Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

Česká zemědělská
univerzita v Praze

Hodnocení stravitelnosti fosforu u odstávčat v Národním hřebčínu Kladruby nad Labem

Diplomová práce

Bc. Kristýna Petričáková

Výživa zvířat a dietetika

Ing. Martina Janošíková

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Hodnocení stravitelnosti fosforu u odstávčat v Národním hřebčínu Kladruby nad Labem" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové za čas, trpělivost a rady, které mi při zpracování diplomové práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Raichové za vstřícnost a spolupráci zejména při sbírání vzorků pro tuto práci a Výzkumnému ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi za možnost zpracování a analýzy vzorků. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za rady a slova podpory, kterých se mi od nich během psaní dostávalo.

Hodnocení stravitelnosti fosforu u odstávčat v Národním hřebčínu Kladruby nad Labem

Souhrn

Cílem práce bylo potvrdit hypotézu, zda složení krmné dávky odstávčat bude mít vliv na stravitelnost a vylučování fosforu v trusu. Záměrem práce bylo rovněž stanovit stravitelnosti dalších vybraných živin v krmné dávce odstávčat v Národním hřebčínu Kladruby nad Labem.

Do pokusu byla vybrána skupina 16 koní, ve které se nacházeli jedinci stejného pohlaví i věku. Všemi odstávčaty byli hřebci, jejichž průměrný věk na začátku pokusu byl 8 měsíců.

Koním byly podávány krmné dávky, které jsou v hřebčíně standardně zkrmovány. Koně byli krmeni dvakrát denně. V době zahájení pokusu bylo koním podáváno 7 kg sena a 1 kg ovsa. Pokus byl proveden mimo pastevní období.

Analýza živinového složení krmiv a výkalů byla provedena v laboratoři KMVD na ČZU a ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi. Sledovanými ukazateli byly: sušina, popelovina, dusíkaté látky, neutrálně-detergentní a aciodetergentní vláknina, acido-detergenntí lignin, písek, vápník a fosfor.

Na základě výsledků bylo zjištěno množství strávených živin a byla vypočítána jejich stravitelnost. Při výpočtu stravitelnosti živin byla zjištěna vyšší stravitelnost neutrálně-detergentní vlákniny, vápníku a fosforu.

Stravitelnost sušiny byla 69,79 % ± 0,13, popelovin 40,50 % ± 8,93, dusíkatých látek 53,98 % ± 20,46, NDF 55,34 % ± 20,82 a ADF 69,77 % ± 14,85. Stravitelnost vápníku byla vypočtena na 58,79 % ± 16,38 a fosforu 63,92 % ± 17,53.

Výsledky dokazují, že stravitelnost fosforu je u odstavených hříbat vysoká, a že nutriční potřebu tohoto prvku lze pokrýt i bez přídavku anorganické formy do krmné dávky.

Klíčová slova: krmná dávka, stravitelnost fosforu, odstávčata, výživa koní, Starokladrubský kůň

Evaluation of phosphorus digestibility in weaners in the National Stud at Kladruby nad Labem

Summary

The aim of the study was to confirm the hypothesis whether the composition of the feed ration will affect the phosphosrus digestibility and excretion in faeces. The aim of the thesis was also to determine the digestibility of other selected nutrients in the feed ration of weaners in the National Stud at Kladruby nad Labem.

A group of 16 horses was selected for the experiment. All of the weaners were stallions of the same age. The average age of this group was 8 months at the beginning of the experiment.

The horses were fed rations, which are fed as standard in the National Stud. The horses were fed twice a day. At the start of the experiment, the horses were given 7 kg of hay and 1 kg of oats. The experiment was performed outside the grazing period.

The analysis of the nutrient composition of feed and faeces was performed in the KMVD laboratory at the CULS and in the Research Institute of Animal Production in Uhříněves. The monitored indicators were: dry matter, ash, nitrogenous substances, neutral-detergent and aciodetergent fiber, acid-detergent lignin, AIA, calcium and phosphorus.

Based on the results, the amount of digested nutrients was determined and their digestibility was calculated. When calculating the digestibility of nutrients, a higher digestibility of neutral-detergent fiber, calcium and phosphorus was found.

The digestibility of dry matter was 69.79 % ± 0.13, ash 40.50 % ± 8.93, nitrogenous substances 53.98 % ± 20.46, NDF 55.34 % ± 20.82 and ADF 69.77 % ± 14.85. Digestibility of calcium was calculated to be 58.79 % ± 16.38 and phosphorus 63.92 % ± 17.53.

The results prove that the digestibility of phosphorus is high in weaners. The nutritional need of this element can be met in the feed ration without the addition of an inorganic form.

Keywords: feed ration, phosphorus digestibility, weaners, horse nutrition, Kladruber horse

Obsah

1 Úvod 8

2 Vědecká hypotéza a cíle práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Obecná stavba stěny trávicí trubice 10

3.1.1 Sliznice (*tunica mucosa*) 10

3.1.2 Podslizniční tkáň (*tela submucosa*) 10

3.1.3 Svalová vrstva (*tunica muscularis*) 10

3.1.4 Seróza (*tunica serosa*) 10

3.2 Fyziologie trávení koně 11

3.2.1 Trávení v ústní dutině 11

3.2.2 Trávení v žaludku 11

3.2.3 Trávení v tenkém střevě 12

3.2.4 Trávení v tlustém střevě 12

3.3 Metabolismus fosforu 14

3.3.1 Absorpce ve střevech 15

3.3.2 Reabsorpce v ledvinách 17

3.3.3 Exkrece fosforu 19

3.4 Kalcifosfátový metabolismus 19

3.4.1 Poměr vápníku a fosforu 19

3.4.2 Endokrinní řízení homeostázy 19

3.4.3 Poruchy kalcifosfátového metabolismu 21

3.4.3.1 Hypofosfatémie (snížená hladina fosforu v krvi) 21

3.4.3.2 Hyperfosfatémie (zvýšená hladina fosforu v krvi) 22

3.5 Nutriční požadavky koně 24

3.6 Zdroje fosforu v krmivech 25

3.6.1 Fytát 25

3.6.1.1 Hydrolýza fytátu u monogastrů 26

3.6.1.2 Fytáza u koní 27

3.7 Stravitelnost fosforu 28

3.7.1 Zdánlivá stravitelnost 28

3.7.2 Skutečná stravitelnost 28

3.7.2.1 Endogenní ztráty fosforu 29
3.7.3 Faktory ovlivňující biologickou dostupnost fosforu u koní 30
3.7.4 Metody stanovení stravitelnosti fosforu 31
3.8 Fosfor v životním prostředí 33
3.8.1 Vliv chovu koní na životní prostředí 34
3.9 Redukce vyplavování fosforu do vnějšího prostředí 35
4 Metodika 37
4.1 Metody 38
4.1.1 Laboratorní stanovení sušiny a popelovin 38
4.1.2 Laboratorní stanovení písku 39
4.1.3 Laboratorní stanovení dusíkatých látek 40
4.1.4 Laboratorní stanovení detergentní vlákniny a ligninu 41
4.1.5 Laboratorní stanovení celkového fosforu a vápníku 42
4.1.5.1 Laboratorní stanovení fosforu 42
4.1.5.2 Laboratorní stanovení vápníku 42
5 Výsledky 44
5.1 Výsledky analýz živinového složení krmiv 44
5.2 Výsledky analýz živinového složení ve výkalech 44
5.2.1 Shrnutí výsledků stravitelnosti živin v pokusu 44
5.2.2 Grafické znázornění stravitelnosti živin 46
6 Diskuze 47
7 Závěr 49
8 Literatura 51
9 Seznam obrázků, tabulek a grafů 59
10 Seznam použitých zkratek a symbolů 60
11 Samostatné přílohy I

1 Úvod

Hlavní zásadou ve výživě hříbat je udržet jejich přirozeně plynulý vývoj. Pro růst mladých koní je rozhodující období od narození do věku 18 měsíců. Zhruba ve věku 6 měsíců, tedy v době odstavu, hříbata dosahují věku, kdy je správná výživa zcela zásadní. V tomto období je jejich kostra nejvíce náchylná k rozvoji onemocnění nebo vývojových poruch, jako jsou například špatné zaúhlení končetin nebo osteochondritida (Meyer & Coenen 2003). Ve většině případů je příčinou těchto onemocnění dietetická chyba, přičemž se zpravidla jedná o špatný poměr minerálů v dietě. Při krmení odstávčat je proto velmi důležité vybalancovat jejich krmnou dávku. Jedním z prvků, který má stěžejní význam při vývoji a integritě kostry je fosfor (Oliveira et al. 2008).

V krmných dávkách bývá fosfor obvykle hojně zastoupen. Mezi krmiva s relativně vysokým obsahem fosforu lze řadit například zrna obilnin, extrahované šroty z olejnin (sójové či řepkové) nebo některá doplňková krmiva (např. pivovarské kvasnice). Stravitelnost fosforu je ovlivněna jeho formou a množstvím v krmné dávce, případně jeho interakcí s dalšími složkami krmiva a minerály, např. poměrem vápníku a fosforu (Saastamoinen et al. 2020).

Většina organického fosforu se nachází ve formě fytátu. Kyselina fytová má negativní vliv na dostupnost fosforu z rostlinných zdrojů, a tím i na jeho stravitelnost. Nepřežvýkavá zvířata jsou schopna trávit fytát jen omezeně – pouze prostřednictvím mikrobiomu tlustého střeva, který produkuje enzym fytázu potřebný pro uvolnění fosforu (Lavin et al. 2013).

Pro optimální vývoj hříbat se do krmných dávek doplňuje i anorganická forma prvku, aby byla zajištěna jeho biologická dostupnost. Zpravidla se jedná o doplňková minerální krmiva, která obsahují fosfor v podobě monokalcium-fosfátu, dikalcium-fosfátu nebo dihydrogenfosforečnanu sodného (Toribio 2011).

Poslední studie však dokazují, že fytát je pro koně dostupnější, než se dříve myslelo. Například van Doorn et al. (2004) ve své studii uvedli že koně, kteří byli krmeni dietou s monokalcium-fosfátem, měli stejnou stravitelnost fosforu jako koně krmeni dietou obsahující fosfor ve fytátové formě. Výsledky této a jiných studií dokazují, že nutriční potřebu fosforu lze pokrýt i bez přídavku anorganické formy do krmné dávky. Nicméně většina těchto výzkumů se věnuje pouze dospělým koním, a tudíž není známo, zda jsou i rostoucí koně schopni trávit fosfor obdobným způsobem.

Nadměrný příjem fosforu se nemusí týkat jen negativního dopadu na zdraví koně. Již dřívější studie poukazují, že vylučování fosforu u hospodářských zvířat přispívá ke znečištění životního prostředí (Ögren et al. 2013). Ve vodě rozpustný fosfor (anorganická forma) je nejpohyblivější frakcí tohoto prvku a předpokládá se, že představuje největší riziko kontaminace pro povrchové vody (Sharpley et al., 2003). Dále způsobuje eutrofizaci vod, zvyšuje nárůst vodních řas, a tím snižuje hladinu kyslíku, což má škodlivé účinky na vodní organismy (Lavin et al. 2013). Proto je nezbytné věnovat se stravitelnosti prvků u koní, aby nedocházelo k jejich nadbytečnému zkrmování.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem práce bylo hodnocení stravitelnosti fosforu u koní a jeho vylučování do vnějšího prostředí. Potřeba a využití fosforu je u různých skupin koní rozdílná, velkou roli hraje zejména ve výživě rostoucích koní. Tato práce se bude zabývat nutričními potřebami fosforu u odstávčat plemene Starokladrubský kůň v počtu n>10 v jedné skupině se stejnou dietou. Na stravitelnost fosforu bude mít vliv i forma jeho podání, tj. organická nebo anorganická.

Hypotéza

Složení krmné dávky odstávčat má vliv na stravitelnost a vylučování fosforu v trusu. Její úpravou lze ovlivnit množství vyloučeného fosforu a zároveň tím snížit dopad chovu koní na životní prostředí.

3 Literární rešerše

Tato část práce je zaměřena na základní charakteristiku morfologie a fyziologie trávicího systému koně. Dále práce představuje funkci fosforu v organismu koně a jeho metabolismus, nutriční potřebu fosforu u různých skupin koní a zdroje fosforu v krmivech. Poslední část rešerše je věnována fytátům a jejich možného trávení u koní.

3.1 Obecná stavba stěny trávicí trubice

Stěna trávicí trubice se skládá ze čtyř vrtev. Vnitřní stěna je tvořena sliznicí, na kterou navazuje podslizniční tkáň a dále pak hladká svalovina. Na povrchu se nachází vrstva, kterou může být buď seróza nebo adventicie.

3.1.1 Sliznice (*tunica mucosa*)

Vnitřní povrch trávicí trubice je vystlán sliznicí, která má tři hlavní funkce: ochranu vnitřního prostředí, sekreci a vstřebávání. Typická sliznice trávicí trubice se skládá ze tří vrstev: *epitelu, lamina propria mucosae* a *lamina muscularis mucosae*. V epitelu sliznice některých oddílů trubice jsou uloženy i buňky s endokrinní funkcí (Lopes & Pfeiffer 2000).

3.1.2 Podslizniční tkáň (*tela submucosa*)

Podslizniční tkáň je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Tato vrstva je vysoce vaskularizována a obsahuje nervovou pleteň – *plexus submucosus Meissneri*, která je součástí autonomního systému a je důležitá pro kontrolu sekrece trávicí trubice. V některých oddílech jsou v submukóze uloženy žlázy (jícen, duodenum).

Resorpce v trávicí trubici je možná díky vychlípeninám mukózy a submukózy do lumen. Toto uspořádání výrazně zvyšuje povrch pro resorpci prostřednictvím klků a mikroklků (Reece 2011).

3.1.3 Svalová vrstva (*tunica muscularis*)

Svalová vrstva trávicí trubice se skládá ze dvou vrstev hladké svaloviny. V jícnu se nachází příčně pruhovaná svalovina, která je opět uspořádána ze dvou vrstev jako vnitřní cirkulární a zevní longitudinální. Mezi oběma vrstvami je vazivová vrstvička, nesoucí cévní pleteně a nervový *plexus myentericus Auerbachi*. Tento plexus kontroluje hlavně motilitu (Lopes & Pfeiffer 2000).

3.1.4 Seróza (*tunica serosa*)

Tunica serosa kryje orgány uložené v peritoneální dutině. Jedná se o vrstvičku kolagenního vaziva, na kterou nasedá jednovrstevný plochý epitel – mezotel.

Tunica adventitia je označení pro vazivo obklopující orgány mimo peritoneální dutinu a neobsahuje mezotel. Nachází se v místech trávicí trubice, která jsou přímo připojena k přilehlým strukturám (Reece 2011).

3.2 Fyziologie trávení koně

Kůň patří mezi nepřežvýkavé býložravce. Hlavní funkcí trávicí soustavy koně je zpracování přijatého krmiva za účelem pokrytí stavebních a energetických potřeb daného zvířete (Meyer & Coenen 2003). Přijaté sousto je po mechanickém zpracování vystaveno trávicím procesům, během nichž dochází k rozložení přijatého krmiva na jeho základní složky schopné přechodu do krve. Nestrávené zbytky jsou vyloučeny z těla ve formě výkalů (Jelínek & Koudela 2003).

3.2.1 Trávení v ústní dutině

Samotný příjem krmiva začíná v dutině ústní (*cavum oris*), kde dochází k mechanickému a chemickému zpracování krmiva. Sousto je nejprve rozžvýkáno a prosliněno. Kůň za den vyprodukuje asi 20-40 litrů slin v závislosti na typu podávaného krmiva. Zpracování jednoho sousta trvá 25-50 sekund, přičemž užší spodní čelist umožňuje žvýkat sousto současně jen na jedné straně. Kůň může měnit strany po delších intervalech, dokonce po 30-60 minutách (Jelínek & Koudela 2003).

Mechanické zpracování krmiva na částice dlouhé asi 1-4 mm se uskutečňuje pomocí drcení na žvýkacích plochách stoliček. Zvětšení povrchu přijatého krmiva umožňuje jeho snadnou chemickou i mikrobiální degradaci, ke které dochází v dalších částech trávicího traktu (Meyer & Coenen 2003). Dál sousto putuje pomocí peristaltických pohybů jícnu do žaludku, kam vstupuje pod ostrým úhlem, což koni znemožňuje zvracení (Reece 2011).

3.2.2 Trávení v žaludku

Žaludek koně (*ventriculus*) je složitý jednokomorový. Je protáhlého, silně zakřiveného tvaru. V poměru k velikosti koně je poměrně malý, obsah kolísá v rozmezí 15-20 litrů (Meyer & Coenen 2003). Část žláznaté sliznice žaludku produkuje žaludeční šťávy nepřetržitě (10-30 litrů za den) a to i v případě, že žaludek není naplněn (Davies 2009). Specifickým znakem žaludeční šťávy koně je nízký obsah kyseliny chlorovodíkové (asi 0,14 %), tudíž pH je spíše zásadité až neutrální. Z tohoto důvodu jsou v horní bezžláznaté části žaludku (tj. slepý vak) vhodné podmínky pro působení mikroorganismů, které zde tráví lehce rozpustné sacharidy a částečně i bílkoviny. Z těchto procesů trávení vznikají kromě kyseliny mléčné a nižších mastných kyselin také plyny: oxid uhličitý a vodík. Dále pak produkty rozkladu bílkovin: amoniak, fenoly apod. (Meyer & Coenen 2003).

Bílkoviny se v žaludku tráví především v jeho fundu, kde žaludeční žlázy vylučují kyselinu chlorovodíkovou a pepsinogen. Na konci žaludku je jeho obsah rovnoměrně promíchán prostřednictvím silných kontrakcí žaludečních stěn (Jelínek & Koudela 2003).

Žaludeční šťáva u hříbat navíc obsahuje enzym rennin, který je schopný srážet mléko (Davies 2009).

3.2.3 Trávení v tenkém střevě

Tenké střevo koně je poměrně krátké, měří asi 21-25 metrů a je rozděleno na tři části: dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*). Hlavní funkcí tenkého střeva je dokončit trávení sacharidů. Dále zde dochází k trávení tuků na mastné kyseliny a přeměně bílkovin na aminokyseliny. Konečné produkty trávení jsou absorbovány pomocí střevních klků do krevních kapilár. K největší absorpci dochází v lačníku (Meyer & Coenen 2003).

Na začátku tenkého střeva ústí vývod slinivky břišní (*pankreas*) společně se žlučovodem. Díky tomu se do tenkého střeva dostává pankreatická šťáva a žluč, které podporují trávení ve střevě (Davies 2009). Kůň nemá žlučník, proto je žluč průběžně vylučována přímo do dvanáctníku. Její funkcí je mimo jiné emulgace tuků (Meyer & Coenen 2003).

Slinivka břišní produkuje neustále pankreatickou šťávu. Nicméně u koně, na rozdíl od jiných živočišných druhů, obsahuje jen malé množství trávicích enzymů (Meyer & Coenen 2003). Například produkce α-amylázy je v porovnání s ostatními monogastry nízká, proto je vhodné koním podávat upravené obilniny pro zvýšení stravitelnosti škrobu. Pro srovnání, kůň je schopný vyprodukovat pouze 5-6 % produkce tohoto enzymu prasetem. Naopak disponuje vyšší tvorbou maltázy. Škrob se tráví a vstřebává z více než 50 % precekálně, avšak úpravy obilnin toto procento zvyšují (Frape 2010).

V případě, že je koni podána větší dávka koncentrovaného krmiva bohatá na škrob, mohou hodnoty pH v tenkém střevě klesnout na 6 i níže, a to v důsledku tvorby kyseliny mléčné. Kromě možného poškození střevní sliznice a narušení peristaltiky také dochází ke snížení účinnosti trávicích enzymů, pro jejichž působení je optimální pH 7-8 (Meyer & Coenen 2003).

Na konci tenkého střeva je vylučován bikarbonát, takže kyseliny vznikající ve slepém střevě (viz dále) mohou být částečně neutralizovány (Davies 2009).

3.2.4 Trávení v tlustém střevě

U nepřežvýkavých býložravců je ve velké míře vyvinuto tlusté střevo. Je zřetelně rozděleno na slepé střevo (*intestinum caecum*), velký (*colon ascendens*) a malý tračník (*colon descendens*) a konečník (*rectum*) (Meyer & Coenen 2003).

Tlusté střevo koně plní obdobnou úlohu jako předžaludek přežvýkavců. Kůň neprodukuje enzymy, které by byly schopné štěpit celulózu, hemicelulózu nebo lignin. Na trávení vlákniny se tudíž podílí bakterie, houby a protozoa obsažená ve slepém střevě koně (Frape 2010). Účinkem mikrobiální fermentace vznikají těkavé mastné kyseliny: octová, propionová a máselná (Jelínek & Koudela 2003). Tyto kyseliny dále přecházejí stěnou tlustého střeva do krve a zásobují organismus energií. Kůň tímto získává až 30 % potřebné energie (NRC 2007).

Dalšími produkty těchto mikroorganismů mohou být: kyselina mléčná, plyny (amoniak či sulfan), bílkoviny, vitamíny rozpustné ve vodě (především vitamíny skupiny B) a vitamín K (Meyer & Coenen 2003).

Další funkcí tlustého střeva je zpětná resorpce vody, absorpce soli a malého množství vápníku a fosforu (Davies 2009).

Složení mikrobiomu koně závisí na druhu přijímané potravy. Důležitý je především poměr bakterií, které produkují těkavé mastné kyseliny a kyselinu mléčnou (Davies 2009). Při větším příjmu jadrných krmiv (obsah škrobu nad 30 %) vzniká v tlustém střevě více kyseliny mléčné a následně dochází k poklesu pH. S tímto je spojeno riziko rozvoje laminitidy či kolik (Harlow et al. 2016).

V posledním úseku trávicího ústrojí, v malém tračníku a konečníku, se vstřebává voda a obsah střev se více zahustí. Váčkovité vychlípeniny sliznice malého tračníku dodávají koňskému trusu charakteristický tvar. Trus koně tvoří nestrávené zbytky krmiva, trávicí šťávy a bakterie (Meyer & Coenen 2003). Kůň je schopný vyprodukovat za jeden den 9-15 kg výkalů, což tvoří 30-60 % z celkové hmotnosti přijatého krmiva (Jelínek & Koudela 2003). Průměrná doba průchodu obsahu trávicím traktem koně je 24-48 hodin (Reece 2011).

3.3 Metabolismus fosforu

Metabolismus je možné definovat jako systém biochemických reakcí v buňkách i celém organismu, které zabezpečují přeměnu látek přijímaných z vnějšího prostředí a látek vlastního těla. Hlavním cílem látkového metabolismu je zabezpečení životních funkcí organismu (Jelínek & Koudela 2003).

Látková přeměna v organismu se uskutečňuje ve třech rovinách. Jde o trávení a vstřebávání živin, jejich využití v buňkách a vylučování konečných produktů metabolismu prostřednictvím moči, výkalů, potu apod. (Jelínek & Koudela 2003).

Metabolismus živin je kontrolován neurohumorálními a metabolickými regulačními mechanismy, které zajišťují vnitřní stabilitu organismu. Mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují homeostázu spadají: výživa, chovatelské prostředí, březost, laktace, růst, fyzická práce, klimatické podmínky a genetika (Davies 2009).

Na řádné funkci metabolických pochodů se podílí také makroprvky. Mezi nejdůležitější z nich patří fosfor (chemická značka P). Spolu s vápníkem (chemická značka Ca) se nejvýraznější měrou účastní na stavbě kosterní tkáně organismu. Proto je jejich metabolismus a správný poměr příjmu důležitý pro prenatální i postnatální vývoj (Saastamoinen et al. 2020).

Vápník spolu s fosforem patří do skupiny esenciálních minerálních látek a uplatňují se zejména při tvorbě a mineralizaci kostí a zubů. Zároveň tvoří jejich hlavní složku − tzv. hydroxylapatit, který je ze 14-17 % tvořen fosforem (Fowler et al. 2015).

Fosfor má rovněž, vedle své významné role při tvorbě kostí, další důležité funkce. Nachází se ve všech buňkách, protože je součástí nukleových kyselin, fosfoproteinů a fosfolipidů. Je potřebný pro fosforylaci a oxidaci mnohých důležitých enzymů (Saastamoinen et al. 2020).

Z celkového množství fosforu obsaženého v těle se v kostře nachází asi 80–90 %, a to především ve formě fosforečnanu vápenatého, sodného a hořečnatého. Zbytek připadá na tělní tekutiny a měkké tkáně, kde se obvykle vyskytuje ve formě fosfoproteinů. V krvi je fosfor hojně zastoupen v erytrocytech, kde je vázán v organických formách fosfolipidů (Stockham 1995).

V organismu se fosfor vyskytuje ve formě organické i anorganické. Náležitá přeměna fosforu je nutná pro osifikaci kostí a správnou činnost svalů. Pro přeměnu fosforu v organismu je důležitý i dostatek vitamínu D. Vliv má také parathormon. Přebytek se nepříznivě projeví při tvorbě kostí (Meyer & Coenen 2003).

Fosfor je součástí mnoha organických sloučenin, např. fosfoproteinů, nukleoproteinů, fosfolipidů. Kromě toho fosfor tvoří základní substanci makroergních sloučenin jako jsou ATP, ADP, AMP, cAMP a kreatinfosfát (Manghat et al. 2014). Tyto sloučeniny jsou obsaženy ve všech buňkách organismu a jsou zdrojem energie pro jednotlivé reakce, včetně reakcí umožňující svalové kontrakce. Spotřeba těchto sloučenin stoupá se zvyšováním intenzity práce koně a také u kojících klisen a mladých rostoucích koní (Meyer & Coenen 2003).

Fosfor se také podílí na řízení energetických procesů organismu, zejména oxidativní fosforylaci. Obecně je považován za nejuniverzálnější prvek, protože se účastní všech metabolických reakcí, tj. metabolismu bílkovin, tuků a sacharidů, syntézy enzymů, hormonů a vitamínů, jmenujme např. kyselinu fosforečnou, která je součástí vitamínu B1 (Jelínek & Koudela 2003).

V krevní plazmě se množství anorganického fosforu pohybuje od 1 do 3 mmol/l (Reece 2011). Koncentrace organického fosforu v krevní plazmě je třikrát až čtyřikrát vyšší, než fosforu anorganického (Jelínek & Koudela 2003). Dále se může vyskytovat jako hydrogenfosforečnan, který je velmi lehce využitelný pro jednotlivé biochemické reakce. Plazmatická koncentrace fosforu nezávisí pouze na příjmu a výdeji tohoto prvku organismem (van Doorn et al. 2014). Významnou úlohu zde hraje také poměr ukládání a uvolňování fosforu z kostní tkáně. Koncentrace fosfátu v plazmě je udržována v úzkém rozmezí prostřednictvím intestinální absorpce a renální reabsorpce (bude popsáno dále) (Muscher-Banse et al. 2017).

Účast fosforu v metabolismu bílkovin, cukrů a tuků je nezastupitelná. Aktivně zasahuje do činnosti svalové a nervové tkáně i do enzymatických pochodů. Na rozdíl od vápníku je fosfor rovněž důležitý pro zachování a rozvoj střevní mikroflóry v tlustém střevě.

Vápník a fosfor se vstřebávají převážně v tenkém a částečně i v tlustém střevě. Při nadbytku fosforu se značně zvyšuje množství vylučovaného vápníku a sníží se jeho ukládání v kostech. Také dochází k omezení využití hořčíku, manganu, železa a zinku (Jelínek & Koudela 2003; Vervuert et al. 2006).

Fosfor je dále součástí mnoha koenzymů, například koenzymů A, koenzymu transaminace, koenzymu oxidoredukčních procesů, procesů karboxylace, dekarboxylace a dalších (Jelínek & Koudela 2003).

Fosfáty se běžně vyskytují v organismu jako acidobazické pufry v krvi a ve střevech, tudíž hrají značnou roli v humorálních regulacích a pufračním systému organismu (Kohnke et al. 1999).

Fosfor má rovněž vliv na plodnost hřebců a klisen, jelikož se účastní procesu syntézy pohlavních hormonů. Nedostatek tohoto prvku může vést k problémům s ovulací nebo delšímu období mezi říjemi u klisen, dokonce až k jejich nepřítomnosti (Kohnke et al. 1999).

3.3.1 Absorpce ve střevech

Primárním místem absorpce fosforu u koně je úsek tlustého střeva – dorzální kolon. Ovšem část fosforu může být vstřebána už v tenkém střevě (Muscher-Banse et al. 2017; Saastamoinen et al. 2020). U jiných monogastrických zvířat a přežvýkavců je hlavním místem absorpce fosforu právě tenké střevo (Muscher et al. 2008). Tato část zažívacího traktu je zároveň hlavním místem absorpce vápníku u koně. V přední části tenkého střeva se vstřebává více než 75 % z dostupného vápníku (Toribio 2011).

Průměrná absorpce fosforu u dospělých koní je dle NRC 35 %, s výjimkou laktujících klisen (NRC 2007). Rostoucím koním a laktujícím klisnám jsou krmné dávky často doplněny o anorganický fosfor, a proto u těchto skupin koní byla stanovena absorpční účinnost fosforu 45 % (NRC 2007).

Problematikou absorpce a sekrece fosforu u koní se jako první zabývali Schryver et al. (1972). Mechanismus, kterým je fosfor transportován přes střevní výstelku koně, ovšem nebyl až donedávna podrobně popsán.

Cehak et al. (2012) se domnívali, že anorganický fosfát musí být jakožto záporně nabitý anion přenesen do buňky aktivním transportním procesem. Dále ve své studii vysvětlují, že transport fosforu u koně závisí na mechanismu spojeném s Na^+. Dokazují to prostřednictvím

experimentu, ve kterém zvýšili množství soli v krmné dávce koní z 1 na 5 %, což způsobilo retenci fosforu (zvýšila se ze 3 na 7 mg/kg tělesné hmotnosti). Zároveň došlo i k navýšení skutečné absorpce fosforu z 28 na 40 % (Cehak et al. 2012).

Muscher-Banse et al. (2017) ve své práci potvrzují výše zmíněný odhad, že fosfor může být v těle koně absorbován enterocyty transcelulárním aktivním transportem pomocí Na^+. Zároveň ale uvádí, že velká část absorpce fosfátů v tenkém střevě koní (zejména *duodenum, jejunum*) probíhá paracelulární pasivní difúzí (viz Obr. 1).

U jiných monogastrických zvířat a přežvýkavců je naopak popsán především transcelulární transport fosfátů (Mushcer-Banse et al. 2017).

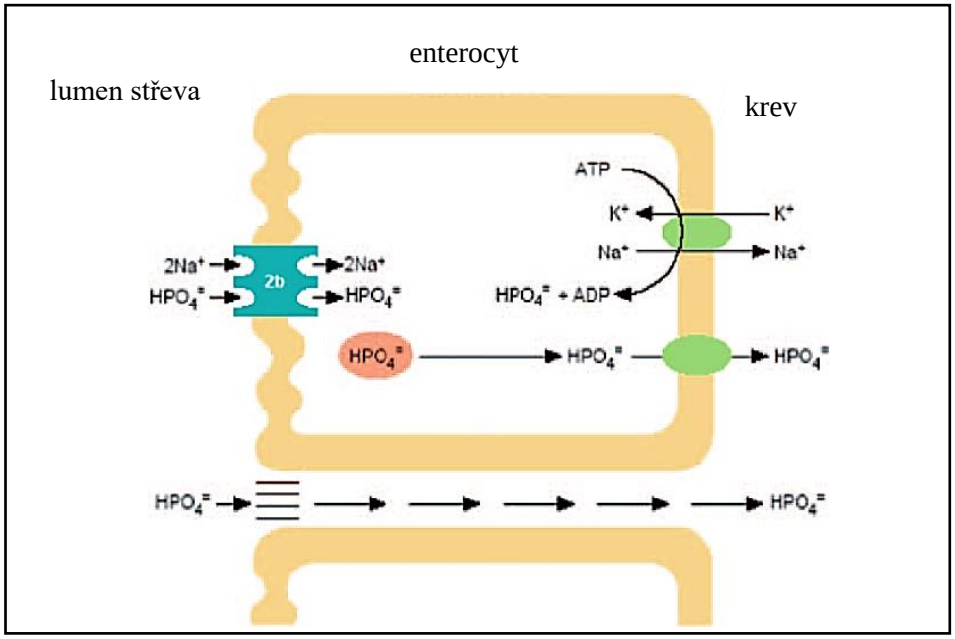
Při paracelulární pasivní difúzi přechází fosfáty těsnými buněčnými spoji (tzv. tight junction). Rychlost absorpce závisí na koncentraci fosfátu v lumen střeva a je s ní lineárně spojena. Ve své studii Muscher-Banse et al. (2017) rovněž uvádí, že diety, které obsahují více rozpustného fosforu, napomáhají absorpci fosforu v tenkém střevě. Naopak v tlustém střevě je fosfor aktivně transportován, což znamená, že se jedná o proces, který lze regulovat.

Aktivní transcelulární transport probíhá prostřednictvím sodno-fosfátového kotransportéru NPT2b, případně transportérů typu III PiT1 a PiT2 (Virkki et al. 2007). Kotransportér NPT2b patří do skupiny nosičů rozpuštěných látek SLC34 (z angl. solute carrier), které se nacházejí v kartáčovém lemu enterocytů, a zároveň přispívá ke většině aktivního transportu. Transportéry PiT1 a PiT2 spadají do skupiny SLC20, ale jejich význam při přenosu fosfátů je minimální (Manghat et al. 2014).

Fosfor je také vylučován do GI traktu koní, což hraje velkou roli při udržování homeostázy tohoto prvku. Hladina vyloučeného fosforu v moči u koní je relativně nízká, pokud je fosfor podáván v množství, ve kterém je doporučován. Močí může být tento prvek vylučován pouze ve chvíli, kdy jeho příjem překročí 100 mg/kg tělesné hmotnosti, což je přibližně 3,5násobek aktuálního požadavku na záchovu u dospělého koně. Reabsorpce fosforu v GI traktu je pravděpodobně hlavním způsobem, jak jsou koně schopni udržovat homeostázu (Muscher-Banse et al. 2017).

Pokud krmná dávka obsahuje nadbytek fosforu v jakékoli formě, dojde k navázání fosforu na vápník a tím je znemožněna absorpce vápníku. Dalším inhibičním faktorem pro vstřebávání vápníku mohou být rovněž oxaláty (Toribio 2011).

Naproti má tomu přebytek vápníku v dietě koně jen nepatrný vliv na absorpci fosforu, protože většina dostupného vápníku je absorbována v tenkém střevě a následně vylučována močí. Z tohoto důvodu vápník nemůže být využit ke snížení absorpce fosforu v tlustém střevě (Matsui et al. 1999; Meyer & Coenen 2003; Toribio 2011).



Obrázek 1: Transcelulární a paraceluární přenos fosfátů z lumen střeva (převzato: Manghat et al. 2014).

3.3.2 Reabsorpce v ledvinách

V krvi je fosfor zastoupen ve formě organických i anorganických fosfátů. Organický fosfát představuje 70 % fosforu z tělního oběhu a jedná se především o fosfátové estery (fosfolipidy) vázané na proteiny a krevní buňky. Klasické metody, které se využívají k analýze fosforu, ovšem detekují pouze jeho anorganickou formu – Pi (Toribio 2011).

Přibližně polovina Pi se nachází jako ionizovaný fosfát. Dalších zhruba 35 % Pi tvoří komplexy s kationty Mg^{2+}, Ca^{2+} a Na^{+}. Zbytek (přibližně 15 %) Pi je vázáno na proteiny, přičemž hlavní bílkovinou vázající vápník je albumin. Zároveň jeho afinita k Ca^{2+} je závislá na pH. V tělních tekutinách se nacházejí čtyři různé formy Pi: kyselina fosforečná (H_3PO_4), dihydrogenfosforečnanový anion ($H_2PO_4^-$), monohydrogenfosforečnanový anoin (HPO_4^{2-}), fosfitový anion (PO_3^{2-}) (Toribio 2011).

Koncentrace Pi v séru jsou regulovány intestinální absorpcí a renální reabsorpcí, přičemž ledviny působí jako hlavní regulátor koncentrací Pi pro udržení homeostázy (Biber et al. 2009).

Přesun Pi mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím může nastat ve velmi krátkém časovém úseku. Hladina Pi v séru kolísá v závislosti na dietě koně, věku, fyziologickém stavu, aktivitě, nemoci, glykémii, hormonech a kvalitě získaného vzorku (Toribio 2011).

U dospělých koní se hodnota Pi v séru pohybuje v rozmezí od 1 do 3 mmol/l a u hříbat a mladých rostoucích koní se hladina může zvyšovat až na 2 mmol/l (Toribio 2011).

Vysoké koncentrace Pi v séru u mladých koní lze vysvětlit zvýšenou intestinální absorpcí a renální reabsorpcí Pi pro zásobení rostoucí kostry i dalších tkání. Podobně se u mladých koní zvyšuje i aktivita alkalické fosfatázy, pravděpodobně ze střeva a kostí.

Tyto procesy jsou částečně regulovány růstovým hormonem IGF-1 (angl. insulin-like growth factor) (Toribio 2015).

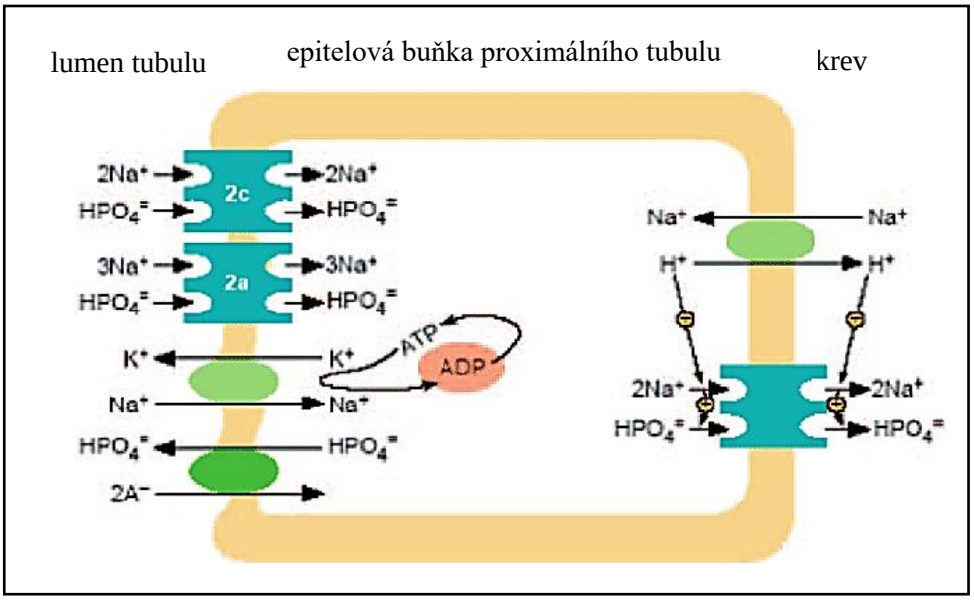
Reabsorpce Pi ledvinami neprobíhá konstantně, ale naopak závisí na aktuálních hladinách hormonů či fosfatoninů (bude popsáno dále). Reabsorpce Pi je uskutečněna pomocí sodno-fosfátových kotransportérů, které se nachází na apikální membráně proximálních tubulů (Biber et al. 2009).

Většina renální reabsorpce Pi (60-80 %) se uskutečňuje ve stočeném úseku (*pars convulata*) proximálního tubulu. Dalších 15-20 % je reabsobováno v jeho přímé části (*pars recta*) a jen malé procento v distálním tubulu nefronu. Frakční vylučování Pi močí je tedy u koní poměrně nízké (<0,5 %) (Toribio, 2011).

Převážná část renální reabsorpce Pi je transcelulární (viz Obr. 2). V proximálních tubulech je transport Pi jednosměrný a probíhá ve třech krocích:

1. absorpce na apikálním povrchu buňky (tzv. kartáčový lem),
2. transcelulární přenos,
3. exkrece Pi do krve přes bazolaterální membránu (Bergwitz & Jüppner 2010).

Příjem je zprostředkován sodno-fosfátovými kotransportéry, jejichž aktivita závisí na gradientu vytvořeném bazolaterální Na^+/K^+-ATPázou. Reabsorpce Pi je tedy nepřímo energeticky závislým procesem (Biber et al. 2009; Bergwitz & Jüppner 2010)



Obrázek 2: Reabsorpce fosfátů v proximálních tubulech ledvin (převzato: Manghat et al. 2014)

3.3.3 Exkrece fosforu

Hlavní cestou vylučování fosforu u koně je trus. Množství fosforu ve výkalech je přímo úměrné obsahu fosforu v dietě. Pokud je v krmné dávce suplemetováno příliš mnoho fosforu, je jeho přebytek rovněž vyloučen (Saastamoinen et al. 2020).

Fosfor v trusu koní může pochátet ze tří různých zdrojů. Jedná se o fosfor, který je:

a) nedostupný a kůň jej není schopen absorbovat,

b) dostupný a kůň je schopen ho absorbovat, ale překračuje nutriční požadavky,

c) součástí endogenních ztrát organismu (Ögren et al. 2013).

Podíl vylučovaného fosforu ve výkalech představuje 95-98 % z celkové exkrece fosforu. Zbývající část lze najít v potu (asi 1 %) nebo v moči (asi 1 %) (Ögren et al. 2013). Z tohoto důvodu je zpravidla ve studiích, které se zabývají stravitelností fosforu u koní, moč přehlížena (Saastamoinen et al. 2020).

3.4 Kalcifosfátový metabolismus

Příjem vápníku a fosforu v krmné dávce by měl být vždy posuzován společně, protože jejich metabolismus je velmi provázaný. Nejdůležitější je vzájemný poměr těchto prvků, který se pohybuje okolo 1,7:1 vápník ku fosforu. Výrazný přebytek fosforu totiž může narušit vstřebávání vápníku až o 50 % (Wilson et al. 2006; Frape 2010).

3.4.1 Poměr vápníku a fosforu

Krmná dávka koně by měla obsahovat vápník a fosfor v poměru 2:1 až 1:1 (NRC 2007). Optimální poměr pro rostoucí koně je cca 2,5:1 (Lawrence 2000). Studie doposud prokázaly, že poměr Ca:P vyšší než 6:1, který se v krmné dávce vyskytuje po delší dobu, má za následek sníženou hustotu kostí. Obrácený poměr, tj. vyšší obsah fosforu než vápníku, má taktéž škodlivý vliv (Toribio 2011).

Případ, kdy v krmné dávce převažuje obsah vápníku, se může vyskytnout především při zkrmování vysokého množství vojtěškového sena (poměr Ca:P – 6:1), nebo jetelového sena (Ca:P – 6,6:1). Fosfor naopak může v krmné dávce převažovat nad vápníkem v případě zkrmování vysokého množství pšeničných otrub (poměr Ca:P - 1:3,2) (Lawrence 2000; Meyer & Coenen 2003).

3.4.2 Endokrinní řízení homeostázy

Orgány podílející se na absorpci Pi (střevo), jeho vylučování (ledviny, střevo) a skladování (kosti) jsou řízeny endokrinním systémem. Zároveň jsou ovlivňovány koncentracemi extraceluláho Pi (Toribio 2015).

Mezi hlavní hormony řídící homeostázu fosforu, patří především parathyroidní hormon (PTH), kalcitonin (CT), insulin a 1,25-dihydroxycholekalciferol (1,25-$(OH)_2D_3$), tj. aktivní forma vitaminu D, jinak také kalcitriol (viz Tabulka 1) (Toribio 2015).

Hormon příštítných tělísek (PTH) se uvolňuje ve chvíli, kdy je hladina vápníku v séru nízká. PTH zároveň stimuluje uvolňování vápníku a fosforu z kostního minerálu ve snaze udržet homeostázu vápníku. Rovněž zvyšuje jeho reabsorpci v ledvinách a inhibuje reabsorpci fosforu, což vede ke zvýšení vylučovaného fosforu močí (Mendoza et al. 2017).

Kromě toho má parathyroidní hormon vliv na zvýšení produkce kalcitriolu v ledvinách. Tato aktivní forma vitaminu D může rovněž ovlivnit homeostázu fosforu. Množství kalcitriolu ovlivňuje aktivní absorpci ve střevě působením na sodno-fosfátové kotransportéry. Dále bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací kalcitriolu v organismu zároveň stoupá plazmatická koncentrace fosforu, jeho stravitelnost i vylučování ledvinami (Breidenbach et al. 1998). Nicméně u koní doposud nebyl prokázán účinek kalcitriolu na metabolismus vápníku, jako je tomu u jiných druhů (Toribio 2015).

Dalším hormonem působícím na homeostázu fosforu v organismu je inzulin, který napomáhá přesunu Pi z extracelulárního do intracelulárního prostředí. Podporuje využití Pi prostřednictvím metabolismu sacharidů a energeticky závislého transportu elektrolytů. Na rozdíl od PTH, inzulin stimuluje aktivitu sodno-fosfátových kotransportérů v renálních proximálních tubulech (Amanzadeh & Reilly 2006).

V kalcifosfátovém metabolismu se dále uplatňuje kalcitonin. Tento hormon se uvolňuje v reakci na hyperkalcémii za účelem snížení koncentrace vápníku v séru (Rourke et al. 2009). Hlavní funkcí kalcitoninu je chránit kostru před nadměrným úbytkem kostní tkáně inhibicí osteoklastické aktivity (Woodrow et al. 2006). Kalcitonin také inhibuje renální reabsorpci Pi. U jiných druhů bylo dále prokázáno, že kalcitonin působí inhibičně na intestinální absorpci Pi (Toribio 2015).

Kromě výše zmínených působí na homeostázu fosforu také následující hormony. IGF-1 stimuluje aktivitu sodno-fosfátových kotransportérů pro transport Pi v proximálních tubulech (Amanzadeh & Reilly 2006). Renální absorpci Pi zvyšují také hormony štítné žlázy. Naopak glukokortikoidy reabsorpci inhibují, čímž podporují vylučování Pi. Stejným způsobem účinkují v organismu i katecholaminy, např. dopamin (Toribio 2015).

Kalcifosfátový metabolismus může být regulován rovněž prostřednictvím fosfatoninů. Jde o skupinu faktorů, které indukují hypofosfatémii (bude popsáno dále), inhibují renální syntézu vitaminu D, zvyšují vylučování Pi močí a snižují absorpci Pi ve střevě. Mezi tyto faktory patří i fibroblastový růstový faktor-23, který je produkován osteoklasty a osteoblasty a je uvolňován v reakci na vysoké hladiny fosforu v krvi (Jüppner, 2011). U jiných druhů bylo prokázáno, že FGF23 snižuje hladinu fosforu v krvi díky snížení jeho reabsorpce v ledvinách (Bergwitz a Jüppner, 2010). Není ovšem známo, zda je role FGF23 u koní podobná, zejména proto, že množství vylučováného fosforu močí je minimální.

V souvislosti s FGF23 je třeba zmínit i enzym, kterým je aktivován. Jedná se o klotho, což je transmembránový jednoprůchodově uložený protein (působící jako koreceptor), který se tvoří v ledvinách. Klotho/FGF23 tlumí tvorbu kalcitriolu a zvyšuje tak vylučování fosforu ledvinami (Mendoza et al. 2017). Mimo funkce spojené s kalcifosfátovým metabolismem klotho poskytuje určitou kontrolu nad přecitlivostí organismu na inzulín a s velkou pravděpodobností se podílí i na stárnutí (Kamr et al. 2018).

Tabulka 1: Vybrané faktory ovlivňující reabsorpci Pi v ledvinách (převzato: Toribio et al. 2015).

Faktory zvyšující reabsorpci Pi v ledvinách	Faktory snižující reabsorpci Pi v ledvinách
- diety s nízkým obsahem P - diety s vysokým obsahem Ca nebo K - metabolická alkalóza - insulin - IGF-1 - hormony štítné žlázy - kalcitriol (aktivní forma vit. D)	- diety s vysokým obsahem P - metabolická acidóza - PTH - kalcitonin - glukokortikoidy - fosfatoniny (např. FGF23)

3.4.3 Poruchy kalcifosfátového metabolismu

3.4.3.1 Hypofosfatémie (snížená hladina fosforu v krvi)

K rozvoji hypofosfatémie u koní může docházet třemi různými způsoby:
1. snížením absorpce Pi ve střevě;
2. zvýšením exkrece Pi močí;
3. redistribucí Pi z extracelulárního do intracelulárního prostředí (Toribio 2015).

Podle Toribio (2015) se hypofosfatémie vyskytuje častěji u miniaturních koní (NRC 2007), poníků a oslů. Snížená absorpce Pi ve střevech může být způsobena např. gastrointestinálními chorobami (průjem, zánětlivé onemocnění střev, enteritida), hypovitaminózou D nebo při zkrmování diet s nedostatkem Pi.

K hypofosfatemii u koní může vést také deficit vitaminu D, a to z různých důvodů. Vitamin D podporuje intestinální absorpci i renální reabsorpci vápníku a Pi. Pokles 1,25-dihydroxycholekalciferolu (1,25-$(OH)_2D_3$) má za následek hypokalcemii, která dále zvyšuje sekreci PTH a zároveň zvyšuje vylučování Pi močí. V důsledku nadměrné produkce parathormonu může vzniknout primární hyperparathyreóza, která ovšem u koní není běžná, na rozdíl od sekundární hyperparathyreózy (bude popsáno dále).

Nízké koncentrace vitaminu D rovněž zhoršují sekreci PTH, protože $1,25(OH)_2D_3$ je negativním regulátorem sekrece PTH. Parathormon také zvyšuje aktivitu osteoklastů a demineralizaci kostí (Toribio 2015).

Dalšími možnými příčinami vzniku hypofosfatémie může být zvýšená hladina glukózy v krvi, podávání inzulínu, hladovění, krmení diety s vysokým obsahem sacharidů nebo parenterální výživa. Všechny tyto faktory mohou snižovat sérové Pi v důsledku jeho intracelulární redistribuce (Toribio 2015).

Vznik hypofosfatémie může být rovněž způsoben redistribucí Pi z důvodu zvýšené koncentrace inzulinu nebo katecholaminů v krvi. Katecholaminy, podobně jako inzulín, stimulují aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy a potřeby Pi. Během respirační alkalózy, kdy stoupá pH,

je stimulována aktivita fosfofruktokinázy (součást glykolýzy) a potřeba Pi tudíž zvyšuje syntézu ATP. Ve výsledku se Pi z extracelulárního prostředí přesouvá do buněk, což vede k hypofosfatémii (Shor et al. 2006).

Snížená hladina fosforu v krvi může být buď akutní nebo chronická. Hypofosfatémii lze klasifikovat podle koncentrací Pi v séru jako závažnou (<0,32 mmol/l), střední (0,32-0,64 mmol/l) nebo mírnou (0,67 - 0,8 mmol/l) (Toribio 2015).

Koně s mírnou nebo středně těžkou hypofosfatémií vykazují klinické příznaky jen zřídka. Známky akutní hypofosfatémie se týkají regulačních funkcí Pi pro iontový transport, energetický metabolismus a stabilitu buněčné membrány. Patří mezi ně neuromuskulární podrážděnost, svalová slabost, arytmie, snížená gastrointestinální motilita a křehkost a lýza buněčné membrány (hemolýza, rhabdomyolýza), zhoršený metabolismus glukózy a snížená syntéza ATP (Amanzadeh & Reilly 2006).

Chronická hypofosfatémie se u koní příliš nevyskytuje. Typickými příznaky jsou ztráta hmotnosti, slabost, nechutenství, ztráta kostních minerálů, kulhání, vývojová ortopedická onemocnění, křivice nebo hemolýza (Toribio 2011).

3.4.3.2 Hyperfosfatémie (zvýšená hladina fosforu v krvi)

Hyperfosfatémie je stav, v němž je organismus zvířete zatížen fosforem (zvýšená absorpce v GI nebo uvolňování fosforu z kostí). Současně nedochází ke kompenzaci formou zvýšené exkrece nebo využití fosforu tkáněmi. Nejčastější příčinou hyperfosfatémie je snížení vylučování, které bývá spojeno s poklesem rychlosti glomerulární filtrace (Toribio 2015).

Nadbytek fosforu, který vznikne při zvýšení střevní absorpce, může nastat v případě vysokého příjmu krmiv bohaté na fosfáty. Dalším důvodem může být hypervitaminóza D, během níž se také zvyšuje střevní absorpce fosforu, což dále vede k hyperkalcémii a hyperfosfatémii (Kamr et al. 2018).

Další možností je uvolňování fosforu z kostí, které může nastat při osteolytických lézích. K uvolňování fosforu z buněk dochází také při rozsáhlých poraněních, nebo nádorech či akutních myopatiích.

Ketoacidóza a laktátová acidóza mohou způsobit hyperfosfatémii redistribucí Pi do extracelulárního prostředí. Metabolická acidóza a vysoké hladiny ATP inhibují fosfofruktokinázu, klíčový enzym v glykolýze (Toribio 2015).

Mladá a rostoucí zvířata mají obecně vyšší koncentrace sérového fosforu (viz kapitola Reabsorpce v ledvinách) a k mírnému přechodnému zvýšení může také dojít postprandiálně (po krmení).

Příznaky akutní hyperfosfatémie jsou zároveň příznaky akutní hypokalcemie, mezi něž patří tetanie, hyperexcitabilita (zvýšená dráždivost), svalová fascikulace, kolika a arytmie. Chronická hyperfosfatémie vede ke stejným projevům, které lze pozorovat při nedostatku vápníku. Jedná se hlavně o kulhání, abnormální vývoj chrupavek a kostí, zlomeniny nebo nutriční sekundární hyperparathyreóza (bude popsáno dále) (Toribio, 2010). Výjimečně může docházet i k mineralizaci měkkých tkání, tj. kalcinóza (Toribio 2015).

3.4.3.2.1 NSH – nutriční sekundární hyperparathyreóza

Nutriční sekundární hyperparathyreóza (angl. bighead disease) patří mezi nejčastěji se vyskytující metabolická onemocnění skeletu koně. Tato choroba může vzniknout při nedostatku vápníku, případně v kombinaci s přebytkem fosforu. V důsledku nedostatku vápníku nastává vlivem působení parathormonu (vylučovaném příštítnou žlázou) k metabolickému odvápňování kostní tkáně (tj. endogenní zásobení organismu vápníkem) (Mendoza et al. 2017).

S pokračujícím deficitem vápníku přecházejí odvápňovací procesy také na funkční kostní tkáň, ze které nakonec vzniká náhradní fibrózní tkáň (*osteodystrophia fibrosa generalisata*). Částečně demineralizovaná kostra lebky (horní čelist) se následkem tlaku zubů vyboulí, takže hlava zvířete vypadá větší (viz Obr. 3) (Stewart et al. 2010).

Na kostech končetin jsou za těchto podmínek postiženy především zóny bezprostředně pod okosticí, které jsou demineralizovány a částečně nahrazovány pojivovou tkání (Meyer & Coenen 2003).

Na místech úponů šlach a vazů namáhaných tahem vzniká bolestivý proces, který se navenek projevuje kulháním, ztuhlostí a nejistou chůzí. Pokud nevyvážený přísun minerálních látek trvá déle, objevuje se oslabení a zánět kostí, při vážnějších potížích také natržení šlach (Stewart et al. 2010).

Demineralizace skeletu rovněž zvyšuje riziko spontánních patologických fraktur postihující převážně dlouhé kosti, lopatku, pánev nebo páteř. V některých případech může dojít až k nástupu neurologických příznaků (Mendoza et al. 2017; Lacitignola et al. 2018).

U rostoucích hříbat se nedostatek vápníku (spolu nebo bez přebytku fosforu) projevuje zvlášť nepříznivě. Kromě slábnutí, křivení a zánětů kostí končetin se objevují i změny tvaru hlavy (viz výše) (Meyer & Coenen 2003).

Obrázek 3: Otok maxily jako následek sekundární nutriční hyperparathyreózy (převzato: Stewart et al. 2010).

3.5 Nutriční požadavky koně

Pro správnou funkci organismu je třeba zajistit přísun vyváženého množství jak hlavních živin (tj. bílkoviny, sacharidy, tuky) tak mikronutrientů, k nimž se řadí i minerální látky (Davies 2009). K vypočtení potřeby určité živiny je nezbytná znalost její stravitelnosti v organismu zvířete, dále její množství potřebné k nahrazení endogenních ztrát (viz kapitola Stravitelnost fosforu) a množství potřebné k produkci (Mok & Urschel 2020).

Množství živin potřebné k nahrazení endogenních ztrát se obvykle rovná množství potřebnému k záchově. Mezi produkty, které navyšují potřebu fosforu zvířete, patří mléko během laktace, tkáň plodu během březosti nebo denní přírůstek u mladých koní (Meyer & Coenen 2003).

Potřebu minerálních látek v krmné dávce lze zjistit, pokud množství živin potřebných pro záchovu vydělíme skutečnou stravitelností minerálu ve stravě (Fowler 2018). Podle NRC (2007) má stravitelnost větší vliv na vypočtený požadavek než jakákoliv jiná proměnná v rovnici, což zdůrazňuje důležitost získání přesné hodnoty skutečné stravitelnosti.

Správné využití minerálních prvků u koně v prvé řadě závisí na vzájemném poměru fosforu a vápníku. Vhodný poměr těchto prvků je důležitý pro optimální využití každého z nich. Pro rostoucí koně je ideální poměr vápníku a fosforu 2,5: 1 (Toribio 2011).

Potřeba fosforu obecně narůstá hlavně při nadměrném přísunu bílkovin, kdy dochází k vylučování prvku ledvinami prostřednictvím moči (Meyer & Coenen 2003).

Nutriční požadavek fosforu dále závisí na věku, fyziologickém stavu a fyzické aktivitě koně. Potřeby fosforu jsou obecně nejvyšší u březích a laktujících klisen. V poslední třetině březosti znatelně stoupá potřeba obou prvků, kvůli mineralizaci kostry hříběte v děloze.

U laktujících klisen se potřeba navyšuje z důvodu výdeje minerálů do mléka. Obsah vápníku a fosforu v mléce klisny je nejvyšší během 1. měsíce laktace, načež postupně rovnoměrně klesá. Zvýšená potřeba fosforu je dále patrná u mladých rostoucích koní (viz Tabulka 2), u starších jedinců (nad 19 let) a u sportovních koní (Meyer & Coenen 2003; NRC 2007).

Vyvážená krmná dávka koně by měla obsahovat 0,15 % až 1,5 % vápníku a 0,15 % až 0,6 % fosforu v sušině. Dospělí koně by měli dostávat kolem 20 g Ca/den, březí klisny 50 až 60 g Ca/den. (NRC 2007; Toribio 2011).

Tabulka 2: Nutriční potřeba vápníku a fosforu pro různé věkové kategorie koní (převzato: NRC 2007)

Věk a váha koně	**Ca (g)**	**P (g)**
6 měsíců (215 kg)	39	22
12 měsíců (317 kg)	38	21
24 měsíců (426 kg)	37	20
Dospělý kůň (500 kg)	20	14

3.6 Zdroje fosforu v krmivech

Příjem dostatečného množství fosforu je při běžném krmení zpravidla zajištěn. Koně, na rozdíl od jiných druhů zvířat, tráví i fytátová fosfor, který je hojně obsažen zejména v krmných dávkách tvořených pouze z obilovin a produktů z obilí – otrub (Meyer & Coenen 2003).

Patrné zastoupení fosforu lze dále najít i v pastevním porostu, kde se jeho obsah rovná přibližně množství v obilovinách (tj. asi 3 g/kg v sušině). Avšak množství fosforu v rostlinách je významně ovlivněno věkem plodiny v době sklizně (Zhao & Müller 2016). Značné množství fosforu tedy můžeme najít na pastvinách, kde převažují odkvetlé přetrvávající porosty. (Fowler et al. 2015).

V krmivech pro koně je fosfor zastoupen ve dvou formách – organické a anorganické. Organický fosfor nebo fytát tvoří v průměru dvě třetiny celkového fosforu v jadrných krmivech (Warren et al. 2013). Rovněž může být přítomen v menším množství v některých dalších krmivech, jako je vojtěška (Heuzé et al. 2016).

Anorganický fosfor se v přirozeném stavu může vyskytovat například v objemných krmivech, jako je seno nebo čerstvá píce. V menší míře může být také zastoupen v jadrném krmivu (Toribio 2011).

Do diet koní se rovněž přidává anorganický fosfor ve formě krmného doplňku. Nejčastěji používanou suplemetací fosforu a vápníku je monokalcium fosfát (dihydrogenfosforečnan vápenatý). Obsahuje 21 % P a 16 % Ca, s deklarací vysoké využitelnosti fosforu kolem 90 %. Druhou nejpoužívanější surovinou je dikalcium fosfát (hydrogenfosforečnan vápenatý), který obsahuje 15 % P a 26 % Ca. Využitelnost fosforu je u této suroviny nižší. Pohybuje se v rozmezí 70 až 80 %. Jako zdroj fosforu slouží i další fosforečnany – fosforečnan hořečnatý, fosforečnan hořečnato-sodný, fosforečnan vápenato-sodný aj. (Toribio 2015; Dorozhkin 2016).

3.6.1 Fytát

V jadrných krmivech se fosfor vyskytuje přibližně z jedné třetiny ve formě anorganické, která je snadno stravitelná. Zbývající dvě třetiny fosforu jdou obsaženy ve formě organické (fytátové), která je pro nepřežvýkavá zvířata hůře stravitelná. Aby zvíře mohlo fytát využívat, musí být hydrolyzován enzymem fytázou na anorganickou formu.

Kyselina fytová je považována za antinutriční faktor, který snižuje využitelnost fosforu a minerálních látek v krmivech monogastrických živočichů (Hainze et al. 2004).

Nedávné studie však naznačují, že fytát je pro koně dostupnější, než se dříve myslelo (Hainze et al. 2004). Van Doorn et al. (2004) uvádějí, že koně krmení dietou s monokalciumfosfátem jakožto hlavním zdrojem P vykazovali stejnou stravitelnost fosforu jako koně krmení stravou obsahující 71 % fosforu ve fytátové formě. Rovněž bylo prokázáno, že krmné dávky složené pouze z píce měly stejný koeficient celkové stravitelnosti fosforu jako diety obsahující kukuřici a oves nebo kukuřici a pšenici nebo samotný oves (Hainze et al. 2004).

Oliviera et al. (2008) ve své práci uvádějí, že rostoucí koně, kteří byli krmeni pěti různými dietami, měli biologickou dostupnost fosforu v rozmezí od 41 % do 58 %. Stravitelnost byla

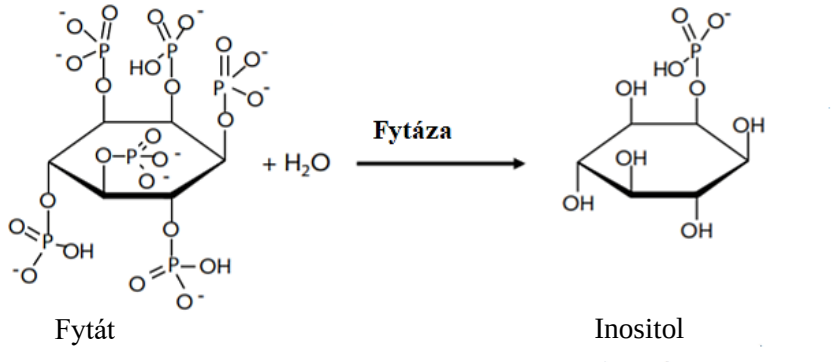
u většiny diet vyšší, než se očekávalo, což naznačuje, že P byl relativně dostupný i přesto, že byl ve fytátové formě.

Tyto studie však přímo nestanovují stravitelnost fytátu, nýbrž pouze odhadují jeho dostupnost ve vztahu k dietám, u nichž byl doplněn anorganický fosfor. Aby bylo možné zjistit, zda je kůň schopen hydrolyzovat fytát, je třeba provést přímá měření degradace fytátu (Benešová et al. 2013).

Problematikou degradace fytátu u koní se zabývali např. Matsui et al. (1999). Ve své studii uvedli, že rozklad fytátu probíhá v tenkém i tlustém střevě koně. Za místo, kde docházelo k nejvyšší degradaci kyseliny fytové, bylo označeno tlusté střevo, což autoři vysvětlili fytázovou aktivitou mikrobiomu. Tím dokázali, že koně mají schopnost degradovat fytát, ale stále nebylo objasněno, kolik z uvolněného fosforu je absorbováno. Touto oblastí se dále zabývala novější studie (Lavin et al. 2013), kde bylo zjištěno, že úplná degradace fytátu z trávicího traktu dosáhla 96 % (krmná dávka byla složena z vojtěškového sena a granulovaného koncentrovaného krmiva), i když zjevná celková stravitelnost P byla 24 % (Lavin et al. 2013).

3.6.1.1 Hydrolýza fytátu u monogastrů

Pro zlepšení nutriční hodnoty krmiv je důležitá defosforylace fytátu, při které dochází k odstranění fosfátových skupin. To znamená, že klesá síla inositolu vázat ionty (Kumar et al. 2010). Defosforylace fytátu probíhá pomocí enzymů fytáz, viz Obr. 4 (Troesch et al. 2013).



Obrázek 4: Rozklad fytátu pomocí enzymu fytázy (převzato: Troesch et al. 2013).

Zvířata sama produkují jen omezené množství fytázy, tudíž je pro ně fytát z velké části nedostupný. Existují čtyři zdroje fytázy, které má zvíře k dispozici pro rozložení fytátu. Jedná se o endogenní slizniční enzymy tenkého střeva, vnitřní rostlinné fytázy, enzymy mikrobiomu a exogenní fytázy (Selle & Ravindran 2008).

Určité mikroby přítomné ve střevech zvířat produkují fytázové enzymy, které uvolňují anorganický fosfor pro absorpci hostitelem. Tím se vysvětluje, proč je fytát v největší míře dostupný pro skot a přežvýkavá zvířata. Polygastři disponují velkým bachorem plným mikrobů, které jsou schopny produkovat fytázu (Morse et al. 1992).

Některá monogastrická zvířata (zejména prasata a drůbež) jsou krmena i exogenními fytázami, aby se zlepšila dostupnost fosforu při krmení dietami s vysokým obsahem fytátu. Fytázy se nejčastěji získávají z bakterií, jako je *Escherichia-coli* nebo z hub, jako je *Aspergillus niger* (Selle & Ravindran 2008). Exogenní fytázy jsou účinnější při štěpení fytátu než vnitřní rostlinné fytázy (Zimmermann et al. 2002). U prasat a nosnic přidání fytázy ke krmné dávce obsahující fytát zlepšuje stravitelnost a absorpci P, ale také hustotu a mineralizaci kostí (Selle & Ravindran 2008).

3.6.1.2 Fytáza u koní

Suplementace fytázy do krmných dávek některých monogastrů zlepšuje dostupnost fosforu. Podle této hypotézy bylo provedeno několik studií, které zkoumaly účinky doplňování fytázy do diet koní. Výsledky ale ukázaly, že suplementace exogenní fytázy nemá žádný vliv na dostupnost fosforu u koní. Například Morris-Stoker et al. (2001) zjistili, že mezi skupinou koní, kterým byla doplňována fytáza a kontrolní skupinou (bez doplňku fytázy), nebyly žádné rozdíly ve vylučování nebo stravitelnosti fosforu.

3.7 Stravitelnost fosforu

Za strávenou se považuje každá součást potravy, která není vyloučena trusem. Toto celkové množství odpovídá přibližně podílu krmiva, které pronikne do organismu střevní stěnou. Za strávenou živinu se ovšem nemusí považovat jen živina absorbovaná v trávicím traktu, nýbrž i živina přeměněná při mikrobiálním trávení v tlustém střevě koně.

3.7.1 Zdánlivá stravitelnost

Množství stravitelné živiny se běžně stanovuje pomocí tzv. zdánlivé stravitelnosti, kdy od jejího obsahu v krmivu odečítáme celý obsah živiny ve výkalech (Pagan 2012).

Zdánlivou stravitelnost krmiva lze vypočítat na základě znalosti množství přijatého krmiva a vyloučených výkalů podle jednoduchého vzorce:

zdánlivě stravitelná živina = živina v krmivu – živina ve výkalech.

Procentuální podíl zdánlivě stravitelné živiny z jejího celkového obsahu v krmivu nazýváme jako koeficient zdánlivé stravitelnosti (de Marco et al. 2012):

$$[\%]\ \text{zdánlivá stravitelnost} = \left(\frac{\text{příjem minerální l. - exkrece minerální l. výkaly}}{\text{příjem minerální látky}}\right) * 100$$

3.7.2 Skutečná stravitelnost

Při zjišťování zdánlivé stravitelnosti je zanedbávána skutečnost, že výkaly obsahují také živiny endogenního původu. Tyto živiny nepocházejí přímo ze zkoumaného krmiva, ale z organismu zvířete. Jedná se např. o enzymy z trávicích šťáv, žluči, hlenu, z odloupaných buněk epitelu trávicího traktu nebo o živiny syntetizované mikrobiomem tlustého střeva (např. některé aminokyseliny nebo mastné kyseliny) z jiných živin degradovaného krmiva (Pagan 2012).

Skutečná stravitelnost tedy při měření počítá s endogenními ztrátami organismu (Martin – Rosset & Martin 2015). Endogenní ztráty živin lze dělit na bazální a specifické. Bazální endogenní ztráty jsou úměrné množství přijaté sušiny zvířetem, zatímco ztráty specifické závisí na vlastnostech krmiva, jako jsou koncentrace a typ vlákniny a obsah antinutričních faktorů (Ravindran 2016).

Odečtením endogenních ztrát od hodnoty zdánlivě stravitelné živiny lze získat hodnotu skutečné stravitelnosti. Procentuální podíl skutečně stravitelné živiny z jejího celkového obsahu (tj. koeficient skutečné stravitelnosti) lze vypočítat následovně:

$$[\%]\ \text{skutečná stravitelnost} = \left(\frac{\text{příjem minerální l.-(exkrece minerální l. výkaly-endogenní ztráty}}{\text{příjem minerální látky}}\right) * 100$$

3.7.2.1 Endogenní ztráty fosforu

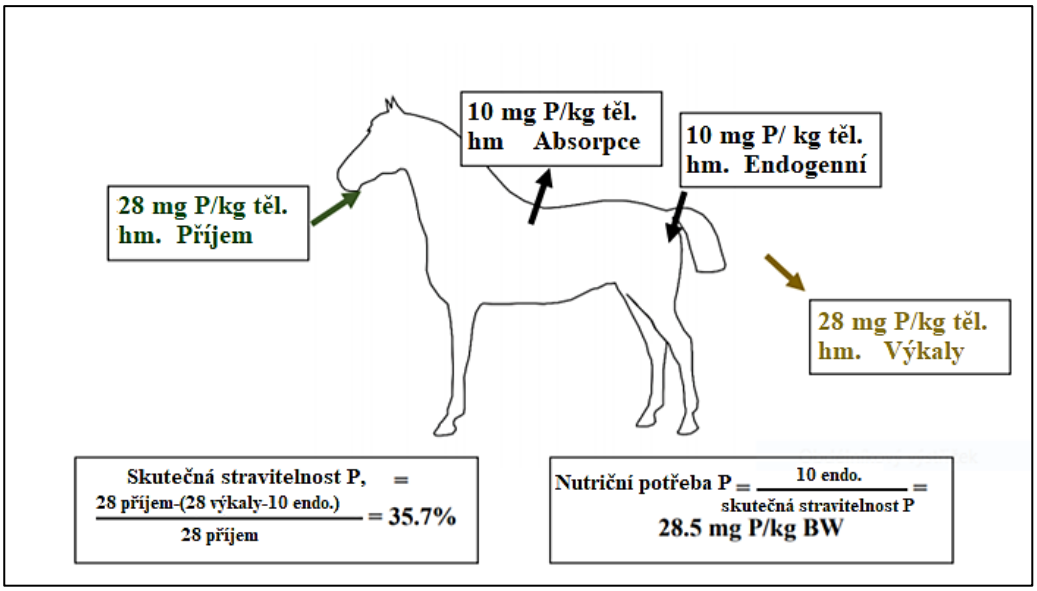
Endogenní ztráty fosforu zahrnují nejen fosfor obsažený v odloučených enterocytech a trávicích šťávách (sliny, žaludeční, pankreatické a žlučové šťávy), ale také fosfor, který je aktivně vylučován do GI traktu transportéry (Ögren et al. 2013; Saastamoinen et al. 2020).

Dle NRC (2007) je hodnota vyloučeného fekálního fosforu u dospělých koní 10 mg/kg tělesné hmotnosti (viz Obr. 5), a sice na základě studie z roku 1971 (Schryver et al. 1971). V tomto výzkumu byl použit 32P (izotop fosforu), který byl injektován do koně (intravenózně nebo intramuskulárně) a následně měřen v trusu koně. Výsledkem studie bylo zjištění, že endogenní ztráty fosforu jsou 9,4 mg/kg tělesné hmotnosti při konstantním příjmu fosforu v rozmezí od 43 do 200 mg P/kg tělesné hmotnosti. Fekální fosfor se však zvyšoval s příjmem fosforu, což může být způsobeno tím, že absorbovaný dietní fosfor je reabsorbován zpět do GI traktu. Protože tento fosfor by nebyl označen, mohl být považován za součást endogenních ztrát. Skutečná stravitelnost dietního fosforu tedy může být vyšší, než byla pozorována v této studii − 40 až 47 %.

Pro mladé rostoucí koně NRC (2007) určila hodnotou vyloučeného fekálního fosforu 18 mg/kg tělesné hmotnosti na základě studie provedené Cymbaluk et al. (1989). V této studii byla endogenní ztráta fosforu vypočítána pomocí známého množství přijatého fosforu a množství vyloučeného vápníku. V tomto experimentu však bylo koním podáváno více vápníku, než jaká je jejich nutriční potřeba (v rozmezí od 41 do 203 %). Vysoké množství vápníku v dietě koně (200 % potřeby) zvyšuje endogenní ztráty fosforu v trusu u ročků (Fowler et al. 2015). Patrně právě vyšší množství vápníku, které bylo koním podáváno ve výše zmíněné studii (Cymbaluk et al. 1989) způsobilo zvýšení vyloučeného fekálního fosforu endogenního původu.

Studie, které se zabývaly endogenními ztrátami fosforu u rostoucích koní ovšem uvádí nižší hodnoty než NRC (2007). Ögren et al. (2013) ve své práci použili regresní rovnici založenou na množství přijatého a vyloučeného fosforu. Zjistili, že fekální endogenní ztráty jsou kolem 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Oliveira et al. (2008) stanovili pomocí radioizotopů fekální endogenní ztráty kolem 8,42 mg P/kg tělesné hmotnosti. Furtado et al. (2000) odhadují endogenní fekální ztráty na 10,3 mg P / kg živé hmotnosti u rostoucích koní.

Závěrem této kapitoly lze tedy shrnout, že podáváním nadměrných dávek fosforu v dietách koní se zvyšuje variabilní podíl endogenního fosforu, a tím se zvyšuje i množství fosforu vylučovaného trusem. V důsledku toho, že se nepočítá s mikrobiálním nebo reabsorbovaným fosforem, jsou odhady jeho dostupnosti z krmiva podhodnocovány kvůli navýšení vylučovaného fosforu v trusu (Ögren et al. 2013).



Obrázek 5: Uznávaný model pro odhad skutečné stravitelnosti fosforu a jeho nutriční potřeby na základě pevně dané hodnoty ztrát endogenního fosforu, tj. 10 mg/kg tělesné hmotnosti a skutečné stravitelnosti fosforu 35 % (převzato: NRC 2007)

3.7.3 Faktory ovlivňující biologickou dostupnost fosforu u koní

Charakteristice trávení fosforu a jeho metabolismu u koní se doposud věnovalo několik studií (např. Matsui et al. 1999; Oliveira et al. 2008). Výsledky ukázaly, že biologická dostupnost fosforu se u koní pohybuje od 30 do 45 %. Autoři rovněž uvedli, že využitelnost fosforu lze ovlivnit jeho příjmem, věkem zvířat nebo poměrem vápníku a fosforu. Dále uvádí některé hodnoty biologické dostupnosti fosforu u různých krmiv, jako je kukuřice (32,0 %) nebo oves (40,0 %) (Oliveira et al. 2008).

Největší stravitelnost fosforu byla zaznamenána u 8měsíčních hříbat. Ńicméně už ve věku od jednoho do dvou let začíná stravitelnost prvku klesat o 2,0–7,7 % (Cymbaluk 1990; Fowler et al. 2015). Elzinga et al. (2014) uvádí, že stravitelnost fosforu u starších koní (19-28 let) byla dokonce jen 4,2 %. Stravitelnost fosforu je proto ovlivněna věkem koně.

Za účelem výpočtu potřeb fosforu byla stanovena jeho skutečná stravitelnost 35 % u dospělých koní a 45 % u rostoucích koní a laktujících klisen (NRC 2007). Nicméně dalším faktorem, který ovlivňuje stravitelnost fosforu je i jeho forma, ve které je koni podáván (organická nebo anorganická). Hodnoty stanovené NRC (2007) tak platí jen za předpokladu, že dospělí koně konzumují fosfor pouze z rostlinných zdrojů, zatímco rostoucí koně a laktující klisny jsou standartně krmeni dávkami s anorganickým fosforem, u kterého se předpokládá vyšší dostupnost než u formy organické, tj. rostlinné (NRC 2007).

Nedávná studie (Fowler et al. 2015) ovšem odhadla stravitelnost fosforu u koní ve věku jednoho roku na 42 %, i přesto, že obsahovala pouze organickou formu fosforu. Tím potvrdili hypotézu, že ročci nemají sníženou kapacitu pro využití organických zdrojů P ve srovnání s dospělými koňmi (Fowler et al. 2015).

Dále Grace et al. (2002) uvádí, že pastviny, které poskytovaly dostatečné množství fosforu odpovídající potřebám laktujících klisen, měly biologickou dostupnost 43 %. Skutečná stravitelnost by byla odhadnuta až na 57 % (za předpokladu endogenních ztrát 10 mg/kg tělesné hmotnosti). Laktující klisny tedy mají schopnost účinně trávit rostlinné zdroje fosforu bez doplnění anorganické formy do krmné dávky. Výsledky studií tudíž naznačují, že organický fosfor může být dostupnější, než se dříve věřilo.

3.7.4 Metody stanovení stravitelnosti fosforu

Ke stanovení určitého nutričního požadavku koně je třeba znát jeho stravitelnost. Aby bylo možné získat co nejpřesnější hodnoty potřeby fosforu, je důležité znát jeho využitelnost u různých druhů krmiv (Toribio 2011).

Existuje hned několik způsobů, jak stanovit stravitelnost fosforu. Metody *in vivo* jsou považovány za osvědčené, protože zohledňují všechny faktory, které by mohly ovlivnit stravitelnost u zvířete. Jednou z možných variant metod *in vivo* je celková analýza krmiv a sběr veškerých výkalů. Tato metoda je dodnes jednou z nejpoužívanějších, nicméně je velmi časově náročná a pracná (Marais 2000).

Další možností detekce stravitelnosti živin může být použití nylonových sáčků. U koní se ovšem tato metoda příliš nepoužívá, a to jednak z etických důvodů a zároveň kvůli nemožnosti využití například u sportovních koní. Naopak vzrůstající význam má tzv. indikátorová neboli markerová metoda, která funguje na principu stanovení nestravitelného markeru v krmné dávce (Cichorska et al. 2014).

Metody *in vitro* mohou představovat jednodušší a levnější variantu oproti již zmíněným metodám prováděných na živých zvířatech. Nicméně prozatím nebyla vyvinuta vhodná metoda tohoto typu pro zjištění stravitelnosti fosforu u koní (Marais 2000).

Při použití metod *in vivo* pro měření stravitelnosti fosforu u koní, je třeba vědět, kolik fosforu zvíře přijme a kolik ho vyloučí stolicí. Příjem fosforu lze vypočítat pomocí analýzy množství prvku v krmivu a záznamem množství krmné dávky, která je koni podávána. Sběr veškerých výkalů je potřebný k určení, kolik fosforu bylo stráveno v gastrointestinálním traktu (Alvarenga et al. 2017).

Zdánlivou stravitelnost lze také odhadnout pomocí nestravitelného markeru. U této metody se používá buď vnitřní nestravitelná složka stravy, nebo se do krmiva aplikuje externí nestravitelný marker. Použití interních nebo externích markerů umožňuje sběr tzv. bodových vzorků trusu pro získání odhadu, kolik výkalů a celkového fosforu kůň vyloučí. Příklady interních markerů, které se používají u koní, jsou popel nerozpustný v kyselině (AIA, z angl. acid-insoluble ash), nestravitelná neutrálně-detergentní vláknina (NDF), alkany a ytrium. Příkladem externího markeru může být oxid chromitý, ytterbium nebo oxid titaničitý (Sales 2012). Při použití této metody je měřeno přijaté a vyloučené množství nestravitelného markeru a fosforu (Marais 2000).

Zdánlivá stravitelnost fosforu při použití markeru se vypočítá jako:
100 - [(přijatý marker * vyloučený P) / (vyloučený marker / přijatý P) * 100].

Skutečná stravitelnost je podobná zdánlivé stravitelnosti, ale je doplněna o ztráty endogenního fosforu ve výkalech, které nepocházejí přímo z diety koně. Skutečnou stravitelnost lze vypočítat pomocí odhadů fekálních endogenních ztrát publikovaných v NRC (2007), avšak přesnějším způsobem, jak zohlednit fekální endogenní ztráty, je měřit je přímo pomocí radioaktivně značeného izotopu fosforu (Oliveira et al. 2008).

Stanovení vyloučeného endogenního fosforu ve výkalech je podstatné pro přesný výpočet skutečné stravitelnosti prvku. Izotop fosforu (32P) je injektován buď intravenózně, nebo intramuskulárně. Poté je měřena specifická aktivita v plazmě a radioaktivita ve výkalech. Množství vyloučeného endogenního fosforu ve výkalech lze spočítat jako poměr množství naměřené radioaktivity ve výkalech ke specifické aktivitě plazmy. Tuto metodu použili např. Oliveira et al. (2008). Ve své práci došli k závěru, že hodnota vyloučeného endogenního fosforu se pohybuje kolem 8,42 mg/kg tělesné hmotnosti (Oliveira et al. 2008).

Skutečnou stravitelnost lze poté vypočítat pomocí následující rovnice:
[(přijatý P - (vyloučený P – endogenní ztráta ve výkalech P)) / (přijatý P)] * 100.

Některé studie, které se zabývají měřením vyloučeného fosforu a jeho retence v organismu, počítají i s močí. Nicméně množství fosforu v moči koní je při jeho stadartním příjmu relativně nevýznamné. Například van Doorn et al. (2004) zjistili, že množství fosforu v moči bylo zanedbatelné i přesto, že byla koním podávána krmná dávka obsahující 37,4 mg P/kg tělesné hmotnosti (dle NRC je doporučený příjem pro dospělého koně 28,5 mg P/kg tělesné hmotnosti). Hladina fosforu v moči vzrostla až při dávce 2 % z diety, tedy při příjmu 91,8 mg P/kg tělesné hmotnosti. Lze tedy tvrdit, že v souvislosti s množstvím fosforu, které je koním krmeno, není sběr moči nutný (van Doorn et al. 2004; NRC 2007).

3.8 Fosfor v životním prostředí

Fosfor je nezbytný pro všechny živé organismy. Je vysoce reaktivní a v přírodě se nikdy nevyskytuje jako volný prvek, ale naopak jako fosfát, tj. vázaný na kyslík (Vance et al. 2003). Fosfor má mnoho funkcí, které jsou společné jak pro rostliny, tak i pro zvířata. Účastní se energetického metabolismu (ve formě ATP), je součástí RNA a DNA, dále ho můžeme najít ve formě fosfolipidu v membránách, má význam pro udržování acidobazické rovnováhy a podílí se na enzymatických činnostech (Smith 2002).

Fosfáty se v životním prostředí nacházejí jako organické nebo anorganické sloučeniny. V organických sloučeninách fosfátů je fosfor vázán na aminokyselinu, lipid nebo sacharid. Typickou vlastností anorganických sloučenin fosfátů je vysoká rozpustnost ve vodě (Parvage et al. 2015).

Mezi nejvýznamnější anorganické sloučeniny P v kyselých a mírně kyselých půdách patří fosforečnany železa nebo hliníku. Naopak v neutrálních a zásaditých půdách můžeme nejčastěji najít fosforečnany vápníku. Organicky vázaný P, který se nachází především v povrchových vrstvách půdy, se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 20 do 80 % z celkového P. Z organických sloučenin P je v půdě nejvíce zastoupena kyselina fytová, která může tvořit 10 až 50 % z celkového organického P, zatímco fosfolipidy a nukleové kyseliny přibližně jen 1 až 2 % (Brady & Weil 2015).

Fosfor v půdě podléhá různým procesům a přeměnám. Z těchto dějů je dominantní především proces sorpce/desorpce a srážení/rozpouštění fosforečnanů. Dále také mineralizace organicky vázaného P nebo jeho imobilizace půdní biomasou. Sorpční proces je součástí tzv. fosforečnanového pufračního mechanismu, který popisuje schopnost částic vyrovnávat změny koncentrace P v roztoku (Froelich 1988). I v případě, že se koncentrace P v roztoku zvýší nebo sníží, se po určité době ustálí rovnovážná koncentrace (EPC, angl. equilibrium phosphate concentration), a to především díky adsorpci či desorpci P na půdní částice (Froelich 1988). Koncentrace P v půdním roztoku, při které nedochází k sorpci ani jeho uvolňování, se označuje jako EPC_0 a je parametrem, který indikuje jak dostupnost P, tak i riziko ztrát rozpuštěného P v povrchovém odtoku (Brady & Weil 2015).

Celkové množství fosforu v půdě kolísá od 0,01 – 0,15 %. Vyšší obsah fosforu vykazují většinou půdy s vyšším obsahem organické hmoty, zatímco půdy lehké (s nižším obsahem organické hmoty) mají obsah fosforu nízký. Velikost těchto hodnot však záleží na použitých údajích pro výpočet, kterými jsou hloubka půdy, zastoupení minerálů obsahujících P, hustota dané půdy, obsah pórů, vody apod. (Stevenson & Cole 1999).

Fosfor v rostlinách je nezbytný pro raný vývoj kořenů a pro zrání rostliny (Smith 2002). Rostliny obsahují jak anorganický, tak organický P. V cytoplazmě je koncentrace anorganického P 5-10 mmol/l.

Pro rostliny je P přístupný pouze v rozpuštěných formách, přičemž podíl tohoto P je v půdě velmi malý. Dostupnost P pro absorpci rostlinou závisí hlavně na koncentraci P a pH v půdě. Při návratu rostlinného materiálu do půdy je mineralizován organický P, který obsahují. K mineralizaci dochází činností půdních mikrobů a následně je tedy P rostlinám dostupný jako anorganický fosfát (Sanyal & DeDatta 1991).

3.8.1 Vliv chovu koní na životní prostředí

V průběhu minulého století se odborná veřejnost začala více zabývat problematikou fosforu a jeho vlivem na životní prostředí (Ashley et al. 2011). U koní je fosfor vylučován zejména výkaly, ze kterých se dále dostává do svrchní vrstvy půdy, kde je velmi rychle štěpen. Následně je fosfor splaven do povrchových vod a později se stává jednou z důležitých živin pro řasy a sinice, které způsobují nepříjemné zarůstání vodních zdrojů (Westendort & Williams 2015).

Tento jev se obecně nazývá eutrofizace vod a nastává ve chvíli, kdy se fytoplankton rozrůstá a prochází populační expanzí. Když tyto sinice a řasy uhynou, jejich rozklad způsobí snížení obsahu kyslíku ve vodě, což může mít fatální vliv na ryby a jiné vodní organismy. Celkově tak dochází k narušení normálního vodního ekosystému (Westendorf & Williams 2015).

Největším zdrojem eutrofizace je rozpustný fosfor, který je pro řasy a sinice okamžitě dostupný ve srovnání s nerozpustným tzv. partikulárním fosforem. Tato forma fosforu je vázána v biomase fytoplanktonu a bakterií nebo na půdních koloidních částicích o velikosti do 1 μm s vysokou sorpční kapacitou (Heathwaite et al. 2005; Duffková et al. 2016).

Na eutrofizaci vod se může podílet forma anorganická i organická. Anorganický fosfor podporuje růst mnoha druhů vodního fytoplanktonu, zejména *Pfiesteria piscicida*. Tyto obrněnky uvolňují toxin, který může mít negativní důsledky na vodní organismy. Organický fosfor podporuje růst několika druhů fytoplanktonu např. *Phaeocystis pouchetii* nebo *Skeletonema costatum*, což nadále přispívá ke tvorbě jejich květů (Hallegraeff et al. 2004).

Eutrofizace je problémem mnoha sladkovodních i mořských vodních systémů po celém světě. Na jejím vzniku mají velký podíl různá odvětví zemědělství, k nimž se řadí i chov koní (Lavin et el. 2013). Stáje, koňské farmy nebo ranče ovšem nejsou zahrnuty v Rámcové směrnici EU o vodách (angl. Water Framework Directive), a to i přesto, že zabírají zhruba 4 % evropské zemědělské půdy.

NRC (2007) považuje koňské výkaly za méně rizikové pro životní prostředí ve srovnání s jinými hospodářskými zvířaty. Předpokládá, že koňský hnůj obsahuje méně ve vodě rozpustného P, který je náchylný k vyplavování. Pozdější studie (Knowlton et al. 2004; Parvage et al. 2011; Uusi-Kämppä et al. 2012; Parvage et al. 2013; Parvage et al. 2015) však ukázaly opak, a sice že pastviny, které jsou spásány koňmi jsou zdrojem zvýšeného vyplavování P do vnějšího prostředí. Saastamoinen et al. (2020) ve své práci uvádí, že na jednoho koně připadá průměrná exkrece fosforu v množství 7,6 kg/rok. Z toho rozpustná část, která se nachází v trusu, tvoří 88 %. Touto problematikou se zabývali i další autoři. Například Ögren et al. (2013) ve své práci uvádí, že z celkově vyloučeného fosforu u koní tvoří 80 % rozpustnou část, Dougherty et al. (2008) uvádí dokonce 90 % (Dougherty et al. 2008; Ögren et al. 2013).

Vzhledem k neustále se navyšujícímu počtu koní v mnoha členských zemích může docházet ke zvyšování obsahu rozpustného fosforu v půdě (Parvage et al. 2015). Například ve Velké Británii je evidován asi 1 milion koní, ve Španělsku 0,6 milionu, ve Švédsku 0,4 milionu a v Belgii 0,3 milionu koní (EPMA 2009). Podobná situace nastává i v České republice, kde počty zde chovaných koní rovněž neustále stoupají. Ke konci roku 2019 bylo evidováno téměř 0,097 milionu koní (MZe 2021).

Velká část celkové zemědělské plochy, která je využívána pro koně, tvoří intenzivně řízené venkovní výběhy nacházející se v blízkosti stájí. Ve výbězích se často neodstraňují zbytky krmiva a výkaly, což vede k hromadění živin v půdě. Vysoká koncentrace P a N ve výbězích může vést k vysokému odtoku a následné vyplavování prvků tak může přispět k zatížení N a P v okolních vodních plochách (Parvage et al. 2015).

Ke zvýšenému vyplavování prvků dochází zejména na písčitých půdách (Parvage et al. 2015). V oblasti hřebčína Kladruby nad Labem se nachází půdní typ kambizem, konkrétně hlinitopísčitá půda (Tomášek 1995). Oba tyto půdní typy jsou si velmi podobné, jelikož spadají mezi tzv. lehké půdní typy. V praxi to znamená, že jsou vzdušné a špatně poutají vlhkost kvůli vysokému obsahu velkých půdních částic (Duffková et al. 2016).

Obsah fosforu v půdě na pastvinách v Selmicích (tj. místo odchovu odstávčat) je „dobrý" dle Vyhlášky č. 335/2017 o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění pozdějších předpisů (viz Příloha V.). Ovšem ve srovnání s průměrnou hodnotou fosforu u půd trvalých travních porostů (74 mg/kg) je tento obsah podprůměrný (ÚKZÚZ 2018).

3.9 Redukce vyplavování fosforu do vnějšího prostředí

Přestože fosfor přispívá ke znečištění životního prostředí, je zároveň omezeným zdrojem a v budoucnu může snadno dojít k jeho nedostatku (Ashley et al. 2011). Surový fosfát se získává těžbou hornin. Fosfátová moučka se používá v zemědělství většinou jako hnojivo, ale lze ji také přidat do komerčních krmiv pro zvířata. V současné době je na světě jen hrstka aktivních dolů a jejich zásob ubývá. Předpokládá se, že svět vyčerpá fosfor během příštích 40 až 150 let (McGill 2012). Proto je nezbytné, aby se začalo více uvažovat o způsobech recyklace nebo naopak o omezení využívání fosforu, než jeho nedostatek způsobí problémy v moderních zemědělských systémech (Ashley et al. 2011).

Z tohoto důvodu je kladen větší důraz na zachování této živiny a snížení jejího vyplavování do vnějšího prostředí.

Co se týče výživy koní a využití fosforu v krmivech, existují tři hlavní způsoby, jejichž prostřednictví lze snížit dopad na životní prostředí:

1. znalost přesného složení krmných dávek a stravovacích návyků koní;
2. použití genotypových plodin s nižším obsahem kyseliny fytové;
3. použití exogenních fytáz jako doplňku do krmné dávky (Knowlton et al. 2004).

Všechny tři body lze zároveň aplikovat i v chovech ostatních hospodářských zvířat.

První bod se týká přesného složení krmných dávek. Dle Bomans et al. (2005) celkový obsah P v krmivech často přesahuje potřeby hospodářských zvířat. Jeho redukce je přitom žádoucí pro snížení obsahu P ve výkalech (Bomans et al. 2005).

Low-phytic acid zkráceně *lpa* je obecné označení fenotypového znaku linií vykazujících snížený obsah kyseliny fytové doprovázený zvýšeným obsahem anorganického fosfátu Pi v semenech rostlin. Cílem vytvoření *lpa* genotypů je zlepšit nutriční hodnotu krmiv zvýšením stravitelnosti fosforu a minerálních látek vázaných v semenech na fytát, a tím také snížit znečištění spodních a povrchových vod v blízkosti farem (Raboy et al. 2000).

Dosavadní studie ovšem prokázaly, že mutanti *lpa* mají ve srovnání se svými divokými typy snížený výnos i toleranci vůči stresu. Tyto negativní důsledky úzce souvisí se sníženým obsahem kyseliny fytové (Bregitzer & Raboy 2006).

Dalším možným řešením redukce vyplavování fosforu do vnějšího prostředí je použití exogenních fytáz v krmných dávkách koní pro lepší využitelnost fosforu. Avšak výsledky současných studií zatím ukázují, že suplementace exogenních fytáz nemá žádný vliv na dostupnost fosforu u koní. Nicméně pro ověření je třeba provést další výzkumy (Morris-Stocker et al. 2001).

4 Metodika

Hodnocení stravitelnosti fosforu u odstávčat bylo provedeno v Národním hřebčínu Kladruby nad Labem. V experimentu byla vytvořena skupina 16 koní, ve které se nacházeli jedinci stejného pohlaví (hřebci) i věku (viz Příloha I.). Na začátku pokusu byl průměrný věk skupiny 8 měsíců. Všichni koně byli po celou dobu pokusu ve volném skupinovém ustájení na hluboké podestýlce.

Odstávčatům byly podávány diety, které jsou v hřebčíně standardně zkrmovány. Koně byli krmeni dvakrát denně (v 6.30 hod. a 15.00 hod.). V době zahájení pokusu bylo koním podáváno 7 kg sena a 1 kg ovsa. Dále všichni koně měli neustálý přístup k čerstvé vodě a solnému a minerálnímu lizu (Horsal® Leckschale od firmy Schaumann). Pokus byl proveden mimo pastevní období.

Vzorky jadrných a objemných krmiv byly analyzovány laboratoří v Písku v listopadu 2020 (viz Příloha III., IV. a V.).

V rámci pokusu byly koním pravidelně odebírány vzorky trusu, a to jednou za 14 dní (viz Tabulka 3). Odběr se opakoval celkem šestkrát a probíhal vždy ráno (6.30 hod.) před čištěním místa ustájení. Každý odběr vzorku byl proveden ze středu trusu, který nebyl v kontaktu s podlahou nebo podestýlkou. Jednotlivé vzorky čerstvého trusu byly odebírány zvlášť do uzavíratelných plastikových sáčků se zipem. Bezprostředně po odběru byly uchovávány v chladu do doby, než byly zmrazeny na teplotu -20° C. Před vlastní analýzou odebraného trusu byly vzorky smíchány. Následně byly vytvořeny 2 reprezentativní vzorky z každého odběru (viz Příloha II.), které byly dále analyzovány v laboratoři KMVD na ČZU a ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi (VÚŽV). Rovněž zde byly stanoveny vybrané živiny předkládaných krmiv.

Ke statistickému vyhodnocení získaných výsledků byl použit tabulkový editor Microsoft Excel 2016. V programu byla vyhodnocena popisná statistika získaných dat a bylo provedeno vyhodnocení odlehlých hodnot pomocí Grubbsova testu.

Tabulka 3: Harmonogram odběrů vzorků trusu

Harmonogram odběrů vzorků trusu	
1. Odběr	21.12.2020
2. Odběr	4.1.2021
3. Odběr	18.1.2021
4. Odběr	31.1.2021
5. Odběr	15.2.2021
6. Odběr	1.3.2021

4.1 Metody

Ze vzorků trusu a krmiv byla analyzována sušina, popelovina, organická hmota, dusíkaté látky, neutrálně-detergentní (NDF) a acido-detergentní vláknina (ADF), acido-detergentní lignin (ADL), fosfor a vápník.

Sušina vzorku a popeloviny byly stanoveny ve VÚŽV v Uhříněvsi. V laboratoři KMVD na ČZU byly analyzovány dusíkaté látky Khjeldalovou metodou pomocí analyzátoru Foss Khjeltec 2400. Neutrálně-detergentní a acido-detergentní vláknina a lignin byly analyzovány analyzátorem vlákniny ANKOM 200. Ve VÚŽV byl dále analyzován celkový fosfor fotometrickou metodou. Vápník byl stanoven pomocí atomového absorpčního spektrometru (AAS).

Jako indikátor pro stanovení stravitelnosti byl použit písek, který představuje množství popelovin ve vzorku nerozpustné v 10 % HCl. Pro srovnání výsledků byl rovněž použit acido-detergentní lignin, jakožto druhý indikátor stravitelnosti. Nicméně v našem pokusu došlo k chybným výsledkům při stanovení ADL, a tudíž bylo dále pracováno pouze s výsledky, které byly stanoveny dle indikátoru písku.

Ze získaných výsledků byla vyhodnocena zdánlivá stravitelnost vybraných živin. Prostřednictvím výpočtu bylo odečteno množství specifické živiny, které bylo zjištěno ve stolici, od celkového denního příjmu této živiny. Získané množství bylo dále vyděleno celkovým denním příjmem, čímž bylo získáno procento příjmu živiny (Pagan 1998).

4.1.1 Laboratorní stanovení sušiny a popelovin

Sušina byla stanovena z rozdílu hmotností vzorku před a po jeho vysušení zhruba při 103°C. Vzorky byly sušeny v sušárně 4-6 hodin. Po vychladnutí byly zváženy na analytických vahách, přičemž úbytek hmotnosti představoval vodu a zbytek sušinu vzorku.

Popeloviny jsou tvořeny nejen minerálními látkami a stopovými prvky, ale také látkami nerozpustnými, jako je například písek. Jejich analýza probíhala podobným způsobem jako stanovení sušiny. Vzorky byly vloženy do muflové pece a spáleny při 550 °C. V závěru byl zvážen vzniklý popel a stanoven jeho obsah dle vzorce:

% popelovin ve vzorku = (hmotnost popela / navážka) * 100

Dále byla u vzorků stanovena organická hmota prostřednictvím odpočtu množství popelovin od sušiny vzorku.

Další úprava vzorků spočívala v jejich namletí na velikost 1 mm, aby byla zajištěna homogenizace vzorků pro další analýzy. Mletí vzorků probíhalo na střižném mlýnu SM 100 (fa Retsch, viz Obr. 6). Namleté vzorky pak byly převedeny do nadepsaných plastových lahviček.

Obrázek 6: Střižný mlýn (vlastní zdroj)

4.1.2 Laboratorní stanovení písku

Pro stanovení zdánlivé stravitelnosti se většinou využívá *in vivo* metody založené na použití interních nebo externích markerů. Jako interní markery lze využít písek nebo acido-detergentní lignin. Písek představuje část popelovin, která je nerozpustná ve vodě nebo v 10 % HCl.

Na přípravu 1 litru roztoku této kyseliny bylo použito 100 ml 35 % HCl a 900 ml destilované vody. Pro stanovení písku bylo naváženo 5 g vzorku sušiny. Pro každý vzorek byla provedena 1 kontrola. Všechny navážené vzorky byly spáleny v muflové peci při 550 °C. Po vychladnutí byl popel kvantitativně převeden do Erlenmeyerovy baňky. Pro úplné převedení byl spalovací kelímek vypláchnut střičkou s malým množstvím 10 % HCl. Poté bylo přidáno 20 ml HCl do každé baňky, které se dále nechaly vařit na 20 minut při mírném varu. Na každou baňku byl nasazen skleněný klobouček zabraňující odparu. Po skončení varu byl vzorek opět kvantitativně převeden na bezpopelný filtrační papír (Fisher Scientific Inc., průměr 150 mm, střední hustota) umístěný v rychlofiltrační nálevce. Vzorek byl promýván horkou destilovanou vodou přes skleněnou tyčinku.

Po promytí asi 500 ml byla provedena zkouška na přítomnost chloridů. Zkouška byla provedena pomocí 1 % roztoku dusičnanu stříbrného. Pokud byly chloridové ionty stále přítomny, po kápnutí roztoku se těsně pod hladinou objevila bílá sraženina. V případě, že už se sraženina neobjevila, byl dofiltrován zbytek vody z filtru, který byl následně vložen

do předem zváženého spalovacího kelímku. V našem pokusu byla spotřeba destilované vody na promytí vzorku zhruba 750 až 800 ml. Poté byly kelímky sušeny zhruba 1 hodinu na 103 °C a následně byly spáleny v peci na 550 °C. Spálený kelímek byl zvážen na analytických vahách a procentický obsah písku byl vypočítán podle následujícího vzorce:

% písku nerozpustného v HCl = ((spálený kelímek – prázdný kelímek) / navážka) *100

4.1.3 Laboratorní stanovení dusíkatých látek

Stanovení dusíatých látek bylo provedeno metodou podle Kjeldahla na přístroji Kjeltec 2400 (fa FOSS). Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

První fází pro stanovení dusíku bylo navážení vzorku. Navážení vzorků probíhalo na analytických vahách pomocí navažovací lodičky. Hmotnost navážky byla 0,5 g. Po navážení byl vzorek vložen do mineralizační tuby (pomocí štětce byl převeden všechen materiál). Jednotlivé tuby byly vloženy do mineralizačního stojanu v následujícím pořadí:

17	18	19	20
13	14	15	16
9	10	11	12
5	6	7	8
1	2	3	4

Druhým krokem byla mineralizace. Do každé tuby byla přidána mineralizační tableta Kjeltabs CK (obsahuje síran draselný a pentahydrát síranu měďnatého) a 10 ml koncentrované kyseliny sírové z dávkovače. Dále byl stojan s tubami přenesen do digestoře a do každé tuby bylo postupně přidáno 2x 5 ml 33 % peroxidu vodíku. Na stojan bylo použito zařízení pro odsávání par a byl vložen do mineralizačního bloku na 45 minut, přičemž mineralizace probíhala při 420 °C. Při mineralizaci došlo ke spálení organické hmoty. Amoniak z dusíkatých látek se navázal s kyselinou sírovou na síran amonný. Po uplynutí 45 minut byl stojan vyndán z mineralizačního bloku a nechal se vychladnout. Po vychladnutí tub bylo přidáno 10 ml destilované vody a obsah byl promíchán.

Další fází byla vlastní analýza na přístroji Kjeltec 2400. Na přístroji byly zadány navážky jednotlivých vzorků a poté byly vloženy tuby přímo do přístroje. Automaticky došlo ke zředění vzorku destilovanou vodou, k nadávkování louhu (hydroxid sodný) a zahřívání – probíhala destilace. Při této reakci došlo k uvolnění amoniaku ze síranu amonného, který unikal z tuby a trubičkou byl veden do předlohy se známým množstvím kyseliny borité o známé koncentraci. Roztok byl následně titrován hydroxidem sodným, čímž bylo zjištěno, kolik kyseliny borité bylo zneutralizováno amoniakem.

Výsledné hodnoty byly předem nastaveny na % N. Vzhledem k našim výsledným hodnotám (do 20 % N ve vzorku) byl povolený rozdíl při opakovatelnosti vzorků do 0,2 %.

4.1.4 Laboratorní stanovení detergentní vlákniny a ligninu

Pro stanovení vlákniny byla využita technologie filtračních sáčků (z angl. FBT – Filter Bag Technology), kdy analyzovaný vzorek uzavřený v zataveném sáčku uvolňuje rozpuštěné látky, které odchází stěnou sáčku do roztoku a nerozpustné částice zůstávají uzavřeny uvnitř. Výhodou sáčků je, že odolávají působení kyselin a hydroxidů, mají zanedbatelný obsah dusíku a popela a nepohlcují vlhkost (Teper 2000).

Před vlastním stanovením detergentní vlákniny (DF) nejpre proběhla příprava vzorků. Nejdříve byly nadepsány a předsušeny filtrační sáčky určené pro stanovení detergentní vlákniny (F57, ANKOM, fa O.K. Servis BioPro). Sáčky byly sušeny v sušárně při 103 °C. Po vychladnutí byly jednotlivé sáčky zváženy. Následně bylo na analytických vahách pomocí skleněné lodičky naváženo 0,5 g vzorku. Každý vzorek byl analyzován dvakrát. Vzorek byl převeden do filtračního sáčku, který byl následně zataven a proklepán tak, aby byl obsah rovnoměrně rozprostřen po celém sáčku.

Navážený vzorek byl 30 minut vařen v přístroji ANKOM^{200} (fa ANKOM Technology). Var probíhal v roztoku hydroxidu draselného a následně byl promýván horkou vodou (tj. stanovení NDF zahrnující celulózu, hemicelulózu a lignin). Poté byl vzorek 30 minut vařen v roztoku kyseliny sírové a dále byl promýván horkou vodou (tj. stanovení ADF zahrnující pouze celulózu a lignin). Po vyjmutí vzorku z přístroje byl nejprve promyt acetonem a dále byl sušen v sušárně. Vysušený vzorek byl zvážen a byla stanovena hmotnost nerozpuštěného zbytku krmiva. Nakonec byl vzorek vložen do muflové pece, spálen při teplotě 550 °C a po vychladnutí došlo k jeho zvážení.

Ke stanovení ADL byly použity filtrační sáčky se vzorky, které prošly kyselou hydrolýzou pro stanovení ADF. Horkou vodou propláchnuté vzorky byly po okapání vloženy do 72 % roztoku kyseliny sírové (720 ml 96 % H_2SO_4 + 240 ml H_2O) a při pokojové teplotě 20 °C byly extrahovány po dobu 3 hodin. Tímto procesem byla ze vzorku odstraněna celulóza (Koukolová et al. 2010). Po extrakci byly sáčky propláchnuty horkou destilovanou vodou, vždy po dobu 5 minut. pH muselo být alespoň 5,5. Propláchnuté vzorky byly dále vysušeny. Doba vysoušení byla 2–3 hodiny při teplotě 105 °C. Vysušené a v exikátoru vychladlé sáčky byly zváženy a dále spáleny v předem zvážených porcelánových kelímcích při teplotě 550 °C po dobu 2 hodin.

Množství detergentní vlákniny a acido-detergentního ligninu v krmivu bylo zjištěno porovnáním hmotnosti vzorku před a po spálení dle vzorce:

% DF = [100* (hmotnost sáčku po extrakci – hmotnost prázdného sáčku x hmotnost kontrolního sáčku] /navážka vzorku

4.1.5 Laboratorní stanovení celkového fosforu a vápníku

Vlastnímu stanovení minerálních látek předcházela příprava vzorků. V prvé řadě byla potřeba mineralizace vzorků suchou cestou, tj. spálení vzorků v muflové peci při 500 °C po dobu 20 hodin. Z vychladlého popela byl dále připraven výluh (7 ml HCl 1:1) do odměrné baňky o objemu 25 ml. Výluh byl dále přefiltrován do zásobní lahvičky. Takto připravený vzorek mohl být dále analyzován.

4.1.5.1 Laboratorní stanovení fosforu

Celkový fosfor byl stanoven fotometricky. Do připravených odměrných baněk 25 ml bylo odměřeno 20 ml molybdovanadátového činidla. Postupně bylo do baněk pipetováno 0,2-5 ml výluhu vzorku. Poté byly baňky doplněny po rysku redestilovanou vodou, obsah byl zamíchán a po 30 minutách byla změřena absorbance žlutého roztoku v 1 cm kyvetě proti blanku. K měření byl použit spektrofotometr Specol 11 (fa Carl Zeiss Jena) a absorbance byla měřena při 430 nm.

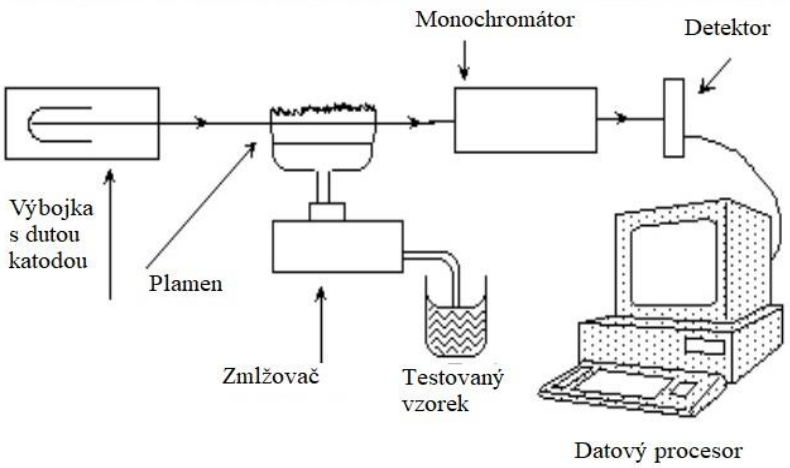
4.1.5.2 Laboratorní stanovení vápníku

Vápník byl stanoven na atomovém absorpčním spektrofotometru s plamenným atomizérem ContrAA 700 (fa Analytik Jena).

Princip atomové absorpční spektrometrie spočívá ve zmlžení roztok analytického vzorku. Vzniklý aerosol je pak zaveden do plamene, kde se okamžitě odpaří a rozruší se chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Podmínky atomizace jsou přitom voleny tak, aby co největší populace měřených atomů zůstala v neutrálním stavu a nedocházelo k ionizaci za vzniku kladně nabitých částic. Plamenem prochází paprsek světla ze speciální výbojky, jehož fotony jsou při setkání s atomy analyzovaného prvku absorbovány a atom prvku přechází do příslušného vzbuzeného stavu. Dochází tak k úbytku intenzity procházejícího světla. Měřicí systém metody AAS se skládá ze 3 základních součástí (viz Obr. 7):

1. zdroje elektromagnetického záření,
2. měrné cely, v níž dochází k atomizaci (plamen),
3. optického detekčního systému, který měří intenzitu prošlého záření o specifické vlnové délce (Khadka 2015).

Kromě toho je každý přístroj vybaven zařízením, které provádí transport kapalného vzorku do měrné cely a výpočetním systémem, který řídí běh celé analýzy a vyhodnocuje naměřené signály, které převádí přímo do požadovaných jednotek (např. koncentrace měřeného prvku ve vzorku (Khadka 2015).



Obrázek 7: Schematický diagram atomové absorpční spektrometrie (převzato: Khadka 2015)

V našem pokusu byl použit plamen acetylen – vzduch. Obecně se pro analýzu alkalických kovů volí přídavek tzv. iontových pufrů, které jsou úmyslně přidány ve vysokém nadbytku vůči analyzovanému prvku. Vytvářejí tak prostředí, které je z hlediska ionizace uniformní pro všechny přítomné prvky. Typickými iontovými pufry jsou sloučeniny cesia nebo lanthanu. V naší analýze byl jako iontový pufr použit lanthan (La^{3+}).

5 Výsledky

5.1 Výsledky analýz živinového složení krmiv

Tabulka 4: Průměrný denní příjem živin v původní hmotě krmiva [g/kg]

Průměrný denní příjem živin v původní hmotě krmiva [g/kg]										
Krmivo	**Původní hmota [kg]**	**Sušina [g]**	**Popel [g]**	**NL [g]**	**Ca [g]**	**P [g]**	**NDF [g]**	**ADF [g]**	**ADL [g]**	**Písek [g]**
Seno	7	5789,7	460,6	293,48	28,56	21,7	2783,55	2393,3	218,75	125,843
Oves	1	870,4	39,67	92,50	0,5	4,05	672,8	390,1	72,3	6,912
Celkem	**8**	**6660,1**	**500,27**	**385,98**	**29,06**	**25,75**	**3456,35**	**2783,4**	**291,05**	**132,755**

V tabulce č. 4 jsou uvedeny hodnoty průměrného denního příjmu krmiva včetně množství jednotlivých živin. Příslušné hodnoty jsou uvedeny v jednotce g/kg.

Průměrný obsah písku v 1 kg sena byl 17,98 g a v 1 kg ovsa byl 6,91 g. Koně denně přijímali 7 kg sena a 1 kg ovsa. Celková denní krmná dávka celkem obsahovala 132,76 g/kg písku (viz Tabulka č. 4). V 1 kg výkalů bylo průměrně obsaženo 6,68 g písku.

5.2 Výsledky analýz živinového složení ve výkalech

5.2.1 Shrnutí výsledků stravitelnosti živin v pokusu

Zdánlivá stravitelnost byla vypočtena pomocí vzorce pro stanovení stravitelnosti indikátorovou metodou.

$$\text{Stravitelnost} = 100 - ((i_{krm} * ž_{výk}) / (i_{výk} * ž_{krm})) * 100)$$

i_{krm} – procento indikátoru v sušině krmiva
$ž_{výk}$ – procento živiny obsažené v sušině výkalů
$i_{výk}$ – procento indikátoru v sušině výkalů
$ž_{krm}$ – procento živiny v sušině krmiva

Tabulka 5: Průměrná stravitelnost živin u odstávčat během jednotlivých odběrů

Průměrná stravitelnost živin u odstávčat během jednotlivých odběrů							
	Popeloviny [%]	**NL [%]**	**NDF [%]**	**ADF [%]**	**OH [%]**	**Ca [%]**	**P [%]**
Odběr č.1	45,9	68,4	72,9	81,3	78,6	72,1	74,4
Odběr č.2	49,2	81,0	80,6	89,2	86,2	79,8	87,0
Odběr č.3	32,7	26,8	25,0	46,4	44,0	39,6	42,5
Odběr č.4	40,2	61,4	65,9	75,8	75,0	61,8	71,1
Odběr č.5	43,2	56,2	52,6	66,9	64,7	61,6	66,8
Odběr č.6	31,8	30,1	35,0	58,9	50,2	37,7	41,7

V tabulce č. 5 jsou uvedeny hodnoty průměrných stravitelností živin během jednotlivých odběrů. Stravitelnost byla určena pomocí indikátorové metody. V našem pokusu byly použity indikátory, které jsou běžnou součástí krmiv, tj. písek a acido-detergentní lignin.

Indikátorová metoda byla zvolena z důvodu, že nevyžaduje kvantitativní zachycení tuhých výkalů. Metoda měla rovněž odstraňovat problematiku spojenou s kolísáním množství příjmu krmiva při dávkovaném krmení. Nicméně v našem pokusu došlo k chybným výsledkům při stanovení ADL, což mohlo být způsobeno například nestejnoměrným rozptýlením tohoto indikátoru v krmivech a výkalech. Průměrnou stravitelnost jsme tedy dále stanovovali pouze za pomoci indikátoru písku.

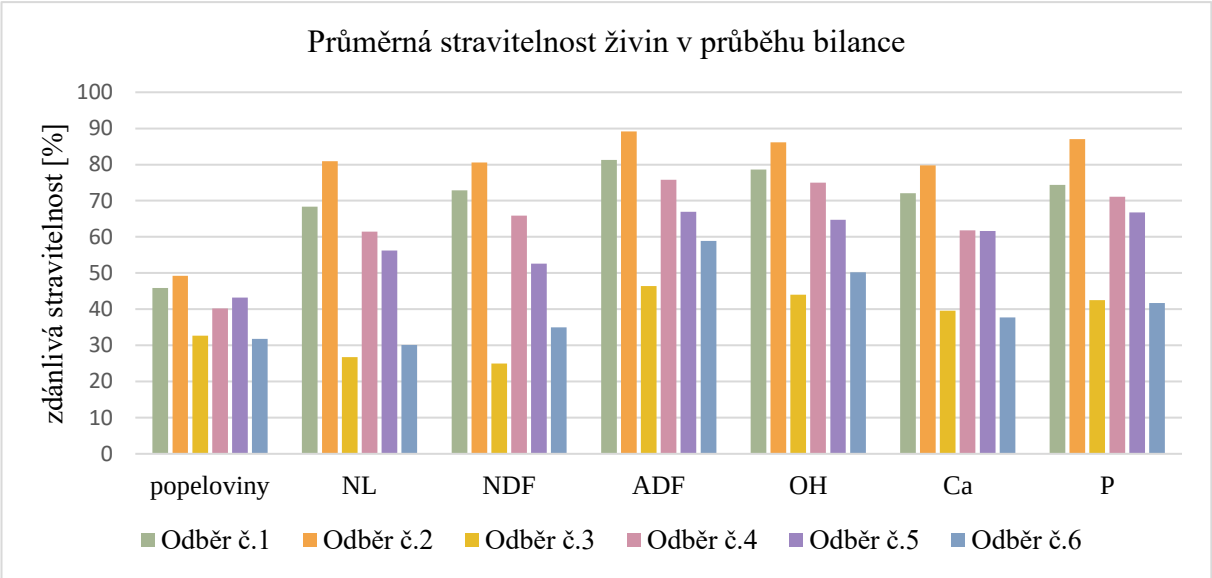
Byl proveden Grubbsův test pro odhalení možných odlehlých hodnot, případně pro jejich vyloučení ze souboru. Test byl proveden na hladině významnosti α=0,05. Při této hladině a počtu měření n=6 byla stanovena kritická hodnota T – 1,887. Byly vypočteny průměry všech měření a jejich směrodatné odchylky. Dále bylo vypočteno testovací kritérium pro první nejnižší (případně nejvyšší) hodnotu souboru. Grubbsův test ovšem ani v jednom případě nepotvrdil přítomnost odlehlé hodnoty. Některé hodnoty měření byly pouze označeny jako nejvzdálenější od zbylých hodnot, nicméně odlehlá hodnota nebyla u žádné z nich prokázána. Nulová hypotéza tudíž nemohla být zamítnuta – byl stanoven statisticky nevýznamný rozdíl ($p>0,05$). V původním souboru byly ponechány všechny naměřené hodnoty, se kterými bylo dále pracováno (viz Tabulka 6).

Tabulka 6: Průměrná stravitelnost živin u odstávčat za celé období pokusu

Průměrná stravitelnost živin u odstávčat za celé období pokusu					
	Aritmetický průměr [%]	**Směrodatná odchylka [%]**	**Medián [%]**	**Minimum [%]**	**Maximum [%]**
popeloviny	40,501	7,0544	41,278	24,250	52,608
NL	53,983	21,480	57,811	14,001	82,111
NDF	55,335	21,907	58,291	12,147	81,162
ADF	69,774	15,616	70,487	37,972	92,287
OH	66,442	16,625	68,568	34,894	87,105
Ca	58,791	17,021	61,820	28,048	83,712
P	63,922	18,193	67,729	30,420	87,206

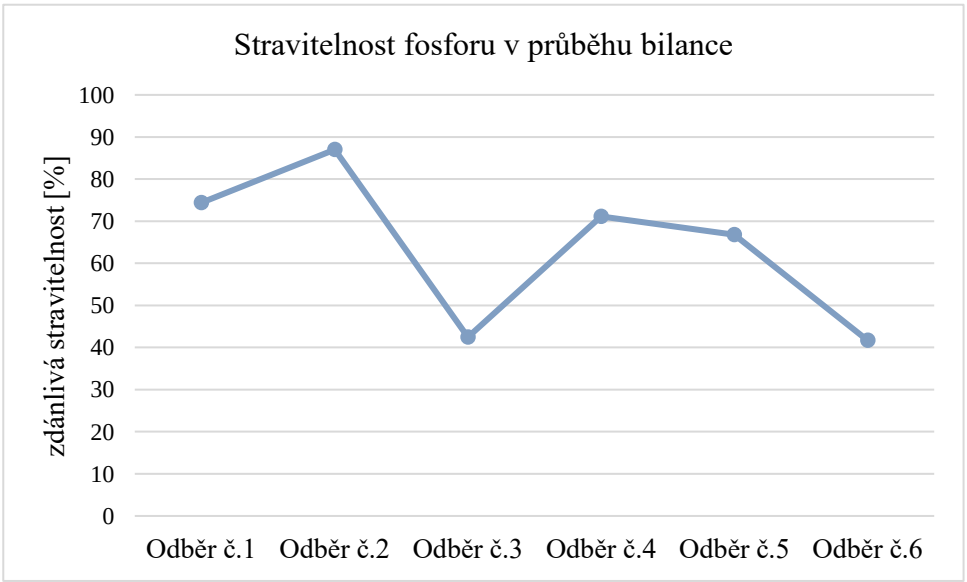
V tabulce č. 6 jsou uvedeny hodnoty průměrných stravitelností živin u odstávčat za celé období pokusu. Tabulka byla zpracována za celé bilanční období, tzn. z průměrných hodnot všech šesti odběrů vzorků. V tabulce nebyla zahrnuta stravitelnost sušiny. Průměrný příjem sušiny u odstávčat v celé bilanci odpovídal 2,08 % z živé hmotnosti koně. Průměrná stravitelnost sušiny za celé období pokusu byla 69,54 % ± 0,09. Přičemž aritmetický průměr středních hodnot byl vypočítán na 69,54 %. Nejnižší hodnota stravitelnosti sušiny v našem pokusu byla zjištěna u posledního odběru - 69,43 %. Naopak maximální stravitelnost byla vypočtena při analýze vzorku z 1. odběru - 69,68 %.

5.2.2 Grafické znázornění stravitelnosti živin



Graf 1: Průměrná stravitelnost živin v průběhu bilance

Graf 1 znázorňuje průměrnou stravitelnost popelovin, dusíkatých látek (NL), neutrálně-detergentní (NDF) a acido-detergentní vlákniny (ADF), organické hmoty (OH), vápníku (Ca) a fosforu (P) pro jednotlivé odběry vzorků. Je zřejmé, že během analýzy vzorků třetího odběru byla provedena chyba v měření, jelikož managment chovu se během pokusu nijak neměnil. Na zbývající části grafu můžeme pozorovat celkově snižující se stravitelnost jednotlivých živin v průběhu pokusu. Klesající stravitelnost živin může být dána vzrůstajícím věkem hříbat. Konkrétně u mladých rostoucích koní se například uvádí nejvyšší stravitelnost fosforu v době, kdy dosahují věku 8 měsíců. Právě v této době byl tento pokus zahájen. Od 8. měsíce již stravitelnost fosforu klesá, což níže dokládá Graf 2.



Graf 2: Stravitelnost fosforu v průběhu bilance

6 Diskuze

Výživa koní se odvíjí od plemenné příslušnosti, zdravotního stavu, živé hmotnosti a věku koně. Potřeba sušiny jako hlavního dodavatele živin se s pracovní zátěží a hmotností koně zvyšuje (NRC 2007). Zeman et al. (2005) uvádí potřebu sušiny okolo 2 kg na 100 kg živé hmotnosti. Při hmotnosti 320 kg u 8měsíčních odstávčat (v případě že hmotnost dospělého koně je 600 kg) by měl být příjem sušiny alespoň 6,4 kg za den (NRC 2007).

V našem pokusu byla odstávčatům předkládána krmná dávka, která obsahovala 6,66 kg sušiny za den. Dle Meyer et al. (1991) by se měl příjem sušiny pohybovat od 1,4 - 3,9 % živé hmotnosti (Meyer et al. 1991). Průměrný příjem sušiny u koní v celé bilanci odpovídal 2,08 % živé hmotnosti. Průměrná stravitelnost sušiny za celé období bilance byla 69,54 % ± 0,09.

Pagan (1994) uvádí stravitelnost sušiny 62 % ± 4,20 %. Námi vypočtená hodnota stravitelnosti se liší o 7,54 % od udávané průměrné hodnoty. Zjištěná vyšší stravitelnost sušiny v naší bilanci může být způsobena použitím kvalitní diety pro koně.

Průměrný příjem popelovin v denní krmné dávce byl 500,27 g. Ze zjištěných hodnot byla vypočtena stravitelnost na 40,50 % ± 7,05. Pagan (1994) uvádí stravitelnost popelovin 43,4 % ± 12,7 %. Od hodnoty průměrné stravitelnosti se námi vypočtená hodnota lišila o 2,9 %.

Průměrný příjem dusíkatých látek u sledovaných koní byl za celé bilanční období 385,98 g v denní krmné dávce. Stravitelnost byla 53,98 % ± 21,48. Vzhledem k tomu, že byla vypočtena vysoká hodnota směrodatné odchylky, byl navrhnut Grubbsův test. Tento potvrdil, že v odběru č. 3 se nacházela nejvzdálenější hodnota od zbylých (14 %). Nicméně test nepotvrdil, že by se jednalo o odlehlou hodnotu, tudíž tato hodnota byla ponechána v souboru.

Pagan (1994) uvádí stravitelnost dusíkatých látek 71 % se standardní odchylkou 5,20 %. U námi sledovaných koní byla stravitelnost dusíkatých látek nižší kvůli výše zmíněné chybě v měření o 17,02 % od průměrné hodnoty.

Průměrný denní příjem neutrálně-detergentní vlákniny byl za celé bilanční období 3456,35 g. Stravitelnost NDF byla 55,34 % ± 21,91. Vzhledem k vysoké hodnotě směrodatné odchylky bylo opět navrženo provedení Grubbsova testu, který stejně jako v případě porovnání hodnot dusíkatých látek potvrdil, že se v souboru nenacházela žádná odlehlá hodnota. Pouze hodnota odběru č. 2 byla označena jako nejvzdálenější hodnota od zbylých (80,6 %). Pagan (1994) uvádí stravitelnost NDF 43,40 % se standardní odchylkou 14,50 %. Stravitelnost NDF byla v naší bilanci vyšší o 11,94 % od průměrné hodnoty. Denní příjem acido-detergentní vlákniny byl 2783,4 g průměrná stravitelnost ADF byla stanovena na 69,75 % ± 15,62.

Stejně jako u většiny ostatních živin byla zjištěna lepší stravitelnost vlákniny, než jakou uvádí Pagan (1994). Pravděpodobnou příčinou může být skutečnost, že Pagan své pokusy zakládal na kvalitních krmných dávkách z čerstvé píce nebo sena, protože v Kentucky je celoročně lepší podnebí pro pěstování kvalitních trav. Živiny získané ze zelené píce jsou o něco hůře stravitelné než živiny získané z jadrných krmiv.

Denní příjem vápníku v krmné dávce činil 29,06 g. Nutriční požadavky vápníku pro odstávčata ve věku 8 měsíců se dle NRC pohybují kolem 38 g na den. Dle doporučení NRC by měl být vápník obsažen od 0,15 do 1,5 % v sušině (NRC 2007). V našem pokusu byla odstávčatům podávána krmná dávka s obsahem vápníku 0,44 % v sušině. Průměrná stravitelnost za celé bilanční období byla vypočtena na 58,77 % ± 17,02.

Stejně jako v předchozích případech, ani u vápníku Grubbsův test nepotvrdil přítomnost odlehlých hodnot v souboru, a proto bylo dále pracováno se všemi hodnotami.

Pagan (1994) uvádí stravitelnost vápníku 44 % ± 14,3. Stravitelnost v naší bilanci byla o 14,79 % vyšší než průměrná hodnota. Lze tedy konstatovat, že krmná dávka obsahovala o 8,94 g méně vápníku, než jaký udává doporučený denní příjem. Nicméně byla vypočtena vyšší stravitelnost vápníku, než jakou udává Pagan (1994). Nejvyšší stravitelnost v našem pokusu byla stanovena při 2. odběru - 79,8 %, naopak při 3. odběru došlo k prudkému poklesu na 39,6 %. Obě tyto hodnoty byly vyhodnoceny pomocí Grubbsova testu jako vzdálené, ale nejednalo se o odlehlé hodnoty. Dále pak stravitelnost vápníku pravidelně klesala. Snižující se stravitelnosti může být dána vzrůstajícím věkem hříbat.

Průměrný denní příjem fosforu v krmné dávce byl 25,75 g. Nutriční požadavky fosforu pro odstávčata ve věku 8 měsíců se dle NRC pohybují kolem 21 g na den. Současně by měl být fosfor zastoupen v sušině od 0,15 do 0,6 % (NRC 2007). V našem pokusu obsahovala krmná dávka 0,39 % fosforu v sušině.

Průměrná stravitelnost fosforu za celé období pokusu byla stanovena na 63,92 % ± 18,19. Pro rostoucí koně NRC (2007) uvádí průměrnou stravitelnost fosforu kolem 45 %. Stravitelnost v naší bilanci byla o 18,92 % vyšší, což mohlo být způsobeno složením přijímané krmné dávky. Odstávčata byla krmena ovsem, jehož biologická dostupnost je 40 % (Oliveira et al. 2008). Dalším možným vysvětlením vyšší výsledné hodnoty stravitelnosti může být skutečnost, že odstávčata přijímala téměř ideální množství fosforu na den (asi 122,62 % z hodnoty, kterou doporučuje NRC). V případě vyššího příjmu fosforu by mohlo dojít k poklesu stravitelnosti prvku, což ve své práci potvrzuje například Warren et al. (2013). Ve své studii uvádí pokles stravitelnosti fosforu až o 18 % při navýšení přijímaného množství fosforu na 300 % z doporučované denní dávky (Warren et al. 2013).

Nejvyšší stravitelnost v našem pokusu byla zjištěna při odběru č. 2–87 %. Dále při odběru č. 3 došlo k prudkému poklesu hodnoty na 42,5 %. V případě stravitelnosti fosforu byl rovněž proveden Grubbsův test, který opět prokázal, že se v souboru nenacházela žádná odlehlá hodnota. Poté se stravitelnost fosforu pravidelně snižovala. Klesající hodnota stravitelnosti může být znovu dána vzrůstajícím věkem hříbat. Konkrétně u mladých koní je uváděna nejvyšší stravitelnost fosforu v době, kdy dosahují věku 8 měsíců (Saastamoinen et al. 2020).

V poslední řadě byl stanoven poměr vápníku a fosforu v předkládaném krmivu. Průměrná hodnota poměru činila 1,13:1 (Ca:P). Lawrence (2000) uznačuje jako optimální poměr pro rostoucí koně hodnotu 2,5:1. Tohoto poměru bohužel nebylo dosaženo, nicméně poměr těchto prvků neklesl pod minimální hranici 1:1 (Zeman et al. 2005).

Základní hypotézou této práce bylo potvrdit, zda složení krmné dávky odstávčat bude mít vliv na vylučování fosforu v trusu. Hypotéza této studie byla potvrzena. V naší bilanci byla zjištěna vysoká stravitelnost fosforu. Zjištěná hodnota byla dokonce o 18,92 % vyšší, než jakou udává NRC (2007) a to i přesto, že krmnou dávku tvořilo pouze seno a oves bez přídavku minerálního premixu. Tato skutečnost tedy podporuje tvrzení nedávno provedených studií, které dokazují, že fosfor je pro koně poměrně dostupný i ve fytátové formě a že nutriční potřebu tohoto prvku lze pokrýt i bez přídavku anorganické formy do krmné dávky.

7 Závěr

V Národním hřebčínu Kladrubech nad Labem byl proveden pokus na 16 odstavených hříbatech ve věku kolem 8 měsíců. Pomocí indikátorové metody byla sledována stravitelnost živin krmné dávky, která se skládala ze sena a ovsa. V průběhu 3 měsíců celkem proběhlo 6 odběrů vzorků trusu.

Po skončení bilance byla z odebraných krmiv a trusu analyzována sušina, popelovina, dusíkaté látky, neutrálně-detergentní a acido-detergentní vláknina, acido-detergentní lignin, písek, vápník a fosfor. Analýza probíhala v laboratoři KMVD na ČZU a ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi (VÚŽV).

Z výsledků analýz byla zjištěna stravitelnost sušiny 69,54 % ± 0,09. Tato stravitelnost byla vyšší než standardní koeficienty stavitelnosti z důvodu kvalitní krmné dávky.

Dále byla zjištěna stravitelnost popelovin 40,50 % ± 7,05 %. Tuto stravitelnost lze považovat za průměrnou.

Naopak stravitelnost dusíkatých látek byla poměrně v našem pokusu poměrně nízká. Byla vypočtena na 53,98 % ± 21,48.

Zjištěný koeficient stravitelnosti NDF 55,34 % ± 21,91 lze považovat za poměrně vysoký. Nízké koeficienty stravitelnosti NDF jsou zpravidla zjišťovány při zkrmování sena ze starých porostů.

Průměrná stravitelnost vápníku za celé bilanční období byla vypočtena na 58,79 % ± 17,02. Tato hodnota je opět vyšší než standardní koeficienty stravitelnosti.

Dále byla stanovena průměrná stravitelnost fosforu 63,92 % ± 18,19. Tato hodnota byla rovněž vyšší, než jakou udává NRC (2007). Důvodem mohla být skutečnost, že pokus byl proveden v době, kdy hříbata dosáhla věku 8 měsíců, kdy se uvádí nejvyšší stravitelnost tohoto prvku (Saastamoinen et al. 2020).

Co se týče hodnocení přijatých živin a jejich stravitelnosti, posledním ukazatelem bylo stanovení poměru přijatého vápníku a fosforu. Výsledky prokázaly, že průměrný poměr činil 1,13:1. Pro rostoucí hříbata je ovšem doporučován vyšší poměr, než jaký byl stanoven v našem pokusu. Nicméně nebyla překročena spodní doporučená hranice 1:1.

Cílem práce bylo rovněž potvrdit, zda složení krmné dávky odstávčat mělo vliv na stravitelnost a vylučování fosforu v trusu. Problematika stravitelnosti fosforu, jeho vyplavování do vnějšího prostředí či jeho případná nižší suplementací do diet koní byla již dříve v některých studiích řešena. Většina těchto studií byla až na výjimky provedena pouze na dospělých koních. Tudíž není zřejmé, zda jsou i rostoucí koně schopni trávit fosfor obdobným způsobem.

Dosud zůstává otázkou, zda nebude nutná zvýšená suplementace fosforu u kategorií koní, které vyžadují jeho vyšší příjem, jako je tomu např. u odstavených hříbat, jelikož fosfor spolu s vápníkem představují hlavní prvky pro adekvátní růst skeletu.

Lze konstatovat, že v našem pokusu byla stanovena vysoká stravitelnost fosforu, která potvrzuje výsledky výše zmiňovaných studií, tudíž hypotéza naší práce byla potvrzena.

Závěrem je třeba zdůraznit, že bude nezbytné provést další vědecké studie, které by se hlouběji dotýkaly tohoto tématu. Budoucí výzkum by se měl navíc zaměřit přímo na stanovení stravitelnosti jednotlivých frakcí fosforu, tzn. analyzovat fytátový fosfor a jeho stravitelnost nejen u odstavených hříbat, ale i u dalších kategorií koní.

Zároveň by bylo vhodné zaměřit se na analýzu rozpustné části vyloučeného fosforu v trusu, která by mohla dále přecházet do vnějšího prostředí.

8 Literatura

Alvarenga I, Aldrich C, Kohles M. 2017. The Effect of Feed Form on Diet Digestibility and Cecal Parameters in Rabbits. Animals **7**: 1-12.

Amanzadeh J, Reilly RF. 2006. Hypophosphatemia: an evidence-based approach to its clinical consequences and management. Nat Clin Pract Nephrol **2**: 136–48.

Ashley K, Cordell D, Mavinic D. 2011. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. Chemosphere **84**: 737-746.

Benešová K, Běláková S, Mikulíková R, Svoboda Z. 2013. Survey of the analytical methods for the phytic acid determination. Kvasny Prumysl **59**: 127-133.

Bergwitz C & Jüppner H. 2010. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. Annual Review of Medicine **61**: 91-104.

Biber J, Hernando N, Forster I, MURER H. 2009. Regulation of phosphate transport in proximal tubules. Pflügers Archiv – European Journal of Physiology **458**: 39-52.

Bomans E, Fransen K, Gobin A, Mertens J, Michiels P, Vandendriessche H, Vogels N. 2005. Addressing phosphorus related problems in farm practice. Final report to the European Commission. Available at: http://ec.europa.eu/environment/natres/pdf/phosphorus/AgriPhosphorusReport%final.pdf

Brady NC, Weil RR. 2015. Nature and Properties of Soils, The, 15th Edition. Prentice – Hall Inc., New Jersey, USA. ISBN: 978-0133254488.

Bregitzer P, Raboy V. 2006. Effects of Four Independent Low-Phytate Mutations on Barley Agronomic Performance. Crop Science **46**: 1318-1322.

Breidenbach A, Révész B, Harmeyer J. 1998. Effects of high doses of vitamin D on calcium and phosphate homeostasis in horses: a pilot study. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. **80**: 101–107.

Cehak A, Wilkens MR, Guschlbauer M, Mrochen N, Schröder B, Feige K, Breves G. 2012. In vitro studies on intestinal calcium and phosphate transport in horses. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **161**: 259-264.

Cichorska B, Komosa M, Nogowsk L, Maćkowiak P, Józefia D. 2014. Significance of nutrient digestibility in horse nutrition – a review. Annals of Animal Science **14**: 779-797.

Cymbaluk N, Christison G, Leach D. 1989. Nutrient utilization by limit-and ad libitum-fed growing horses. Journal of Animal Science **67**: 414-425.

Cymbaluk NF. 1990. Cold housing effects on growth and nutrient demand of young horses. Journal of Animal Science **68**: 3152-3162.

Davies Z. 2009. Introduction to horse nutrition. Wiley-Blackwell. Chichester. ISBN: 978-1-405-16998-1.

de Marco M, Miraglia N, Peiretti PG, Bergero D. 2012. Apparent digestibility of wheat bran and extruded flax in horses determined from the total collection of feces and acid-insoluble ash as an internal marker. Animal **6**: 227-231.

Dorozhkin SV. 2016. Calcium orthophosphates ($CaPO_4$): occurrence and properties. Progress in Biomaterials **5**: 9-70.

Dougherty WJ, Nicholls PJ, Milham PJ, Havilah EJ, Lawrie RA. 2008. Phosphorus Fertilizer and Grazing Management Effects on Phosphorus in Runoff from Dairy Pastures. J. Environ. Qual. **37**: 417–428.

Duffková R, Mühlbachová G, Fučík P, Zajíček A, Hejduk T, Káš M, Diviš P, Skála J, Štyx J. 2016. Metodický postup pro snížení rizika vyplavení fosforu ze zemědělských půd do povrchových a podzemních vod pomocí agrotechnických opatření s využitím metody P-indexu. VÚMOP, Praha.

Elzinga S, Nielsen BD, Schott HC, Rapson J, Robinson CI, McCutcheon J, Harris PA, Geor R. 2014. Comparison of nutrient digestibilitys between adult and aged horses. J. Equine Vet. Sci. **34**: 1164–1169.

EPMA. 2009. The economic and social contribution of horseracing in Europe. EPMA, Brussels. Avaible from: http://www.parimutuel-europe.org/Download/2009-09/EPMA_Economic_impact_of_horse_racing_03Sept09.pdf (accessed February 2021).

Fowler A, Hansen T, Strasinger L, Davis B, Harlow BE, Lawrence L. 2015. Phosphorus digestibility and phytate degredation by yearlings and mature horse. J. Anim. Sci. **93**: 5735–5742.

Fowler A, Lewrence L. 2019. Emerging Young Scholar: Impact of phosphorus recycling on the equine phosphorus requirement. Journal of Animal Science **97**: 33-34.

Frape D. 2010. Equine nutrition and feeding. Blackwell publishing, Oxford. ISBN: 978-1-405-19546-1.

Froelich PN. 1988. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: A primer on the phosphate buffer mechanism. Limnology and Oceanography **33**: 649-668.

Furtado CE, Tosi H, Vitti DMSS. 2000. Endogenous loss and true absorption of phosphorus in the diet for growing horses. Pesquisa Agropecuaria Brasileira **35**: 1023-1028.

Hainze TMM, Muntifering RB, Wood CW, McCall CA, Wood BH. 2004. Faecal phosphorus excretion from horses fed typical diets with and without added phytase. Animal Feed Science and Technology **117**: 265-279.

Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO. 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO, Paris, France. ISBN: 92-3-103948-2.

Harlow BE, Lawrence LM, Hayes SH, Crum A, Flythe MD, Loh G. 2016. Effect of Dietary Starch Source and Concentration on Equine Fecal Microbiota. PLOS ONE **11**: 1-21.

Heathwaite AL, Haygarth PM, Matthews R, Preedy N, Butler P. 2005. Evaluating colloidal phosphorus delivery to surface waters from diffuse agricultural sources. Journal of Environmental Quality **34**: 287–298.

Heuzé V, Tran G, Boval M, Noblet J, Renaudeau D, Lessire M, Lebas F. 2016. Alfalfa (*Medicago sativa*). Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. Avaible from: https://www.feedipedia.org/node/275 (accessed December 2020).

Jelínek P, Koudela K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno. ISBN 80–7157–644–1.

Jüppner H. 2011. Phosphate and FGF-23. Kidney International **79**: 24-27.

Kamr AM, Dembek KA, Hildreth BE, Morresey PR, Rathgeber RA, Burns TA, Zaghawa AA, Toribio RE. 2018. The FGF-23/klotho axis and its relationship with phosphorus, calcium, vitamin D, PTH, aldosterone, severity of disease, and outcome in hospitalised foals. Equine Veterinary Journal **50**: 739-746.

Khadka D. 2015. Basic Principles of the Different Instruments Used in Soil Science Laboratory. Pages 32-45 in Adhikary BH editor. A handbook of soil science. Soil. Science Division (SSD), NARC, Khumaltar, Lalitpur, Nepal. ISBN: 2392-4942.

Knowlton KF, Radcliffe JS, Novak CL, Emmerson DA. 2004. Animal management to reduce phosphorus losses to the environment. J. Anim. Sci. **82**: 173–195.

Kohnke JR, Kelleher F, Trevor-Jones P. 1999. Feeding Horses in Australia: A Guide for Horse Owners and Managers: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Rural Industries Research and Development Corporation, Hawkesbury. ISBN: 9780642578839.

Koukolová V, Homolka P, Kudrna V. 2010. Vliv strukturálních sacharidů na bachorovou fermentaci, zdraví zvířat a kvalitu mléka. VÚŽV, Praha Uhříněves. ISBN: 978-80-7403-066-6.

Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K. 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry **120**: 945-959.

Lacitignola L, de Luca P, Santovito R, di Comite MS, Crovace A. 2018. Nutritional secondary hyperparathyroidism in two ponies. Open Veterinary Journal **8**: 149-153.

Lavin TE, Nielsen BD, Zingsheim JN, O'Connor-Robison CI, Link JE, Hill GM, Shelton J. 2013. Effects of phytase supplementation in mature horses fed alfalfa hay and pelleted concentrate diets. Journal of Animal Science **91**: 1719–1727.

Lawrence LA. 2000. Nutrient requirements and balancing ratios for horses. Animal and Poultry Sciences **2**: 406-473.

Lopes MAF, Pfeiffer CJ. 2000. Functional morphology of the equine pelvic flexure and its role in disease. A review. Histol Histopathol **15**: 983-991.

Manghat P, Sodi R, Swaminathan R. 2014. Phosphate homeostasis and disorders. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine **51**: 631-656.

Marais J. 2000. Use of markers. Pages 255-520 in D´Mello JPF, editor. Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Oxford, UK. ISBN: 9780851993782.

Martin-Rosset W, Martin L. 2015. Nutritional principles for horses. Pages 23-96 in Martin-Rosset W, editor. Equine Nutrition: INRA Nutrient Requirements, Recommended Allowances and Feed Tables. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. ISBN: 978-90-8686-237-5.

Matsui T, Murakami Y, Yano H, Fujikawa H, Osawa T, Asai Y. 1999. Phytate and phosphorus movements in the digestive tract of horses. Equine Veterinary Journal **31**: 505-507.

McGill SM. 2012. 'Peak' phosphorus? The implications of phosphate scarcity for sustainable investors. Journal of Sustainable Finance & Investment. **2**: 222–239.

Mendoza FJ, Toribio RE, Perez-Ecija A. 2017. Nutritional secondary hyperparathyroidism in equids: Overview and new insights. Equine Veterinary Education **29**: 558-563.

Meyer H, Keinzle E, Zmija G. 1991. Feeding in racing stables. Pferdeheilkunde **7**: 365–370.

Meyer H, Coenen M. 2003. Krmení koní: současné trendy ve výživě. Ikar, Praha. ISBN: 9788024902647.

Ministerstvo zemědělství České republiky. 2017. Vyhláška č. 335 ze dne 16.10.2017, kterou se mění vyhláška č. 275/1998 Sb., o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění pozdějších předpisů. Page 3578 in Sbírka zákonů České republiky, 2017 částka 115/2017. Česká republika.

Ministerstvo zemědělství České republiky. 2021. Statistika chovu koní v ČR v letech 1921–2020. Ministerstvo zemědělství: ©2021 [cit. 26.4.2021]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/zivocisna-vyroba/zivocisne-komodity/kone/.

Mok ChH, Urschel KL. 2020. Invited Review — Amino acid requirements in horses. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences **33**: 679-695.

Morris-Stoker LB, Baker LA, Pipkin JL, Bachman RC, Haliburton JC. 2001. The effect of supplemental phytase on nutrient digestibility in mature horses. Pages 48-52 in: Proc. 17th Equine Nutr. Physiol. Symp., Lexington, Kentucky.

Morse D, Head HH, Wilcox CJ. 1992. Disappearance of phosphorus in phytate from concentrates in vitro and from rations fed to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. **75**: 1979–1986.

Muscher A, Hattendorf J, Pfeffer E, Breves G, Huber K. 2008. Hormonal regulation of phosphate homeostasis in goats during transition to rumination. Journal of Comparative Physiology B **178**: 585-596.

Muscher-Banse AS, Marholt L, Eigendorf N, Wilkens MR, Schröder B, Breves G, Cehak A. 2017. Segmental diversity of phosphate transport along the intestinal axis in horses1. Journal of Animal Science **95**: 165-172.

NRC. 2007. The Nutrient Requirements of Horses. National Academy Press, Washington DC. ISBN: 0-309-66096-3.

Oliveira AAMA, Furtado CE, Vitti DMSS, Resende FD, Filho SLSC, Tosi H, Winkler B. 2008. Phosphorus bioavailability in diets for growing horses. Livestock Science **116**: 1-3.

Ögren G, Holtenius K, Jansson A. 2013. Phosphorus balance and fecal losses in growing Standardbred horses in training fed forage-only diets1. Journal of Animal Science **91**: 2749-2755.

Pagan JD. 1994. Nutrient digestibility in horses. Pages 127-136 in Pagan JD, editor. Proc. KER Short Course: Feeding the Performance Horse, Lexington KY.

Pagan JD. 1998. Nutrient Digestibility in Horses. Pages 77-83 in Pagan JD, editor. Advances in Equine Nutrition. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Pagan JD. 2012. Nutrient Digestibility in Horses Using Numerous Diets. KER, Kentucky. Avaible from https://ker.com/equinews/nutrient-digestibility-horses-using-numerous-diets-2/?highlight=digestibility (accessed February 2021).

Parvage MM, Kirchmann H, Kynkäänniemi P, Ulén B. 2011. Impact of horse grazing and feeding on phosphorus concentrations in soil and drainage water. Soil Use Manag. **27**: 367–375.

Parvage MM, Ulén B, Kirchmann H. 2013. A survey of soil phosphorus (P) and nitrogen (N) in Swedish horse paddocks. Agric. Ecos. Environ. **178**: 1–9.

Parvage MM, Ulén B, Kirchmann H. 2015. Are horse paddocks threatening water quality through excess loading of nutrients? Journal of Environmental Management **147**: 306-313.

Raboy V., Gerbasi PF, Young KA, Stoneberg SD, Pickett SG, Bauman AT, Murthy PPN, Sheridan WF, Ertl DS. 2000. Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. Plant Physiology **124**: 355-368.

Ravindran V. 2016. Feed-induced specific ileal endogenous amino acid losses: Measurement and significance in the protein nutrition of monogastric animals. Animal Feed Science and Technology **221**: 304-313.

Reece WO. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada, Praha. ISBN: 978-80-247-3282-4.

Rourke KM, Kohn CW, Levine AL, Rosol TJ, Toribio RE. 2009. Rapid calcitonin response to experimental hypercalcemia in healthy horses. Domest Anim Endocrinol **36**:197–201.

Saastamoinen M, Särkijärvi S, Valtonen E. 2020. The Effect of Diet Composition on the Digestibility and Fecal Excretion of Phosphorus in Horses: A Potential Risk of P Leaching? Animals **10**: 1-14.

Sales J. 2012. A review on the use of indigestible dietary markers to determine total tract apparent digestibility of nutrients in horses. Animal Feed Science and Technology **174**: 119-130.

Sanyal SK, de Datta SK. 1991. Chemistry of phosphorus transformations in Soil. Advances in Soil Science. Springer, New York. ISBN: 978-1-4612-3144-8.

Selle PH, Ravindran V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. Livestock Science **133**: 99–122.

Shor R, Halabe A, Rishver S, et al. 2006. Severe hypophosphatemia in sepsis as a mortality predictor. Ann Clin Lab Sci **36**: 67–72.

Schryver H, Hintz H, Craig P. 1971. Phosphorus metabolism in ponies fed varying levels of phosphorus. Journal of Nutrition **101**: 1257-1263.

Schryver H, Hintz H, Craig P, Hogue D, Lowe J. 1972. Site of phosphorus absorption from the intestine of the horse. Journal of Nutrition **102**: 143-147.

Smith FW. 2002. The phosphorus uptake mechanism. Plant and Soil. **245**:105-114.

Stevenson FJ, Cole MA. 1999. Cycles of Soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. ISBN: 978-0-471-32071-5.

Stockham SL. 1995. Interpretation of Equine Serum Biochemical Profile Results. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **11**: 391-414.

Teper I. 2000. ANKOM 220: nový přístup ke stanovení vlákniny. Krmivářství **7**: 20-21.

Tomášek M. 1995. Atlas půd České republiky. Český geologický ústav, Praha. ISBN: 80-7075-198-3.

Toribio RE. 2011. Disorders of Calcium and Phosphate Metabolism in Horses. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **27**: 129-147.

Toribio RE. 2015. Phosphorus homeostasis and derangements. Pages 88-100 in Fielding CL & Magdesian KG, editors. Equine Fluid Therapy. John Wiley & Sons, Hoboken. ISBN: 978-0-470-96138-4.

Troesch B, Jing H, Laillou A, Fowler A. 2013. Absorption Studies Show that Phytase from Aspergillus niger Significantly Increases Iron and Zinc Bioavailability from Phytate-Rich Foods. Food and Nutrition Bulletin **34**: 90-101.

Uusi-Kämppä J, Närvänen A, Kaseva J, Jansson H. 2012. Phosphorus and faecal bacteria in runoff from horse paddocks and their mitigation by the addition of P-sorbing materials. Agr. Food Sci. **21**: 247–259.

ÚKZÚZ. 2018. Výsledky agrochemického zkoušení zemědělských půd za období 2012-2017. ÚKZÚZ, Brno.

Van Doorn D, Everts H, Wouterse H, Beynen AC. 2004. The apparent digestibility of phytate phosphorus and the influence of supplemental phytase in horses. J. Anim. Sci. **82**: 1756–1763.

Van Doorn DA, Schaafstra FJ, Wouterse H, Everts H, Estepa JC, Aguilera-Tejero E, Beynen A.C. 2014. Repeated measurements of P retention in ponies fed rations with various Ca: P ratios. J. Anim. Sci. **92**: 4981–4990.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptions by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist. **157**: 423-447.

Vervuert I, Stanik K, Coenen M. 2006. Effects of different levels of calcium and phosphorus intake on calcium homeostasis in exercising horses. Equine Veterinary Journal **38**: 659-663.

Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC. 2007. Phosphate transporters: A tale of two solute carrier families. Am. J. Physiol. Renal Physiol. **293**: 643–654.

Warren LK, Weir JM, Harris PA, Kivipelto J. 2013. Effect of total phosphorus and phytate-phosphorus intake on phosphorus digestibility in horses. Journal of Equine Veterinary Science **33**: 352.

Westendorf ML, Williams CA. 2015. Effects of Excess Dietary Phosphorus on Fecal Phosphorus Excretion and Water Extractable Phosphorus in Horses. Journal of Equine Veterinary Science **35**: 495-498.

Wilson JA, Babb CW, Prince RH. 2006. Protein and mineral digestibility of three pelleted equine feeds and subsequent nitrogen and phosphorus waste excretion. Prof. Anim. Sci. **22**: 341–345.

Zeman L, Šajdler P, Homolka P, Kudrna V. 2005. Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro koně. MZLU, Brno. ISBN: 80-7157-855-X.

Zhao X, Müller CE. 2016. Macro – and micromineral content of wrapped forages for horses. Grass and Forage Science **71**: 195-207.

Zimmermann B, Lantzsch HJ, Mosenthin R, Schoner FJ, Biesalski HK, Drochner W. 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. J. Sci. Food Agric. **82**: 1298–1304.

9 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Transcelulární a paraceluární přenos fosfátů z lumen střeva (převzato: Manghat et al. 2014). 17
Obrázek 2: Reabsorpce fosfátů v proximálních tubulech ledvin (převzato: Manghat et al. 2014) 17
Obrázek 3: Otok maxily jako následek sekundární nutriční hyperparathyreózy (převzato: Stewart et al. 2010). 18
Obrázek 4: Rozklad fytátu pomocí enzymu fytázy (převzato: Troesch et al. 2013). 23
Obrázek 5: Uznávaný model pro odhad skutečné stravitelnosti fosforu a jeho nutriční potřeby na základě pevně dané hodnoty ztrát endogenního fosforu, tj. 10 mg/kg tělesné hmotnosti a skutečné stravitelnosti fosforu 35 % (převzato: NRC 2007) 30
Obrázek 6: Střižný mlýn (vlastní zdroj) 39
Obrázek 7: Schematický diagram atomové absorpční spektrometrie (převzato: Khadka 2015) 43

Tabulka 1: Vybrané faktory ovlivňující reabsorpci Pi v ledvinách (převzato: Toribio et al. 2015). 21
Tabulka 2: Nutriční potřeba vápníku a fosforu pro různé věkové kategorie koní (převzato: NRC 2007) 24
Tabulka 3: Harmonogram odběrů vzorků trusu 37
Tabulka 4: Průměrný denní příjem živin v původní hmotě krmiva [g/kg] 44
Tabulka 5: Průměrná stravitelnost živin u odstávčat během jednotlivých odběrů 44
Tabulka 6: Průměrná stravitelnost živin u odstávčat za celé období pokusu 45

Graf 1: Průměrná stravitelnost živin v průběhu bilance 46
Graf 2: Stravitelnost fosforu v průběhu bilance 46

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

$1,25\text{-}(OH)_2D_3$	1,25-dihydroxycholekalciferol
AAS	Atomový absorpční spektrometr
ADF	Acido-detergentní vláknina
ADL	Acido-detergentní lignin
ADP	Adenosintrifosfát
AIA	Acid-insoluble ash – Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové
AMP	Adenosinmonofosfát
ANOVA	Analysis of variance – Analýza rozptylu
ATP	Adenosintrifosfát
Ca	Vápník
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CT	Kalcitonin
ČZU	Česká zemědělská univerzita
DF	Detergent fibre – Detergentní vláknina
EPC	Equilibrium phosphate concentration – Rovnovážná koncentrace fosfátu
EU	Evropská unie
FBT	Filter Bag Technology – Technologie filtračních sáčků
FGF-23	Fibroblast growth factor 23 - Fibroblastový růstový faktor 23
GI	Gastrointestinální
IGF-1	Insulin-like growth factor-1 – Insulinu podobný růstový faktor-1
KCHHZ	Katedra chovu hospodářských zvířat
KMVD	Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky
N	Dusík
NDF	Neutrálně-detergentní vláknina
NSH	Nutritional secondary hyperparathyroidism - Sekundární nutriční hyperparathyreóza
P	Fosfor
Pi	Anorganická forma fosforu
PTH	Parathormon
SLC	Solute carrier – Skupina transportérů rozpuštěných látek
VÚŽV	Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.

11 Samostatné přílohy

Příloha I. - Koně zařazení do experimentu:

Hříbě	Datum narození
Sacramoso Ericera XXI - 4	16.02.2020
Sacramoso Elota XXI – 5	21.02.2020
Sacramoso Equileta XXI - 6	23.02.2020
Rudolfo Engarra VIII - 2	02.03.2020
Rudolfo Equila V–78	05.03.2020
Rudolfo Ebrieta V–81	18.04.2020
Generalissimus Sadera XLVIII - 25	18.04.2020
Generalissimus Amalthea IV – 3	26.04.2020
Generalissimus Enrica II – 10	27.04.2020
Rudolfo Erca VIII – 4	28.04.2020
Favory Amiqua XXXII – 3	29.04.2020
Generalissimus Ripolla IV – 4	29.04.2020
Rudolfo Compostella VII - 5	01.05.2020
Sacramoso Rolica XI – 58	16.05.2020
Generalissimus Elcanta IV – 5	18.05.2020
Sacramoso Corelia XI – 60	10.06.2020

Příloha II. – Evidence odebraných vzorků trusu odstávčat v Kladrubech nad Labem

Číslo odběru	Datum odběru	Vzorek 1	Vzorek 2 – kontrola
1. odběr	21.12.2020	Souhrnný vzorek 1,1	Souhrnný vzorek 2,1
2. odběr	4.1.2021	Souhrnný vzorek 1,2	Souhrnný vzorek 2,2
3. odběr	18.1.2021	Souhrnný vzorek 1,3	Souhrnný vzorek 2,3
4. odběr	31.1.2021	Souhrnný vzorek 1,4	Souhrnný vzorek 2,4
5. odběr	15.2.2021	Souhrnný vzorek 1,5	Souhrnný vzorek 2,5
6. odběr	1.3.2021	Souhrnný vzorek 1,6	Souhrnný vzorek 2,6

Příloha III. – Laboratorní rozbor sena

Ing. Josef Němec
Chemická a mikrobiologická laboratoř
U Ovčína 49, 397 01 Písek
Telefon: 608 029 776, e-mail: posta@laborator-pisek.cz
Zkušební laboratoř č.1142, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018
L 1142

Zákazník: **Národní hřebčín Kladruby nad Labem**
Kladruby nad Labem 1
533 14 Kladruby nad Labem

Protokol o zkoušce č. 12843/2020

Číslo vzorku: 15025
Místo odběru**: Kladruby nad Labem
Upřesnění místa odběru**:
Odběr provedl:** zákazník, 11.11.2020,
Způsob odběru:
Doprava vzorku: Laboratoř
Klasifikace vzorku: Krmivo, Seno

Datum příjmu: 11.11.2020
Datum zahájení analýz: 11.11.2020
Datum dokončení: 9.12.2020

Název zkoušky	Jednotky	Výsledek	Limity	Nejistota měření	Metoda
Sušina	g/kg vzorku	827,1		±0,6 %	SOP 15 (ČSN 46 7092-3)
Sodík (Na)	g/kg vzorku	0,61			IM 30 AAS *
Vápník (Ca)	g/kg vzorku	4,08		±12 %	IM 31 AAS *
Draslík (K)	g/kg vzorku	18,21			IM 30 AAS *
Hořčík (Mg)	g/kg vzorku	1,46			IM 32 AAS *
Chlor v krmivu	g/kg vzorku	2,69			IM 60 (ČSN 467092-18) *
Fosfor (P)	g/kg vzorku	3,10		±19%	SOP 11 (Javorský,Krečmar: Chem. rozb. v zem.lab., 1987)
Mangan (Mn)	mg/kg suš.	57,97			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Měď (Cu)	mg/kg suš.	4,3		±7 %	SOP 43 (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ)
Selen (Se)	mg/kg suš.	0,024			GF AAS *
Železo (Fe)	mg/kg suš.	105,2			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Síra (S)	g/kg vzorku	1,37			(dle ÚKZÚZ) *
Zinek (Zn)	mg/kg suš.	15,6		±22%	SOP 43 (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ)
Kobalt (Co)	mg/kg suš.	<0,1			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Vitamín E, alfa-Tokoferol	mg/kg vzork	41,8		±27 %	SOP II/A HPLC/UV (NK č. 152/2009, příloha IV postup A,B) +
Vitamín A	m.j./kg vzor	<1000			SOP II/A HPLC/UV (NK č. 152/2009, příloha IV postup A,B) +
Analýza NIR		provedena			(NIR (metodika laboratoře)) *
Jód	mg/kg vzork	<5,00			SOP$_{D00}$02$_{002}$ (US EPA 200.8, ČSN EN ISO 17294-2) +

* mimo rozsah akreditace dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.
\+ akreditovaná zkouška provedená v jiné akreditované laboratoři.
** Informace dodané zákazníkem. Výsledky se vztahují ke vzorku tak jak byl přijat.

Příloha IV. – Laboratorní rozbor ovsa

Ing. Josef Němec
Chemická a mikrobiologická laboratoř
U Ovčína 49, 397 01 Písek
Telefon: 608 029 776, e-mail: posta@laborator-pisek.cz
Zkušební laboratoř č.1142, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018
L 1142

Zákazník: **Národní hřebčín Kladruby nad Labem**
Kladruby nad Labem 1
533 14 Kladruby nad Labem

Protokol o zkoušce č. 12844/2020

Číslo vzorku: 15026
Místo odběru**: Kladruby nad Labem
Upřesnění místa odběru**:
Odběr provedl:** zákazník, 11.11.2020,
Způsob odběru:
Doprava vzorku: Laboratoř
Klasifikace vzorku: Krmivo, Mačkaný oves

Datum příjmu: 11.11.2020
Datum zahájení analýz: 11.11.2020
Datum dokončení: 9.12.2020

Název zkoušky	Jednotky	Výsledek	Limity	Nejistota měření	Metoda
Sušina	g/kg vzorku	870,4		±0,6 %	SOP 15 (ČSN 46 7092-3)
Sodík (Na)	g/kg vzorku	0,1			IM 30 AAS *
Vápník (Ca)	g/kg vzorku	0,50		±12 %	IM 31 AAS *
Draslík (K)	g/kg vzorku	7,42			IM 30 AAS *
Hořčík (Mg)	g/kg vzorku	1,20			IM 32 AAS *
Chlor v krmivu	g/kg vzorku	0,05			IM 60 (ČSN 467092-18) *
Fosfor (P)	g/kg vzorku	4,05		±19%	SOP 11 (Javorský,Krečmar: Chem. rozb. v zem.lab., 1987)
Mangan (Mn)	mg/kg suš.	40,8			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Měď (Cu)	mg/kg suš.	5,3		±7 %	SOP 43 (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ)
Selen (Se)	mg/kg suš.	0,09			GF AAS *
Železo (Fe)	mg/kg suš.	155,5			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Síra (S)	g/kg vzorku	1,33			(dle ÚKZÚZ) *
Zinek (Zn)	mg/kg suš.	33,6		±22%	SOP 43 (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ)
Kobalt (Co)	mg/kg suš.	0,82			AAS (ČSN EN 16179, ČSN ISO 8288, JPP UKZUZ) *
Vitamín E, alfa-Tokoferol	mg/kg vzork	23		±27 %	SOP II/A HPLC/UV (NK č. 152/2009, příloha IV postup A,B) +
Vitamín A	m.j./kg vzor	<1000			SOP II/A HPLC/UV (NK č. 152/2009, příloha IV postup A,B) +
Analýza NIR		provedena			(NIR (metodika laboratoře)) *
Jód	mg/kg vzork	<5,00			SOP$_{D06}$02$_{002}$ (US EPA 200.8, ČSN EN ISO 17294-2) +

* mimo rozsah akreditace dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.
+ akreditovaná zkouška provedená v jiné akreditované laboratoři.
** Informace dodané zákazníkem. Výsledky se vztahují ke vzorku tak jak byl přijat.

Příloha V. – Laboratorní rozbor půdy na pastvinách v Selmicích

Ing. Josef Němec
Chemická a mikrobiologická laboratoř
U Ovčína 49, 397 01 Písek
Telefon: 608 029 776, e-mail: posta@laborator-pisek.cz
Zkušební laboratoř č.1142, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018
L 1142

Zákazník: **Národní hřebčín Kladruby nad Labem**
Kladruby nad Labem 1
533 14 Kladruby nad Labem

Protokol o zkoušce č. 12848/2020

Číslo vzorku: 15031
Místo odběru**: Selmice
Upřesnění místa odběru**:
Odběr provedl:** zákazník, 10.11.2020,
Způsob odběru:
Doprava vzorku: Laboratoř
Klasifikace vzorku: Půda, pastvina

Datum příjmu: 11.11.2020
Datum zahájení analýz: 11.11.2020
Datum dokončení: 26.11.2020

Název zkoušky	Jednotky	Výsledek	Limity	Nejistota měření	Metoda
Vápník (Ca)	mg/kg suš.	1708		±12 %	IM 31 AAS *
Draslík (K)	mg/kg suš.	68,6			IM 30 AAS *
Hořčík (Mg)	mg/kg suš.	47,8			IM 32 AAS *
Fosfor (P)	mg/kg suš.	57,1		±19%	SOP 11 (Javorský,Krečmar: Chem. rozb. v zem.lab., 1987)
Dusík anorganický	mg/kg suš.	16,76			dle ÚKZÚZ *
pH/$CaCl_2$		6,17			(ČSN 46 7092-42) *

* mimo rozsah akreditace dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.
** Informace dodané zákazníkem. Výsledky se vztahují ke vzorku tak jak byl přijat.

Výsledky zkoušek se týkají pouze zkoušených předmětů. Bez písemného souhlasu laboratoře může být protokol reprodukován pouze celý. Pokud jsou uvedeny nejistoty měření tak se netýkají hodnot menších než mez stanovitelnosti a nezahrnují nejistotu vzorkování. Výsledky zkoušek jsou uváděny s nejistotou měření vyjádřenou jako rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření k=2 (pro hladinu významnosti 95%).

Není-li uvedeno jinak, provádí se zkoušky na adrese laboratoře uvedené výše, vyjma zkoušek prováděných na místě při odběru vzorku.

Písek, 9.12.2020

Zkušební laboratoř akreditovaná ČIA č. 1142 – Ing. Josef Němec Písek

Ing. Josef Němec
vedoucí laboratoře