publikována jediná studie. Edmunds et al. (2016) se v ní zabývali vlivem krmení biocharu na distální část trávicího traktu koně. Výzkum probíhal in vitro. Autoři se v něm pokusili napodobit podmínky tlustého střeva koní a zkoumali, nakolik typ krmiva a množství krmeného biocharu s krmnou dávkou ovlivní míru produkce plynů při katabolismu živin a zda bude mít biochar vliv na množství těkavých mastných kyselin, které při mikrobiálním trávení vznikají. Ve vzorcích bylo použito energeticky bohaté krmivo a krmivo o nižší energetické hodnotě. Od každého typu krmiva bylo vytvořeno pět skupin vzorků s různým obsahem biocharu ve zkoumaném médiu. Hodnoty biocharu se pohybovaly v hodnotách od 0 do 100 mg aditiva na 150 ml média. Výsledky pozorování prokázaly, že biochar v žádné z uvedených koncentrací neovlivňuje množství uvolňovaného plynu ani nemá vliv na tvorbu těkavých mastných kyselin. Ve sledovaných parametrech zaznamenali autoři prokazatelné odchylky jen mezi vzorky, které obsahovaly rozdílná krmiva. Vliv biocharu na mikrobiální fermentaci in vitro tedy v tomto případě nebyl autory prokázán.

Budoucnost výzkumů spojených s biocharem je otevřená. Při prokázání inertního účinku tohoto aditiva na stravitelnost sušiny krmiva je možné se dále zabývat jinými možnostmi jeho využití, například adsorpcí toxinů či patogenů ze střevního prostředí nebo zamezením ztrát živin z hnoje či kejdy. Pravidelné zkrmování biocharu s krmnou dávkou by mohlo předcházet akutním potížím trávicího traktu, jakými jsou koliky, endotoxemie a průjmy. Zajímavým aditivem by se mohl stát i pro koně náchylné ke schvácení kopyt nebo v chovech, kde jsou zvířata krmena surovinami častěji podléhajících kontaminaci mykotoxiny.

4 Metodika

Studie probíhala v experimentální stáji Výzkumného ústavu živočišné výroby (Netluky, Praha, Česká republika). Experimentální protokol byl schválen Etickou komisí Výzkumného ústavu živočišné výroby a s koňmi bylo zacházeno v souladu s platnou legislativou České republiky a Evropské unie.

4.1 Biochar

Biochar přidávaný do krmné dávky pro účely experimentu byl vyroben dvoufázovým procesem ve dvouhořákovém zplyňovacím kotli. Vstupním materiálem bylo měkké dřevo (smrkové dřevní štěpky z dřevěných palet).

Během první fáze výroby biocharu prošlo dřevo procesem pyrolýzy při teplotě 500–600 °C po dobu 3–6 hodin. Druhá fáze výroby zahrnovala částečnou oxidaci těkavých látek biomasy za teploty přibližně 900 °C, biochar byl následně auto-aktivován vodní parou a oxidem uhličitým za teploty 700–750 °C v průběhu 1 hodiny. Výsledkem tohoto procesu byl vysokoteplotní biochar s vysokým obsahem uhlíku a popela, bohatou porozitou, specifickým povrchem a alkalickým pH (Tab. č. 2). Kvalitou tento biochar dosahoval standardu European Biochar Certificate (EBC) pro použití ve výživě zvířat (splnění požadavků následujících kvalitativních i kvantitativních parametrů: stupeň karbonizace – H/C_{org} , obsah uhlíku, těžkých kovů, polycyklických aromatických uhlovodíků a dalších organických polutantů). Biochar byl krměn společně s ječmenem. Aby se zajistilo rovnoměrné rozptýlení biocharu ve směsi s ječmenem, byly použity převážně frakce biocharu s velikostí částic menší než 2 mm (Tab. č. 2).

4.2 Zvířata a design experimentu

Osm dospělých teplokrevných koní (šest klisen a dva valaši; $12,1 \pm 5,3$ let věku, $613,8 \pm 39,3$ kg) bylo využito v křížovém (crossover) designu experimentu se dvěma fázemi. Každá fáze trvala 15 dní a zkoumala efekt biocharu na stravitelnost krmné dávky, mikrobiální fermentaci v tlustém střevě a na metabolismus koní. Jednotlivé fáze se skládaly z období navykání na krmnou dávku (10 dní), po kterém následovala pětidenní etapa zahrnující sběr dat. Pro získání dat byly během čtyřdenního intervalu sbírány veškeré výkaly a poslední den etapy byly zvířatům odebrány vzorky krve. Po ukončení první fáze experimentu byla mezi skupinami vyměněna krmná dávka. Pro zamezení jakéhokoli ovlivnění výsledků experimentu předchozí krmnou dávkou bylo mezi etapy výzkumu zařazeno třináctidenní očištné období, kdy do krmné dávky nebyl biochar přidáván.

Koně byli ustájeni individuálně ve stájových boxech (3 x 4 m) s volným přístupem k vodě z automatizovaných napáječek a přístupem k solnému lizu (NaCl). Zvířata měla během fáze adaptace na krmnou dávku možnost volného pohybu po suchém výběhu po dobu alespoň 4 hodin denně. V období, kdy probíhal sběr dat, byli koně každý den voděni po dobu 30 minut.

Před zahájením experimentu byl koním podáván antiparazitární přípravek, zvířata tedy byla považována za parazitů prostá.

Tabulka č. 2: Charakteristika a složení (g/kg sušiny, pokud není uvedeno jinak) biocharu suplementovaného do krmné dávky

Parametr	Biochar
Charakteristika	
Vstupní materiál	měkké dřevo
Teplota výrobního procesu	max. 900 °C
Podíl jednotlivých frakcí	>5 mm (50 g/kg) 2–5 mm (148 g/kg) 0,5–2 mm (409 g/kg) <0,5 mm (438 g/kg)
Aktivní povrch (S_{BET} m ² /g)	525
pH	11
Chemické složení	
Sušina (g/kg)	979
Popeloviny (g/kg)	114
C	846
H	6,7
O	30,9
S	0,2
N	1,8
P	0,9
K	4
Ca	19,5
Mg	2,4
Zn	0,2
Cu	0,02

4.3 Krmná dávka

Před začátkem experimentu byli koně rozřazeni do skupin podle pohlaví a tělesné hmotnosti, skupinám poté byla náhodně přiřazena jedna z krmných dávek. Složení krmných dávek bylo následující:

1. Kontrola, bazální krmná dávka ve složení luční seno a mačkaný ječmen (podíl sušiny jednotlivých krmiv v poměru 80:20, Tab. č. 3)
2. Biochar, bazální krmná dávka byla doplněna biocharem v množství 10 g biocharu na kilogram sušiny krmné dávky.

Celkově byli koně krmeni 15 g sušiny krmné dávky na kilogram jejich tělesné hmotnosti. Krmná dávka byla rozdělena do dvou dávek a krmení probíhalo pravidelně

v 5:00 a v 17:00. Množství krmené sušiny bylo vypočítáno dle požadavků NRC a bylo koncipováno tak, aby koním poskytovalo 100 % požadavku na stravitelnou energii. V součtu bylo zvířeti o průměrné hmotnosti (614 kg), krmeném bazální krmnou dávkou (15 g sušiny/kg tělesné hmotnosti) s příměsí biocharu (10 g/kg sušiny krmiva), celkově krmeno 92 g biocharu na den. Biochar byl koním předkládán ve směsi s mačkaným ječmenem a směs byla namáčena vodou pro zamezení prašnosti biocharu. Mačkaný ječmen u kontrolní skupiny byl namáčen a krmen stejným způsobem.

Tabulka č. 3: Základní chemické parametry jednotlivých krmiv bazální krmné dávky (jednotkou je g/kg sušiny, pokud není uvedeno jinak)

	Luční seno	Ječmen zrno
Sušina (g/kg krmiva)	872	890
Hrubý protein	78	160
Hrubý tuk	7	27
Popeloviny	66	29
Škrob	-	471
Brutto energie (MJ/kg)	19,5	18,8
Hemicelulóza	289	164
NDF	720	220
ADF	432	55

Hemicelulóza = NDF – ADF

4.4 Sběr vzorků výkalů a jejich analýza

Bilanční stravitelnost živin byla stanovena kvantitativně ze všech výkalů a vypočítána dle rovnice (1)

$$\text{Celková bilanční stravitelnost živin (\%)} = \frac{(\text{živiny přijaté (g)} - \text{živiny ve výkalech (g)})}{\text{živiny přijaté (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Všechny výkaly odebrané z betonových podlah boxů během 24 hodin byly homogenizovány. Vzorky výkalů představovaly 5 % (w/w) celkového množství výkalů od každého koně a byly skladovány při teplotě -20 °C. Na konci závěrečného testovacího období byly vzorky rozmrazeny a zařazeny do skupin podle zvířete a období a podrobeny chemické analýze. Vzorky krmiva a výkalů, rozmělněné na velikost menší než 1 mm, byly analyzovány na obsah sušiny, hrubého proteinu, hrubého tuku, popelovin a na obsah NDF a ADF dle standardních metod popsanych Jochem a Kudrnou (2020). Obsah škrobu byl analyzován dle AOAC International (2005) metody (920.40). Brutto energie byla stanovena pomocí kalorimetru.

4.5 Krevní parametry

Krevní vzorky byly odebrány do 10ml sérum separujících zkumavek z jugulární žíly. Krev byla odebrána vždy poslední den každé fáze experimentu před ranním krmením. Hladina krevní glukózy byla stanovena okamžitě příručním glukometrem (Freestyle Optium Neo, Abbott Diabetes Care Inc, Kalifornie, USA). Po analýze hladiny krevní glukózy byly vzorky krve ponechány stát při pokojové teplotě až do vysrážení. Poté byly vzorky centrifugovány ($1700 \times g$, 20 min) a z nich bylo následně odebráno sérum. Sérum bylo uskladněno při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy sérových parametrů klinickou laboratoří (Klinická laboratoř pro velká zvířata, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika).

Celkový protein, hladina albuminů, močoviny, triglyceridů, cholesterolu a fosforu byly analyzovány s využitím komerčních kitů (BioVendor, Brno, Česká republika) na analyzátoru Konelab 20XT (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finsko). Sérový vápník, hořčík, zinek a měď byly měřeny pomocí atomového adsorpčního spektrofotometru s hydridovou technikou (HG AAS, Solaar M6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Obsah vitamínu A a E v séru byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC; Ultimate 3000, Dionex, CA, USA). Pro účely zjištění hladiny vitamínů byly krevní vzorky extrahovány hexanem a následně odpařeny a rozpuštěny v mobilní fázi (metanol).

4.6 Fermentační parametry výkalů

Pro účely vyhodnocení případných změn fermentačních parametrů byly 13. a 14. den obou etap pokusu odebrány výkaly ihned po první spontánní defekaci po 9. hodině ranní. Bylo odebráno 50 g z každého vzorku pro stanovení pH, těkavých mastných kyselin a amoniakálního dusíku. Pro minimalizaci kontaminace vzorku byly výkaly odebírány v rukavicích do sterilních plastových kontejnerů o objemu 100 ml. Vzorky byly uchovávány na ledě, přepraveny do laboratoře a zde uskladněny za teploty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy.

Fekální pH bylo měřeno pomocí neředěné fekální tekutiny z rozmrazených koňských výkalů. Fekální tekutina byla ze vzorku získána pomocí sterilní injekční stříkačky o objemu 20 ml, která byla naplněna výkaly. Poté byl tekutý obsah výkalů stlačením pístu vymačkána do kádinky. Tento proces byl opakován až do získání dostatečného množství tekutiny pro ponoření elektrody pH metru (WTW přenosný pH metr s WTW SenTix elektrodou, WTW, Weilheim, Německo). Pro účely analýzy těkavých mastných kyselin a amoniakálního dusíku z fekální tekutiny byly vzorky acidifikovány $10\text{ }\mu\text{l}$ $9\text{ M H}_2\text{SO}_4$. Těkavé mastné kyseliny (TMK) ze vzorku byly kvantifikovány vůči známým standardům (Supelco Volatile Fatty Acid Standard Mix; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) za použití plynového chromatografu (82 F, Labio, Česká republika). Tento chromatograf byl vybaven plamenovým ionizačním detektorem a kapilární kolonou, nosným plynem byl H_2 . Vzorky acidifikované fekální tekutiny byly centrifugovány ($20\text{ }000 \times g$, 3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant ($64\text{ }\mu\text{l}$) byl smíchán se $736\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}$, $30\text{ }\mu\text{l}$ standardu (kyselina 2-ethylmásečná) a $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,3\text{ M}$ kyseliny mravenčí, a následně centrifugován ($6625 \times g$, 1 min). Poté byl $1\text{ }\mu\text{l}$ směsi injektován do plynového chromatografu, detektor a injektor byly nastaveny na teplotu $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, vstupní tlak byl 50 kPa . Počáteční teplota při injekci vzorku byla $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota se následně zvyšovala tempem $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až do $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ustálena 80 s), poté byla

znovu zvyšována po 5 °C/min až do 128 °C (ustálena 4 s) a následně zvyšována po 20 °C/min až do hodnoty 160 °C (ustálena 180 s). Obsah fekálního amonného dusíku (NH₃-N) ve vzorku byl měřen fenol-hypochloridovou metodou dle Weatherburna (1967) při absorbanci o vlnové délce 625 nm.

4.7 Statistická analýza

Data byla vyhodnocována postupem pro křížový design experimentu, byla použita MIXED procedura dle SAS (SAS Enterprise Guide Version 7.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Kvůli určení průměrů nejmenších čtverců model zahrnoval fixní efekt přidání aditiva do krmné dávky a náhodné efekty koně a období. Pro každou fázi sběru dat byly před statistickou analýzou zprůměrovány údaje o stravitelnosti (4 dny) a fermentaci (2 dny) od každého koně. Statistická významnost byla deklarována na $P < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Stravitelnost krmné dávky

Zjištěná bilanční stravitelnost bazální krmné dávky (Kontrola) a krmné dávky s přidaným biocharem (Biochar) je uvedena v tabulce č. 3. Mezi stravitelností krmné dávky bez přidaného aditiva a stravitelností krmné dávky s biocharem nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). Přesto však byla u všech sledovaných parametrů – s výjimkou stravitelnosti škrobu – pozorována číselně vyšší stravitelnost při krmení krmné dávky s obsahem biocharu.

Tabulka č. 3: Bilanční stravitelnost (%) krmné dávky s (Biochar) a bez (Kontrola) suplementace biocharem

Parametr	Krmná dávka		SEM	P – hodnota
	Kontrola	Biochar		
Sušina	57,29	59,42	1,2510	0,1916
Hrubý protein	60,37	62,71	1,4099	0,2025
Hrubý tuk	39,26	44,16	3,1677	0,2897
Organická hmota	60,34	61,84	1,1831	0,4382
Škrob	98,76	98,72	0,0971	0,7635
Brutto energie	60,13	61,45	1,1558	0,4888
Hemicelulóza	57,01	60,19	1,5558	0,2525
NDF	51,56	53,36	1,4200	0,5005
ADF	47,46	48,29	1,4044	0,7632

NDF = neutrodetergentní vláknina, ADF = acidodetergentní vláknina, SEM = standardní chyba průměru

5.2 Krevní parametry

Parametry krevního séra koní, které bylo odebírané po zkrmování bazální krmné dávky (Kontrola) a po zkrmování krmné dávky se suplementací biocharem (Biochar), jsou uvedeny v tabulce č. 4. U testovaných parametrů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$) při podávání krmné dávky s biocharem nebo bez něj.

Tabulka č. 4: Hodnoty vybraných metabolických parametrů, minerálů a vitaminů krevního séra koní krmených dietou s (Biochar) nebo bez (Kontrola) přidaného biocharu

Parametr	Krmná dávka		SEM	P – hodnota
	Kontrola	Biochar		
Glukóza (mmol/l)	4,83	5,00	0,1080	0,2287
Celkový protein (g/l)	62,20	62,70	0,5528	0,6711
Albumin (g/l)	36,60	36,30	0,2217	0,5774
Močovina (mmol/l)	4,95	5,08	0,1967	0,5957
Triglyceridy (mmol/l)	0,345	0,354	0,01733	0,5822
Cholesterol (mmol/l)	2,21	2,31	0,05072	0,0871
Ca (mmol/l)	2,87	2,87	0,03220	0,8828
P (mmol/l)	1,07	1,09	0,04918	0,7728
Mg (mmol/l)	0,84	0,81	0,02219	0,3397
Zn (μ mol/l)	11,08	11,11	0,2969	0,9522
Cu (μ mol/l)	16,3	16,1	0,70447	0,8289
Vitamin A (μ mol/l)	0,545	0,566	0,01393	0,1261
Vitamin E (mg/l)	2,81	2,90	0,1865	0,3794

SEM = standardní chyba průměru

5.3 Obsah fermentačních produktů ve výkalech a vliv biocharu na pH výkalů

Obsah fermentačních produktů ve výkalech koní krmných bazální krmnou dávkou (Kontrola) a krmnou dávkou doplněnou biocharem (Biochar) je uveden v tabulce č. 5. Mezi sledovanými fermentačními produkty nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). Při porovnávání hodnot pH výkalů mezi testovanou a bazální krmnou dávkou byl statisticky významný rozdíl zaznamenán ($P < 0,05$). pH výkalů koní krmných biocharem bylo prokazatelně vyšší než u koní krmných pouze senem a ječmenem bez přidaného krmného aditiva.

Tabulka č. 5: Parametry fermentace

Parametr	Krmná dávka		SEM	P – hodnota
	Kontrola	Biochar		
pH	6,34	6,48	0,0751	0,0150
Celkové TMK (mmol/l)	49,00	46,13	3,2580	0,2954
kys. octová (mol/100 mol)	73,23	72,81	0,8265	0,7223
kys. propionová (mol/100 mol)	17,94	17,29	0,6543	0,4596
kys. máselná (mol/100 mol)	3,87	3,64	0,3336	0,4681
kys. valerová (mol/100 mol)	0,43	0,48	0,0516	0,4170
kys. isomáselná (mol/100 mol)	1,46	1,72	0,0856	0,1302
kys. isovalerová (mol/100 mol)	1,71	1,86	0,0952	0,4094
kys. hexanová (mol/100 mol)	0,16	0,18	0,0136	0,5536
kys. enanthová (mol/100 mol)	1,62	1,60	0,1255	0,8842
NH ₃ -N (mg/l)	169,1	171,3	16,043	0,8873

SEM = standardní chyba průměru

6 Diskuze

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda biochar krmený dospělým koním v dávce 10 g/kg sušiny krmné dávky ovlivní stravitelnost krmiv a fermentační aktivitu v tlustém střevě koní. Byl také posuzován vliv biocharu na metabolismus a zdravotní stav koní prostřednictvím hladin vybraných krevní metabolitů.

6.1 Ovlivnění stravitelnosti krmiv

Biochar má díky své schopnosti usnadňovat elektronový přenos mezi mikroorganismy (Liu et al. 2012) potenciál zvýšit stravitelnost krmiv. Jeho účinky na zvýšení stravitelnosti krmné dávky byly pozorovány v několika studiích zabývajících se konverzí krmiv u prasat (Chu et al. 2013^a; Chu et al. 2013^b; Sivilai et al. 2018), drůbeže (Kutlu et al. 2001), malých přežvýkavců (Mui & Ledin 2006) i skotu (Phongphanith & Preston 2018). Po vyhodnocení výsledků našeho experimentu však nebyl mezi kontrolní krmnou dávkou a krmnou dávkou s přidaným biocharem pozorován statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). Přesto byla ale u všech sledovaných živin, s výjimkou škrobu, pozorována číselně vyšší stravitelnost při krmení krmné dávky s obsahem biocharu.

V průběhu našeho pokusu bylo koním v krmné dávce celkově podáváno 0,15 g biocharu na kg živé hmotnosti koně (tj. 1 % ze sušiny krmné dávky). Autoři Van et al. (2006) pozorovali zvýšení stravitelnosti krmné dávky u koz po přidání biocharu v poměru 0,5–1 g biocharu na kg živé hmotnosti zvířat. Důvodem pozorovaných výsledků Van et al. tedy může být vyšší podíl biocharu v krmné dávce. Ve zmiňované studii byly ale skupiny zvířat také krmeny poměrně málo energeticky bohatou potravou s vysokým obsahem taninů. Taniny snižují stravitelnost a využitelnost krmiv tím, že tvoří komplexy s proteiny nebo sacharidy přítomnými v krmivu, nebo ovlivňují funkci trávicích enzymů (Medugu et al. 2012). Biochar díky svému aktivnímu povrchu adsorbuje fenolické skupiny ze svého prostředí (jakými jsou právě taniny) (Struhsaker et al. 1997). Jeho suplementace do živinově chudé krmné dávky s obsahem taninů tedy může vést ke zvýšení stravitelnosti sušiny – na rozdíl od zkrmování biocharu s krmivy, jejichž stravitelnost je vysoká i bez přidání biocharu, jako tomu bylo v našem případě, kdy bylo koním krmeno kvalitní luční seno a ječmen.

V rozporu s našimi výsledky, kdy nebyla prokázána vyšší stravitelnost sušiny po suplementaci krmné dávky biocharem, byly také závěry studie autorů McAvoy et al. (2020). Ti pozorovali prokazatelné zvýšení stravitelnosti sušiny krmné dávky u masných ovcí. Ve svém experimentu zvolili, stejně jako tomu bylo v našem případě, za vstupní materiál pro výrobu biocharu měkké dřevo. Do krmné dávky ovcím také shodně zařadili ječmen. Ten byl zkrmován spolu s vojtěškovou siláží v poměru 40:60 (ječmen:siláž). V experimentu byl krmen biochar pyrolyzovaný o nižší teplotě (300–550 °C) než v našem případě (900 °C) a s nižší hodnotou pH (8,36), než jaká byla naměřena u našeho biocharu (pH = 11). Kromě rozdílného postupu přípravy a odlišné hodnoty pH biocharu byl suplement ovcím podáván i ve vyšší dávce (2 % ze sušiny krmné dávky) než v našem pokusu (1 % ze sušiny krmné dávky). Zvýšení stravitelnosti

krmné dávky může korespondovat se zvýšenou fermentační aktivitou v bachoru ovcí. Autoři totiž pozorovali prokazatelně vyšší zastoupení acetátu v bachorové tekutině u ovcí krmených biocharem. Zvýšení obsahu TMK v bachoru má prokazatelnou spojitost s vyšší fermentační aktivitou symbiotických mikroorganismů (Guan et al. 2008). V našem případě přidávání biocharu do krmné dávky koní neovlivnilo hodnoty obsahu TMK ve výkalech, a tedy nebyl pozorován vliv biocharu na mikrobiální fermentaci v trávicím traktu koní. Důvodem rozporů mezi oběma experimenty může být nižší podíl přidávaného biocharu do krmné dávky v naší studii, ale i fyzikálně chemické vlastnosti našeho vysokoteplotního biocharu, které se liší od biocharů vznikajících za nižších teplot. S vyšší teplotou pyrolýzy se snižuje množství funkčních skupin na povrchu biocharu, nahrazují je aromatické skupiny (Joseph et al. 2010) a tím dochází i ke snížení katexové aktivity biocharu (Mukherjee et al. 2011). Nízká katexová aktivita příliš neovlivňuje elektronový transport mezi mikroorganismy (Wang et al. 2018), a tedy nezvyšuje mikrobiální metabolismus. To může být i případ námi použitého biocharu, který díky snížené schopnosti elektronového přenosu neměl dostatečně pozitivní vliv na fermentační aktivitu mikroorganismů trávicího traktu koní. V neposlední řadě můžeme rozdílné výsledky naší studie a studií autorů Van et al. (2006) a McAvoy et al. (2020) přisoudit zjevným rozdílům v anatomii trávicího traktu i ve fyziologii trávení mezi přežvýkavci a koňmi.

Zda by zvýšení stravitelnosti krmné dávky u koní ovlivnil biochar získaný pyrolýzou organické hmoty za jiných fyzikálně chemických podmínek nebo původem z jiného vstupního materiálu, je předmětem dalších studií.

6.2 Ovlivnění krevních parametrů

Hematologická a biochemická analýza krve poskytuje důležité informace o zdravotním stavu zvířete a případných metabolických změnách v jeho organismu (Burlikowska et al. 2015). Referenční hodnoty některých krevních parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 6, včetně důvodů difference těchto hodnot pod nebo nad referenční hodnotou.

U hodnot krevních parametrů koní v našem pokusu nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi koňmi krmenými krmnou dávkou bez přidaného biocharu nebo s ním. Dle referenčních hodnot lze konstatovat pouze nedostatečnou suplementaci krmné dávky zinkem, protože hodnota sérového zinku se u koní nacházela pod referenční hodnotou.

Tabulka č. 6: Referenční hodnoty některých krevních parametrů (Lumsden et al. 1980; Jeffcott et al. 1986; Geor et al. 2013; Knottenbelt & Malalana 2014)

Parametr	Referenční hodnota	Pod referenční hodnotou	Nad referenční hodnotou
Glukóza (mmol/l)	3,1-6,2 (mmol/l)	*N	Diabetes melitus, inzulinová rezistence, Cushingův syndrom
Celkový protein (g/l)	55-75 (g/l)	Při celkovém nedostatku proteinu v krmné dávce	Po intenzivním tréninku, při nadměrném pocení, dehydratace
Albumin (g/l)	26-37 (g/l)	Deficit proteinu v krmné dávce, onemocnění jater, ztráta močí, napadení parazity	N
Močovina (mmol/l)	3-5 (mmol/l)	Proteinový deficit v krmné dávce	Při tvorbě svalové hmoty a renálních onemocněních
Triglyceridy (mmol/l)	0,1-0,8 (mmol/l)	N	Nad 27,75 mmol/l hypertriglyceridemie
Cholesterol (mmol/l)	1,89-3,57 (mmol/l)	N	Obezita
Ca (mmol/l)	2,4-3,4 (mmol/l)	Může se objevit při kolikách, u klisen před porodem, po operacích	Selhání ledvin, intoxikace vitamínem D nebo rostlinami indukovaná kalcinóza
P (mmol/l)	0,7-1,7 (mmol/l)	Nedostatečný příjem krmivem, chronické onemocnění ledvin	Nadměrný příjem potravou, selhání ledvin, lýza buněk, rhabdomyolýza, intoxikace vit. D
Mg (mmol/l)	0,5-1,2 (mmol/l)	Špatně hnojené pastviny, kolika, průjmová onemocnění, nadměrný stres	N
Zn (μmol/l)	15-29 (μmol/l)	Nedostatečný příjem krmivem, chronické záněty, uremie, vysoký příjem vápníku	N
Cu (μmol/l)	19-21 (μmol/l)	zánět, úraz	U březích klisen, zánět, úraz
Vitamin A (μmol/l)	0,5-1,1 (μmol/l)	nedostatečný příjem	nadbytečný příjem
Vitamin E (mg/l)	1,0-3,0 (mg/l)	nedostatečný příjem	N

*N – nejsou referenční hodnoty

6.3 Fermentační parametry výkalů

Vzhledem k fyzikálně chemickým parametrům biocharu a jeho schopnosti usnadňovat elektronový přenos se předpokládá jeho pozitivní vliv na růst mikroorganismů v bachoru (Leng et al. 2013). Výsledky našeho pokusu ovšem nevykazují statisticky významné změny v celkovém obsahu TMK ani u zastoupení jednotlivých mastných kyselin, tedy u námi použitého biocharu nebyl pozorován vliv na změnu ani zvýšení mikrobiální fermentace v trávicím traktu koní. S našimi výsledky korespondují i pozorování Edmunds et al. (2016), kdy v autory prováděném pokusu *in vitro* nebyl zjištěn prokazatelný vliv biocharu na zastoupení ani celkový obsah TMK ve výkalech koní. Naproti tomu u pokusu autorů Saalem et al. (2018), při kterém byl zkoumán vliv biocharu na bachorovou fermentaci, byl pozorován zvýšený rozsah fermentace i profil fermentačních metabolitů. Lze tedy předpokládat, že efekt biocharu značně závisí na jeho biochemických a strukturálních vlastnostech. Nejslibnější efekt na bachorovou fermentaci (zvýšení obsahu TMK, snížení produkce CH₄) byl pozorován u biocharu získaného z měkkého dřeva pyrolýzou o teplotě 400–600 °C ošetřeného post-pyrolytickým procesem, při kterém jsou odstraněny přítomné polyaromatické sloučeniny a dioxiny a pH je upraveno na neutrální hodnotu (pH = 4,8; Saleem et al., 2018). Námi použitý vysokoteplotní biochar (900 °C) měl pH vyšší (pH = 11,0).

Biochar dokáže díky svým fyzikálním (zvětšená plocha povrchu a porozita) a chemickým (funkční skupiny s negativním a pozitivním nábojem) vlastnostem efektivně adsorbovat ionty NH⁴⁺ (Fidel et al. 2018). Tato skutečnost ale nebyla našimi výsledky potvrzena: námi použitý biochar neovlivnil hodnotu NH₃-N ve výkalech koní. Důvodem může být teplota pyrolytického procesu, při které byl biochar získáván. Při našem pokusu byl krměn vysokoteplotní biochar; schopnost biocharu vázat na sebe dusík ale klesá se zvyšující se teplotou pyrolýzy (Fidel et al. 2018). U biocharů vznikajících za nižších teplot nacházíme vyšší zastoupení karboxylátových skupin, které na povrchu biocharu vykazují negativní náboj, a mohou tak na sebe efektivně vázat ionty NH⁴⁺, které představují hlavní formu amoniakálního dusíku v kyselém prostředí trávicího traktu koní (Martin-Rosset 2015). U vysokoteplotních biocharů je oproti tomu zastoupení karboxylových funkčních skupin podstatně nižší (Mitchell et al. 2013).

Zkrmování námi použitého biocharu prokazatelně zvýšilo ($P < 0,05$) pH výkalů. Tato skutečnost byla zřejmě způsobena chemickým složením biocharu a jeho alkalickým pH (pH = 11,0). Naše výsledky korespondují s pozorováním autorů Chu et al. V obou studiích autorů (2013^a; 2013^b) bylo zaznamenáno prokazatelné zvýšení pH výkalů u prasat krměných krmnou směsí s přidaným vysokoteplotním (700 °C) bambusovým biocharem. Ve studiích autorů Chu et al. nebylo pH použitého biocharu měřeno, můžeme ale předpokládat zásaditý charakter použitého biocharu díky konkrétnímu pozorovanému zastoupení funkčních skupin na povrchu biocharů, které vznikají pyrolýzou za vyšších teplot (Tomczyk et al. 2020).

Zvyšování hodnot pH ve slepém a tlustém střevě koní díky zkrmování biocharu by mohlo zabránit překyselování prostředí těchto úseků trávicího traktu koní, které je pozorováno v souvislosti s počátkem zkrmování jádra nebo při jeho vysokém zastoupení v krmné dávce (Sadet-Bourgeteau et al. 2017). Nízké hodnoty pH prostředí kaudální části trávicího traktu

přítom mohou vést k řadě alimentárních onemocnění, například ke schvácení kopyt (Milinovich et al. 2010). Zařazení biocharu do krmné dávky by mohlo těmto výkyvům pH předcházet. Biochar by tak mohl být využíván při nutných změnách složení krmné dávky nebo u koní, kteří mají vysoké nároky na energii, a jsou proto krmeni vyšším podílem snadno stravitelných a na energii bohatých krmiv. Biochar by dále mohl být terapeuticky zkrmován i koním, kteří již překyselením tráveniny slepého či tlustého střeva trpí, a jsou proto u nich přítomny příznaky laminitidy, koliky nebo průjmových onemocnění.

6.4 Budoucnost zkrmování biocharu koním

Přestože zkrmování námi použitého biocharu neovlivnilo fermentační aktivitu mikrobiot ani stravitelnost krmiv, nemůžeme vyloučit případný pozitivní vliv tohoto aditiva vyrobeného z jiného vstupního materiálu či za jiných fyzikálně-chemických podmínek. Chemické složení biocharů se díky specifickým podmínkám výrobního procesu může mezi jednotlivými biochary podstatně lišit (Tomczyk et al. 2020). Předmětem budoucích studií je stanovení konkrétních parametrů biocharů (tj. chemické složení, pH nebo typy přítomných funkčních skupin vázaných na povrchu), které by mohly mít prokazatelný vliv na stravitelnost krmiv a mikrobiální aktivitu střeva koní. Pokud by byl prokázán pozitivní účinek biocharu na zdraví a metabolismus koní, mohlo by toto aditivum působit v několika oblastech chovu a výživy těchto zvířat.

Důležitou roli by biochar mohl sehrát v případě zdraví trávicího traktu koní. Ať již jako součást základní krmné dávky, anebo doplňků krmiv by mohl snížit dopady změn krmné dávky u koní, kteří přecházejí z energeticky chudšího složení krmné dávky na krmiva s vysokým obsahem stravitelné energie, například u mladých koní využívaných pro sport nebo u březích klisen. Náhlá obměna krmné dávky má často za následek razantní změnu v mikrobiomu trávicího traktu (Costa et al. 2012), což může být příčinou vzniku gastrointestinálních onemocnění (Geor et al. 2013). U koní, kterým byla zařazena nová krmná dávka, i u koní, kteří jsou léčeni antibiotiky, by biochar mohl díky usnadňování elektronového přenosu z metabolizovaného substrátu na akceptory elektronů pomoci při znovuosidlování GIT (Liu et al. 2012).

Vzhledem k vlastnosti biocharu vázat na sebe patogenní bakterie i jejich metabolity (Naka et al. 2011) by pravidelné krmení tohoto aditiva mohlo pomoci koním trpícím chronickými kolikami či průjmovými onemocněními. U skotu byl pozorován pozitivní účinek biocharu na snížení obsahu parazitárních oocyst *Cryptosporidium* spp. ve výkalech (Watarai & Koiwa 2008). U drůbeže bylo dále pozorováno i snížení zamoření hejna kulatými červy (Schmidt 2013). Biochar by tedy mohl být koním pravidelně podáván také jako preventivní antiparazitikum.

Adsorpční schopnosti biocharu by dále mohly být využity při detoxikaci krmiv i vody. Přidávání biocharu ke krmivům, která jsou náchylnější na výskyt mykotoxinů, by mohlo předcházet otravám či nepříznivým účinkům těchto látek na organismus koní. Pravidelné krmení biocharu by navíc mohlo pozitivním způsobem ovlivnit i pohodu a chování koní.

Podrážděný disbalancovaný trávicí trakt může u zvířat způsobovat stres a zvyšovat hladinu kortizolu v krvi (Chu et al. 2013). Střevo je poté více náchylné k přemnožení skupin mikroorganismů, které svým metabolismem mění prostředí trávicího traktu, a organismus hostitele se poté hůře vyrovnává například se zvýšenou aciditou ve střevě, způsobenou příjmem vyššího obsahu škrobu (Geor et al. 2013). Snížení hladiny kortizolu v krvi a vyšší pohodu zvířat při dlouhodobém zkrmování biocharu již prokazatelně pozorovali autoři Chu et al. (2013).

I v případě, že by v budoucnu nebyl prokázán vliv biocharu na zdraví trávicího traktu koní, je možné ho zvířatům zkrmovat pro prokazatelně vyšší pozorované množství zadržovaných živin ve výkalech zvířat (Godlewska et al. 2017). Biochar obsažený ve hnoji či kejdě může snadno obohatit hnojenou půdu o uhlík, který je tak zadržován v půdě po mnoho let (Major 2010) a nevrací se v rámci koloběhu uhlíku v podobě CO₂ do atmosféry (Laird 2008). Hnojení zemědělské půdy hnojem či kejdou s obsaženým biocharem současně také snižuje nároky na potřebné přihnojování dalšími hnojivy (Shi et al., 2017). Tento jev byl pozorován i u dlouhodobé studie autorů Joseph et al. (2015), kteří zkoumali vliv zkrmování biocharu masnému skotu na kvalitu půd australských pastvin. Biochar byl podáván masnému skotu spolu s melasou ve formě lizu jako krmný doplněk. Již po 3 letech bylo pozorováno prokazatelné zvýšení obsahu uhlíku v půdě. Biochar měl také pozitivní vliv na zakomponování dalších chemických prvků pocházejících z metabolismu zvířat do půdy a prostředí.

Pravidelné zkrmování biocharu se pomalu stává běžnou praxí v produkčních i zájmových chovech zvířat. Je ale třeba dalších studií kvůli vyhodnocení účinnosti biocharů vznikajících z různých vstupních materiálů a za různých fyzikálně-chemických podmínek na metabolismus mikroorganismů i zvířat a vypracování strategie jeho vhodného dávkování s krmnou dávkou.

7 Závěr

Po statistickém zpracování hodnot fermentačních parametrů ve výkalech, krevních parametrů a stravitelnosti krmné dávky byla zamítnuta hlavní hypotéza předkládané diplomové práce. Supplementace krmné dávky naším biocharem o konkrétních parametrech (Tab. č. 2) prokazatelně nezvýšila fermentační aktivitu mikrobiomu ve slepém a tlustém střevě koní. Tento biochar neovlivnil stravitelnost krmné dávky ani krevní parametry koní. Byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi pH výkalů krmné dávky bez přidaného biocharu a s ním. Náš biochar prokazatelně zvýšil pH výkalů ($P < 0,05$). V budoucích studiích je třeba ověřit, zda i biochary z jiných rostlinných materiálů budou k symbiotickým mikrobiotům inertní. Předmětem dalších pokusů by mohlo být využití biocharů při prevenci kolik, schvácení kopyt (například zvýšeným dávkováním biocharu v krmné dávce před zahájením pastevní sezóny) a průjmových onemocnění u koní s výraznou predispozicí k těmto chorobám.

8 Literatura

Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Ok, Y. S. 2014. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere*, **99**: 19-33.

Alshannaq, A., Yu, J. H. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, **14(6)**: 632.

Amonette, J. E., Joseph, S. 2009. Characteristics of biochar: microchemical properties. Pages 33-52 in: Joseph, S., & Lehmann, J., editors. *Biochar for environmental management: Science and technology*. Earthscan. London. United Kingdom.

Antal, M. J., Grønli, M. 2003. The art, science, and technology of charcoal production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **42(8)**: 1619-1640.

AOAC. 2005. *Official Methods of Analyses*. 18th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg. USA.

Archer, D. C., Proudman, C. J. 2006. Epidemiological clues to preventing colic. *The Veterinary Journal*, **172(1)**: 29-39.

Baker, J. R., Ellis, C. E. 1981. A survey of post mortem findings in 480 horses 1958 to 1980: Causes of death. *Equine veterinary journal*, **13(1)**: 43-46.

Boehm, H. P. 1994. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. *Carbon*, **32(5)**: 759-769.

Bryant, C. E., Moore, J. N. 2008. Systemic inflammatory response syndrome: endotoxemia reconsidered. Pages 192-200 in White, N. A., Moore, J. N., Mair, T. S., editors. *The equine acute abdomen*. Teton NewMedia. Jackson, Wyo.

Burlikowska, K., Bogusławska-tryk, M., Szymeczko, R., Piotrowska, A. 2015. Haematological and biochemical blood parameters in horses used for sport and recreation. *Journal of Central European Agriculture*, **16**: 370–382.

Burrows, G. E. 1981. Endotoxaemia in the horse. *Equine veterinary journal*, **13(2)**: 89-94.

Cárdenas-Aguilar, E., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Méndez, A. 2017. The effect of biochar and compost from urban organic waste on plant biomass and properties of an artificially copper polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **124**: 223-232.

Clarke, L. L., Roberts, M. C., Argenzio, R. A. 1990. Feeding and digestive problems in horses: physiologic responses to a concentrated meal. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **6(2)**: 433-450.

Cohen, N. D. 2009. Epidemiology of Colic. Pages 218–231 in White, N. A., Moore, J. N., Mair, T. S., editors. *The equine acute abdomen*. CRC Press. Jackson, Wyo.

- Cole, R. J., Cox, R. H. 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press. New York.
- Costa, M. C., Arroyo, L. G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H. R., Kim, P. T., Sturgeon, A., Weese, J. S. 2012. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PloS one*, **7(7)**: e41484.
- Costa, M. C., Weese, J. S. 2018. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, **34(1)**: 1-12.
- Cysewski, S. J., Pier, A. C., Baetz, A. L., Cheville, N. F. 1982. Experimental equine aflatoxicosis. *Toxicology and applied pharmacology*, **65(3)**: 354-365.
- Decker, W. J., Corby, D. G. 1970. Activated charcoal as a gastrointestinal decontaminant: Experiences with experimental animals and human subjects. *Clinical toxicology*, **3(1)**: 1-4.
- Demirbas, A., Arin, G. 2002. An overview of biomass pyrolysis. *Energy sources*, **24(5)**: 471-482.
- Di Natale, F., Gallo, M., Nigro, R. 2009. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering*, **95(1)**: 186-191.
- Diaz, D. E., Hagler, W. M., Blackwelder, J. T., Eve, J. A., Hopkins, B. A., Anderson, K. L., Whitlow, L. W. 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, **157(2)**: 233-241.
- Ding, W., Dong, X., Ime, I. M., Gao, B., Ma, L. Q. 2014. Pyrolytic temperatures impact lead sorption mechanisms by bagasse biochars. *Chemosphere*, **105**: 68-74.
- Dobson, R. C., Fakey, J. E., Ballee, D. L., Baugh, E. R. 1971. Reduction of chlorinated hydrocarbon residues in swine. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **6(2)**: 189-192.
- Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H., Flachowsky, G. 2004. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Archives of Animal Nutrition*, **58(4)**: 311-324.
- Downie, A., Crosky, A., Munroe, P. 2009. Physical properties of biochar. Pages 13–32 In Lehmann, J., Joseph, S., editors. *Biochar for environmental management: Science and technology*. Earthscan, London
- Dušek, J., Misař, D., Müller, Z., Navrátil, J., Rajman, J., Tluchoř, V., Žlumov, P. 2011. *Chov koní*. Nakladatelství Brázda, s.r.o. Praha.
- Edmunds, J. L., Worgan, H. J., Dougal, K., Girdwood, S. E., Douglas, J. L., McEwan, N. R. 2016. In vitro analysis of the effect of supplementation with activated charcoal on the equine hindgut. *Journal of equine science*, **27(2)**: 49-55.

Erickson, P. S., Whitehouse, N. L., Dunn, M. L. 2011. Activated carbon supplementation of dairy cow diets: effects on apparent total-tract nutrient digestibility and taste preference. *The Professional Animal Scientist*, **27(5)**: 428-434.

European Commission (EC). 2020. Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003: Annex II: List of additives subject to the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003 for which no application for reevaluation was submitted before the deadline of 8 November 2010. Brussels. Belgium. Available from: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03_annex2.pdf (Accessed March 2021)

Evropská komise. 2011. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 574/2011 ze dne 16. června 2011, kterým se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, pokud jde o maximální limity dusitanů, melaminu, Ambrosia spp. a o křížovou kontaminaci určitými kokcidiostatiky a histomonostatiky, a kterým se konsolidují přílohy I a II uvedené směrnice. Pages 7-24 in *Úřední věstník Evropské unie* L159. Strasbourg.

Evropská komise. 2013. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 122/2013 ze dne 12. února 2013, kterým se mění nařízení (ES) č. 1950/2006, kterým se v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES o kodexu Společenství týkajícím se veterinárních léčivých přípravků stanoví seznam základních látek k léčbě koňovitých. Pages 1-17 in *Úřední věstník Evropské unie* L42/2. Strasbourg.

Evropská komise. 2016. DOPORUČENÍ KOMISE (EU) č. 2016/1319 ze dne 29. července 2016, kterým se mění doporučení Komise 2006/576/ES, pokud jde o deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A v krmivu pro zvířata v zájmovém chovu. Pages 58-60 in *Úřední věstník Evropské unie* L208. Strasbourg.

European Biochar Certificate (EBC). 2012. European Biochar Certificate – Guidelines for a sustainable production of biochar. Arbaz. Switzerland. Available from: https://www.european-biochar.org/media/doc/2/version_en_9_2e.pdf (Accessed February 2021).

European Biochar Certificate (EBC). 2014. Comparison of European Biochar Certificate Version 4. 8 and IBI Biochar Standards Version 2.0. Arbaz. Switzerland. Available from: <https://www.european-biochar.org/biochar/media/doc/IBI-EBC.pdf> (Accessed March 2021).

European Biochar Certificate (EBC). 2020. Positive list of permissible biomasses for the production of biochar. Arbaz. Switzerland. Available from: https://www.european-biochar.org/media/doc/2/positivliste_en_2020.pdf (Accessed March 2021)

European Biochar Certificate (EBC). 2021. THE EUROPEAN BIOCHAR CERTIFICATE (EBC). Arbaz. Switzerland. Available from: <https://www.european-biochar.org/en/home> (Accessed March 2021).

Fidel, R. B., Laird, D. A., Spokas, K. A. 2018. Sorption of ammonium and nitrate to biochars is electrostatic and pH-dependent. *Scientific reports*, **8(1)**: 1-10.

Frape, D. 2006. *Equine nutrition and feeding*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A., Piva, G. 1996. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *Journal of food protection*, **59(5)**: 551-554.
- Geor, R. J., Coenen, M., Harris, P. 2013. *Equine applied and clinical nutrition E-book: Health, welfare and performance*. Elsevier Health Sciences.
- Gerlach, A., Schmidt, H. P. 2012. Pflanzenkohle in der Rinderhaltung. *Ithaka Journal*, **1**: 80-84.
- Gerlach H, Gerlach A, Schrödl W, Schottdorf B, Haufe S, Helm H, Shehata A, Krüger M. 2014. Oral application of charcoal and humic acids to dairy cows influences *Clostridium botulinum* blood serum antibody level and glyphosate excretion in urine. *Journal of Clinical Toxicology* **4(2)**: 186-194.
- Godlewska, P., Schmidt, H. P., Ok, Y. S., Oleszczuk, P. 2017. Biochar for composting improvement and contaminants reduction. A review. *Bioresource Technology*, **246**: 193-202.
- Gonçalves, S., Julliand, V., Leblond, A. 2002. Risk factors associated with colic in horses. *Veterinary research*, **33(6)**: 641-652.
- Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. A., Moore, S. S. 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS microbiology letters*, **288(1)**: 85-91.
- Hagemann, N., Spokas, K., Schmidt, H. P., Kägi, R., Böhler, M. A., Bucheli, T. D. 2018. Activated carbon, biochar and charcoal: linkages and synergies across pyrogenic carbon's ABCs. *Water*, **10(2)**: 182.
- Hall, K. E., Spokas, K. A., Gamiz, B., Cox, L., Papiernik, S. K., Koskinen, W. C. 2018. Glyphosate sorption/desorption on biochars—interactions of physical and chemical processes. *Pest management science*, **74(5)**: 1206-1212.
- Hansen, H. H., Storm, I. D., Sell, A. M. 2012. Effect of biochar on in vitro rumen methane production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science*, **62(4)**: 305-309.
- Harlow, B. E., Lawrence, L. M., Flythe, M. D. 2013. Diarrhea-associated pathogens, lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces: Responses to antibiotic challenge. *Veterinary microbiology*, **166(1-2)**: 225-232.
- Harris, P. 2011. Laminitis after 2000 years: adding bricks to our wall of knowledge. *Veterinary Journal*, **191(3)**: 273-274.
- Harris, P. A., Geor, R. 2010. Recent advances in the understanding of laminitis and obesity. Pages 215-233 in Ellis, A. D., Longland, A. C., Coenen, M., Miraglia, N., editors. *The impact of nutrition on the health and welfare of horses*. Wageningen. The Netherlands.
- Herath, I., Kumarathilaka, P., Al-Wabel, M. I., Abduljabbar, A., Ahmad, M., Usman, A. R., Vithanage, M. 2016. Mechanistic modeling of glyphosate interaction with rice husk derived engineered biochar. *Microporous and mesoporous materials*, **225**: 280-288.

Heymering, H. W. 2010. 80 causes, predispositions, and pathways of laminitis. *The Veterinary Clinics Of North America*, **26(1)**: 13.

Hintz, H. F. 1990^a. Preface. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **6(2)**: ix.

Hintz, H. F. 1990^b. Molds, mycotoxins, and mycotoxicosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **6(2)**: 419-431.

Hood, D. M. 1999. Laminitis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **15(2)**: 287-294.

Hudson, J. M., Cohen, N. D., Gibbs, P. G., Thompson, J. A. 2001. Feeding practices associated with colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **219(10)**: 1419-1425.

Hui, T. S., Zaini, M. A. A. 2015. Potassium hydroxide activation of activated carbon: a commentary. *Carbon letters*, **16(4)**: 275-280.

Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters*, **122(2)**: 179-188.

Cha, J. S., Park, S. H., Jung, S. C., Ryu, C., Jeon, J. K., Shin, M. C., Park, Y. K. 2016. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **40**: 1-15.

Chapman, A. M. 2009. Acute diarrhea in hospitalized horses. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, **25(2)**: 363-380.

Cheah, S., Jablonski, W. S., Olstad, J. L., Carpenter, D. L., Barthelemy, K. D., Robichaud, D. J., Westover, T. L. 2016. Effects of thermal pretreatment and catalyst on biomass gasification efficiency and syngas composition. *Green Chemistry*, **18(23)**: 6291-6304.

Chu, G. M., Kim, J. H., Kim, H. Y., Ha, J. H., Jung, M. S., Song, Y., Song, Y. M. 2013^a. Effects of bamboo charcoal on the growth performance, blood characteristics and noxious gas emission in fattening pigs. *Journal of Applied Animal Research*, **41(1)**: 48-55.

Chu, G. M., Jung, C. K., Kim, H. Y., Ha, J. H., Kim, J. H., Jung, M. S., Song, Y. M. 2013^b. Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar as antibiotic alternatives on growth performance, immune responses and fecal microflora population in fattening pigs. *Animal Science Journal*, **84(2)**: 113-120.

Ilomuanya, M. O., Ifudu, N. D., Uboh, C. 2011. The use of metronidazole and activated charcoal in the treatment of diarrhea caused by *Escherichia coli* 0157: H7 in an in vitro pharmacodynamic model. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **5(10)**: 1292-1296.

International Biochar Initiative (IBI). 2018^a. Biochar Is a Valuable Soil Amendment. New York. United States. Available from: <https://biochar-international.org/biochar/> (Accessed March 2021).

- International Biochar Initiative (IBI). 2018^b. IBI strategies. New York. United States. Available from: <https://biochar-international.org/about-ibi/> (Accessed March 2021).
- Ippolito, J. A., Spokas, K. A., Novak, J. M., Lentz, R. D., Cantrell, K. B. 2015. Biochar elemental composition and factors influencing nutrient retention. Pages 139-163 in Lehmann, J., Joseph, S., editors. *Biochar for environmental management: Science, technology and implementation*. Routledge: Oxford. United Kingdom
- Ireland, J. L., Clegg, P. D., McGowan, C. M., Platt, L., Pinchbeck, G. L. 2011. Factors associated with mortality of geriatric horses in the United Kingdom. *Preventive veterinary medicine*, **101(3-4)**: 204-218.
- Jeffcott, L. B., Field, J. R., McLean, J. G., O'DEA, K. E. R. I. N. 1986. Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine veterinary journal*, **18(2)**: 97-101.
- Jeffery, S., Verheijen, F. G., Kammann, C., Abalos, D. 2016. Biochar effects on methane emissions from soils: a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **101**: 251-258.
- Joch, M., Kudrna, V. 2020. Partial replacement of soybean meal by white lupine seeds in the diet of dairy cows. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, **33(6)**: 957.
- Joseph, S. D., Camps-Arbestain, M., Lin, Y., Munroe, P., Chia, C. H., Hook, J., Amonette, J. E. 2010. An investigation into the reactions of biochar in soil. *Soil Research*, **48(7)**: 501-515.
- Joseph, S., Doug, P. O. W., Dawson, K., Mitchell, D. R., Rawal, A., James, H. O. O. K., Solaiman, Z. M. 2015. Feeding biochar to cows: an innovative solution for improving soil fertility and farm productivity. *Pedosphere*, **25(5)**: 666-679.
- Julliard, V., Grimm, P. 2016. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *Journal of Animal Science*, **94(6)**: 2262–2274.
- Kammann, C. I., Schmidt, H. P., Messerschmidt, N., Linsel, S., Steffens, D., Müller, C., Joseph, S. 2015. Plant growth improvement mediated by nitrate capture in co-composted biochar. *Scientific reports*, **5(1)**: 1-13.
- Kammann, C., Ippolito, J., Hagemann, N., Borchard, N., Cayuela, M. L., Estavillo, J. M., Wrage-Mönnig, N. 2017. Biochar as a tool to reduce the agricultural greenhouse-gas burden—knowns, unknowns and future research needs. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, **25(2)**: 114-139.
- Kelmer, G. 2009. Update on treatments for endotoxemia. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, **25(2)**: 259-270.
- Kienzle, E., Zehnder, C., Pfister, K., Gerhards, H., Sauter-Louis, C., Harris, P. 2016. Field study on risk factors for free fecal water in pleasure horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, **44**: 32-36.
- Klüpfel, L., Keiluweit, M., Kleber, M., Sander, M. 2014. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environmental science & technology*, **48(10)**: 5601-5611.

Knottenbelt, D. C., Malalana, F. 2014. Saunders Equine Formulary E-Book. Elsevier Health Sciences. Edinburgh. England.

Kothe E. 2011. Microbial Degradation. Pages 596-599 In: Reitner J., Thiel V. editors. Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer. Dordrecht.

Kutlu, H. R., Ünsal, I., Görgülü, M. 2001. Effects of providing dietary wood (oak) charcoal to broiler chicks and laying hens. Animal feed science and technology, **90(3-4)**: 213-226.

Laird, D. A. 2008. The charcoal vision: a win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality. Agronomy journal, **100(1)**: 178-181.

Lee, X. J., Lee, L. Y., Gan, S., Thangalazhy-Gopakumar, S., Ng, H. K. 2017. Biochar potential evaluation of palm oil wastes through slow pyrolysis: thermochemical characterization and pyrolytic kinetic studies. Bioresource technology, **236**: 155-163.

Lehmann, J., Joseph, S. 2015. Biochar for environmental management: An introduction Pages 1-12 In: Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation, Lehmann, J., Joseph, S., Editors. Routledge: Oxford. United Kingdom.

Leng, R. A., Inthapanya, S., Preston, T. R. 2012. Methane production is reduced in an in vitro incubation when the rumen fluid is taken from cattle that previously received biochar in their diet. Gas, **1050(1488)**: 1367.

Leng, R. A., Inthapanya, S., Preston, T. R. 2013. All biochars are not equal in lowering methane production in in vitro rumen incubations. Livestock Research for Rural Development, **25**: 106.

Leng, R. A. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. Animal Production Science, **54(5)**: 519-543.

Liu, F., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Nevin, K. P., Lovley, D. R. 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. Energy & Environmental Science, **5(10)**: 8982-8989.

Liesener, K., Curtui, V., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Usleber, E. 2010. Mycotoxins in horse feed. Mycotoxin research, **26(1)**: 23-30.

Lohmann, K. L., Barton, M. H. 2014. Systemic Inflammatory Response Syndrome. Pages 119-131 In: Sellon, D. C., Long, M., editors. Equine Infectious Diseases E-Book. Elsevier Health Sciences.

Lua, A. C., Yang, T., Guo, J. 2004. Effects of pyrolysis conditions on the properties of activated carbons prepared from pistachio-nut shells. Journal of analytical and applied pyrolysis, **72(2)**: 279-287.

Lumsden, J. H., Rowe, R., Mullen, K. 1980. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. Canadian Journal of Comparative Medicine, **44(1)**: 32.

- Mair, T. S. 2002. Chronic diarrhea. Pages 427-446. In: Mair, T. S., Divers, T., Ducharme, N., editors. Manual of equine gastroenterology. Saunders. New York/London.
- Mair, T. S., Hillyer, M. H. 1997. Chronic colic in the mature horse: a retrospective review of 106 cases. *Equine veterinary journal*, **29(6)**: 415-420.
- Major, J. 2010. Guidelines on practical aspects of biochar application to field soil in various soil management systems. International Biochar Initiative. New York. United States. Available from <https://biogrow.co.za/wp-content/uploads/2017/11/Biochar-Info-BI1.pdf> (accessed March 2021)
- Man, K. Y., Chow, K. L., Man, Y. B., Mo, W. Y., Wong, M. H. 2021. Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **51(2)**: 187-217.
- Martin-Rosset, W. 2015. Equine nutrition: INRA nutrient requirements, recommended allowances and feed tables. Wageningen Academic Publishers. Paris. France.
- Mašek, O., Buss, W., Sohi, S. 2018. Standard biochar materials. *Environmental science & technology*, **52(17)**: 9543-9544.
- McAvoy, D. J., Burritt, B., Villalba, J. J. 2020. Use of biochar by sheep: impacts on diet selection, digestibility, and performance. *Journal of Animal Science*, **98(12)**: skaa380.
- McHenry, M. P. 2010. Carbon-based stock feed additives: a research methodology that explores ecologically delivered C biosequestration, alongside live weights, feed use efficiency, soil nutrient retention, and perennial fodder plantations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90(2)**: 183-187.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Phillips, T. D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, **35(8)**: 807-820.
- Medugu, C. I., Saleh, B., Igwebuike, J. U., Ndirmbita, R. L. 2012. Strategies to improve the utilization of tannin-rich feed materials by poultry. *International Journal of Poultry Science*, **11(6)**: 417.
- Mekbungwan, A., Yamauchi, K., Sakaida, T. 2004. Intestinal villus histological alterations in piglets fed dietary charcoal powder including wood vinegar compound liquid. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, **33(1)**: 11-16.
- Mézes, M., Balogh, K., Tóth, K. 2010. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins—A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, **58(1)**: 1-17.
- Milinovich, G. J., Klieve, A. V., Pollitt, C. C., Trott, D. J. 2010. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, **26(1)**: 79-94.

- Mitchell, P. J., Dalley, T. S., Helleur, R. J. 2013. Preliminary laboratory production and characterization of biochars from lignocellulosic municipal waste. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **99**: 71-78.
- Moore, J. N. 1988. Recognition and treatment of endotoxemia. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **4(1)**: 105-113.
- Moore, J. N., Barton, M. H. 2003. Treatment of endotoxemia. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, **19(3)**: 681-695.
- Mukherjee, A., Zimmerman, A. R., Harris, W. 2011. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. *Geoderma*, **163(3-4)**: 247-255.
- Naka, K., Watarai, S., Inoue, K., Kodama, Y., Oguma, K., Yasuda, T., Kodama, H. 2001. Adsorption effect of activated charcoal on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63(3)**: 281-285.
- Novak, J.M., Lima, I.M., Xing, B., Gaskin, J.W., Steiner, C., Das, K.C., Ahmedna, M., Rehrh, D., Watts, D.W., Busscher, W.J., Schomberg, H., 2009. Characterization of designer biochar produced at different temperatures and their effects on a loamy sand. *Annals of Environmental Science*, **3**: 195-206.
- National Research Council (NRC). 1961. *Nutrient Requirements of Horses*. The National Academies Press. Washington, DC.
- O'Toole, A., Andersson, D., Gerlach, A., Glaser, B., Kammann, C. I., Kern, J., Kuoppamäki, K., Mumme, J., Schmidt H.-P., Schulze, M., Srocke, F. S. M., Stenström, J. 2016. Current and future applications for biochar. Pages 253–280 In: Shackley S, Ruyschaert G, Zwart K, Glaser B, editors. *Biochar in European Soils and Agriculture: Science and Practice*. Taylor & Francis Group. Abington.
- Oliver, O. E., Stämpfli, H. 2006. Acute diarrhea in the adult horse: case example and review. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, **22(1)**: 73-84.
- Osweiler, G. D. 2001. Mycotoxins. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **17(3)**: 547-566.
- Park, D. L. 1993. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Additives & Contaminants*, **10(1)**: 49-60.
- Pereira, R. C., Muetzel, S., Arbestain, M. C., Bishop, P., Hina, K., Hedley, M. 2014. Assessment of the influence of biochar on rumen and silage fermentation: a laboratory-scale experiment. *Animal Feed Science and Technology*, **196**: 22-31.
- Phongphanith, S., Preston, T. R. 2018. Effect of rice-wine distillers' byproduct and biochar on growth performance and methane emissions in local "Yellow" cattle fed ensiled cassava root, urea, cassava foliage and rice straw. *Livestock Research for Rural Development*, **28**: 178.

- Pierezan, F., Rissi, D. R., Rech, R. R., Figuera, R. A., Brum, J. S., Barros, C. S. 2009. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 eqüinos: 1968-2007. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29(3)**: 275-280.
- Pollitt, C. C. 2004. Equine laminitis. *Clinical Techniques in equine practice*, **3(1)**: 34-44.
- Pratt-Phillips, S. E., Stuska, S., Beveridge, H. L., Yoder, M. 2011. Nutritional quality of forages consumed by feral horses: The horses of Shackelford Banks. *Journal of Equine Veterinary Science*, **31(11)**: 640-644.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. 2006. *Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- Richards, N., Choct, M., Hinch, G. N., Rowe, J. B. 2004. Examination of the use of exogenous α -amylase and amyloglucosidase to enhance starch digestion in the small intestine of the horse. *Animal feed science and technology*, **114(1-4)**: 295-305.
- Sadet-Bourgeteau, S., Philippeau, C., Julliand, V. 2017. Effect of concentrate feeding sequence on equine hindgut fermentation parameters. *animal*, **11(7)**: 1146-1152.
- Saleem, A. M., Ribeiro Jr, G. O., Yang, W. Z., Ran, T., Beauchemin, K. A., McGeough, E. J., McAllister, T. A. 2018. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet. *Journal of animal science*, **96(8)**: 3121-3130.
- Shi, R. Y., Hong, Z. N., Li, J. Y., Jiang, J., Baquy, M. A. A., Xu, R. K., Qian, W. 2017. Mechanisms for increasing the pH buffering capacity of an acidic Ultisol by crop residue-derived biochars. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **65(37)**: 8111-8119.
- Schmidt, H. P. 2013. Novel uses of biochar. 2013 USBI United States Biochar Initiative. Available from: <https://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1011&context=biochar> (Accessed March 2021).
- Schmidt, H. P., Hagemann, N., Draper, K., Kammann, C. 2019. The use of biochar in animal feeding. *PeerJ*, **7**: e7373.
- Sivilai, B., Preston, T. R., Leng, R. A., Hang, D. T., Linh, N. Q. 2018. Rice distillers' byproduct and biochar as additives to a forage-based diet for growing Moo Lath pigs; effects on growth and feed conversion. *Livestock Research for Rural Development*, **30(6)**: 111.
- Steiner, C., Das, K. C., Melear, N., Lakly, D. 2010. Reducing Nitrogen Loss during Poultry Litter Composting Using Biochar. *Journal of Environment Quality*, **39(4)**: 1236.
- Struhsaker, T. T., Cooney, D. O., Siex, K. S. 1997. Charcoal consumption by Zanzibar red colobus monkeys: its function and its ecological and demographic consequences. *International Journal of Primatology*, **18(1)**: 61-72.

Sun, T., Levin, B. D., Guzman, J. J., Enders, A., Muller, D. A., Angenent, L. T., Lehmann, J. 2017. Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon. *Nature Communications*, **8(1)**: 1-12.

Švehlová, D. 1999. Jak se vyhnout schvácení kopyt. Equichannel.cz. Available from www.equichannel.cz (accessed January 2020).

Tapprest, J., Foucher, N., Linster, M., Laloy, E., Cordonnier, N., Amat, J. P., Hendrikx, P. 2019. Resumeq: a novel way of monitoring equine diseases through the centralization of necropsy data. *Frontiers in veterinary science*, **6**: 135.

Teoh, R., Caro, E., Holman, D. B., Joseph, S., Meale, S. J., Chaves, A. V. 2019. Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation. *Frontiers in microbiology*, **10**: 1534.

Thies, J., and Rillig, M. 2009. Characteristics of biochar: biological properties Pages 85-106 in Lehmann, J., Joseph, S., editors. *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, 1 Edn. Taylor and Francis Ltd. London. United Kingdom.

Tomczyk, A., Sokołowska, Z., Boguta, P. 2020. Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **19(1)**: 191-215.

Toth, J. D., Dou, Z. 2016. Use and impact of biochar and charcoal in animal production systems. *Agricultural and environmental applications of biochar: advances and barriers*, **63**: 199-224.

USDA. 2017. Equine mortality in the United States, 2015. Center for Epidemiology and Animal Health, Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), United States Department of Agriculture (USDA). Available from https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/equine15/Equine15_is_Mortality.pdf (accessed February 2021).

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). 2016. Digestáty a jejich využití v zemědělství. Praha. Česká republika. Available from: http://eagri.cz/public/web/file/458518/Digestaty_final2_WEB_optim.pdf (Accessed March 2021).

Van, D. T. T., Mui, N. T., Ledin, I. 2006. Effect of method of processing foliage of *Acacia mangium* and inclusion of bamboo charcoal in the diet on performance of growing goats. *Animal feed science and technology* **130(3-4)**: 242-256

Valle, E., Gandini, M., Bergero, D. 2013. Management of chronic diarrhea in an adult horse. *Journal of equine veterinary science*, **33(2)**: 130-135.

Villalba, J. J., Provenza, F. D., Banner, R. E. 2002. Influence of macronutrients and activated charcoal on intake of sagebrush by sheep and goats. *Journal of Animal Science*, **80(8)**: 2099-2109.

Viswanathan, B., Neel, P. I., Varadarajan, T. K. 2009. Methods of activation and specific applications of carbon materials. National Centre for Catalysis Research, Indian Institute of Technology Madras. Chennai. India.

Wang, G., Li, Q., Gao, X., Wang, X. C. 2018. Sawdust-derived biochar much mitigates VFAs accumulation and improves microbial activities to enhance methane production in thermophilic anaerobic digestion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **7(2)**: 2141-2150.

Watarai, S., Koiwa, M. 2008. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. *Journal of dairy science*, **91(4)**: 1458-1463.

Watarai, S., Tana. 2005. Eliminating the carriage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in domestic fowls by feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (Nekka-Rich). *Poultry Science*, **84(4)**: 515–521.

Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, **39(8)**: 971-974.

Wilson, T. M., Ross, P. F., Rice, L. G., Osweiler, G. D., Nelson, H. A., Owens, D. L., Pickrell, J. W. 1990. Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **2(3)**: 213-216.

Yu, L., Yuan, Y., Tang, J., Wang, Y., Zhou, S. 2015. Biochar as an electron shuttle for reductive dechlorination of pentachlorophenol by *Geobacter sulfurreducens*. *Scientific reports*, **5(1)**: 1-10.

Yuan, Y., Bolan, N., PrévotEAU, A., Vithanage, M., Biswas, J. K., Ok, Y. S., Wang, H. 2017. Applications of biochar in redox-mediated reactions. *Bioresource Technology*, **246**: 271-281.