

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv přídatku biocharu do krmné dávky koní na složení
fekální bakteriální komunity**

Diplomová práce

**Bc. Barbora Rokosová
Výživa zvířat**

Ing. Miroslav Joch, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv přídatku biocharu do krmné dávky koní na složení fekální bakteriální komunity" 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 14.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavu Jochovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení diplomové práce. Ing. Marianě Vadroňové a Ing. Denise Tiché za přátelský přístup, ochotu a podnětné rady při zpracovávání práce a dále svým blízkým za podporu nejen v průběhu psaní diplomové práce, ale i celého předchozího studia.

Vliv přídatku biocharu do krmné dávky koní na složení fekální bakteriální komunity

Souhrn

Bakteriální komunita je nejhojnější a nejdůležitější složkou střevní mikrobiální komunity koní. Mikrobiální komunita (bakterie, prvoci, houby, archea, kvasinky) je stěžejní pro využití živin i udržení zdraví trávicí soustavy. Symbiotické organismy ve střevní mikrobiotě tlustého střeva napomáhají vstřebávání živin, syntéze vitaminů skupiny B a zejména jsou zodpovědné za mikrobiální fermentaci vlákniny. Fermentací vlákniny vznikají těkavé mastné kyseliny, které jsou pro koně významným zdrojem energie. Koně jsou velmi náchylní k narušení střevní mikrobiální komunity, proto jsou ověřovány různé krmné strategie, které by vedly k rozvoji robustní mikrobiální komunity a podpoře zdraví trávicí soustavy. Jednou z těchto strategií může být využití biocharu, uhlíkaté látky podobné aktivnímu uhlí, v krmných dávkách koní.

Cílem práce bylo ověřit účinky podávání biocharu na složení fekální bakteriální komunity koní. Předpokládali jsme, že biochar zvýší zastoupení prospěšných (např. celulolytických) a sníží zastoupení patogenní bakterií.

Do pokusu bylo vybráno 8 dospělých teplokrevných koní (6 klisen a 2 valaši o stáří 12.1 ± 5.3 roky a tělesné hmotnosti 613.8 ± 39.3 kg). Koně byli použiti v křížovém designu experimentu sestávajícím ze dvou etap, která každá trvala 15 dní. Krmné dávky byly: 1. kontrolní, základní krmná dávka skládající se z lučního sena a mačkaného ječmene (poměr sušiny 80:20), a 2. biochar, základní krmná dávka suplementovaná 10 g biocharu na 1 kg sušiny krmné dávky. Od koní byly po přivyknutí na krmnou dávku sbírány výkaly v průběhu 4 dní v každé etapě experimentu, ze společného vzorku výkalů za celé dané období byla provedena analýza fekálního mikrobiomu.

Po vyhodnocení pokusu nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) mezi složením fekální bakteriální komunity koní s krmnou dávkou suplementovanou biocharem a skupinou koní s kontrolní krmnou dávkou.

Naše výsledky naznačují, že podávání biocharu neovlivňuje složení bakteriální komunity. Biochar tedy nemá příznivý ani negativní vliv na složení bakteriální komunity a může tak být bez obav podáván koním s cílem využít jeho jiné pozitivní účinky na trávicí soustavu (úprava pH, vychytávání toxinů).

Klíčová slova: kůň, biochar, bakterie, sekvenování

Effect of biochar supplementation of horse diet on the composition of fecal bacterial community

Summary

The bacterial community is the most abundant and important component of horse's intestinal microbial community. The microbial community (bacteria, protozoa, fungi, archaea, yeast) is crucial for the use of nutrients and maintaining the health of the digestive system. Symbiotic organisms in the intestinal microbiota of the large intestine help the absorption of nutrients, the synthesis of B vitamins and are especially responsible for the microbial fermentation of fiber. Fermentation of fiber produces volatile fatty acids, which are a source of energy for horses. Horses are very prone to disrupt the intestinal microbial community, so various feeding strategies are being tested, which have led to the development of a robust microbial community and the promotion of digestive health. One of these strategies may be the use of biochar, a carbonaceous substance similar to activated carbon, in horse feed rations.

The aim of the work was to verify the effects of biochar administration on the composition of the faecal bacterial community of horses. We assumed that biochar will increase the proportion of beneficial (e.g. cellulolytic) and reduce the proportion of pathogenic bacteria.

Eight Warmblood horses (mean \pm SD; 613.8 \pm 39.3 kg of body weight, BW) were chosen for the experiment. Horses were used in a crossover design consisting from two 15-day periods. Treatment were (1) Control, basal diet consisted of meadow hay and crushed barley (80:20 on dry matter (DM) basis), and (2) Biochar, basal diet supplemented with 10 g of biochar/kg of diet DM. Faeces were collected from the horses for the 4 days period at each stage of the experiment after acclimatization to the feed ration, and fecal microbiome analysis was performed from a overall faecal sample from the whole period.

After evaluation of the experiment, no statistically significant difference ($p > 0.05$) was observed between the composition of the faecal bacterial community of horses with a feed dose supplemented with biochar and a group of horses with a control feed dose.

Our results suggest that biochar administration does not affect the composition of the bacterial community. Thus, Biochar has no positive or negative effect on the composition of the bacterial community and can be safely feeded to horses in order to take advantage of its other positive effects on the digestive system (pH adjustment, toxin uptake).

Keywords: horse, biochar, bacteria, sequencing

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
2.1 Cíl práce.....	10
2.2 Hypotézy	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Trávicí trakt a střevní mikrobiota koní	11
3.1.1 Specifika trávení u koní.....	11
3.1.1.1 Onemocnění koní spojená s trávením	14
3.1.2 Mikroorganismy trávicího traktu koní	22
3.1.2.1 Metody zjišťování složení střevní mikrobioty u koní	23
3.1.2.2 Složení střevní komunity u koní.....	24
3.1.2.3 Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty	27
3.2 Biochar	28
3.2.1 Pyrogenní uhlíkaté materiály.....	29
3.2.1.1 Biochar	30
3.2.1.2 Dřevěné uhlí (charcoal).....	30
3.2.1.3 Aktivní uhlí	30
3.2.2 Výroba biocharu	31
3.2.2.1 Vstupní suroviny	31
3.2.2.2 Pyrolýza.....	32
3.2.2.3 Aktivace	33
3.2.3 Vlastnosti biocharu	34
3.2.3.1 Adsorpce	35
3.2.3.2 Redoxní aktivita	36
3.2.4 Využití biocharu v zemědělství	36
3.2.5 Využití biocharu ve výživě zvířat.....	37
3.2.5.1 Použití ve výživě zvířat	38
3.2.5.2 Použití biocharu u koní	41
4 Metodika.....	42
4.1 Biochar	42
4.2 Zvířata a design experimentu	43
4.3 Krmná dávka.....	44
4.4 Sběr vzorků výkalů a jejich analýza.....	44

4.5	Analýza mikrobiomu.....	45
4.5.1	Izolace DNA.....	45
4.5.2	PCR.....	45
4.5.3	Agarozová gelová elektroforéza a 16S rRNA identifikace	46
5	Výsledky.....	47
5.1	Bakteriální mikrobiom.....	47
5.1.1	Výsledek analýzy.....	47
5.1.2	Bohatost mikrobiomu	48
5.1.2.1	Na úrovni kmene (Phylum)	48
5.1.2.2	Na úrovni třídy (Class).....	49
5.1.2.3	Na úrovni rodu (Genus).....	50
6	Diskuze.....	52
6.1	Bakteriální mikrobiota.....	52
6.2	Zastoupení celulolytických, hemicelulolytických a pektinolytických bakterií	54
6.3	Zastoupení patogenních bakterií.....	55
7	Závěr.....	57

1 Úvod

Z fyziologického hlediska hraje mikrobiální komunita tlustého střeva u koní podobnou roli jako mikrobiota bachoru u přežvýkavců (Fey & Sasse 1996). Tato mikrobiota je v symbiotickém vztahu s hostitelem (Su et al. 2020), chrání jej před patogeny, napomáhá mu v trávení potravy, vstřebávání živin z potravy, syntéze vitaminů a ve fermentaci vlákniny (Massacci et al. 2019). Pro zachování zdraví koní je proto velmi důležité pochopit složitost mikrobiálního společenství, interakce mezi střevními mikroby a hostitelem a také vliv potravy na střevní mikrobiotu (Al Jassim & Andrews 2009).

Koně se v průběhu evoluce přizpůsobili příjmu potravy s vysokým obsahem vlákniny (Morrison et al. 2020), kterou by měli přijímat průměrně 10–12 hodin denně. Tento způsob příjmu krmiva je důležitý pro udržování zdraví koní a naplňování jejich nutričních požadavků, zejména energetických (Al Jassim & Andrews 2009). energii koně získávají z 60–70 % rozkladem těkavých mastných kyselin (acetát, propionát, butyrát) (Geor et al. 2013), které vznikají při mikrobiální fermentaci vlákniny v tlustém střevě koní (Massacci et al. 2019). Nedostatečný příjem vlákniny a vysoké koncentrace vysokoenergetických jaderných krmiv jsou u dnešních koní poměrně běžným jevem, avšak vedou k narušení střevní mikrobioty a k rozvoji zdravotních problémů. Mezi taková onemocnění patří laminitidy, koliky, acidózy a žaludeční vředy (Al Jassim & Andrews 2009). Zejména proto je důležité najít možnosti úprav krmiv, které by narušení střevního společenství a onemocněním trávicího traktu zamezily. Jednou z možností je suplementace potravy krmnými aditivami jako je biochar.

Biochar je pórovitá uhlíkatá látka, která vzniká z biomasy v průběhu pyrolýzy (Lao & Mbega 2020). Pro své nejvýznačnější vlastnosti – adsorpce a redoxní aktivita (Schmidt et al. 2019) – je velmi hojně používán jako adsorbent znečišťujících látek v půdě, vodě či vzduchu (Cha et al. 2016). Jeho použití je velmi významné i v zemědělském sektoru, kde se používá zejména pro úpravu a zlepšení půdních vlastností (Lehman & Joseph 2015). Od roku 2010 se začalo rozšiřovat použití biocharu do krmiv pro hospodářská zvířata kvůli jeho potenciálu zvýšení účinnosti využití krmiv (Schmidt et al. 2019), zlepšení fermentace v bachoru přežvýkavců (McAvoy et al. 2020), zlepšení efektivity produkce a kvality živočišných produktů (masa, mléka, vajec) (Toth et al. 2015) či omezení výskytu parazitů gastrointestinálního traktu (Schmidt et al. 2019). Biochar také napomáhá adsorpci nežádoucích látek jako jsou těžké kovy, (Man et al. 2020) pesticidy, insekticidy, herbicidy (Schmidt et al. 2019), či toxiny (Joch et al. 2022), které se do těla dostávají zejména prostřednictvím kontaminovaných krmiv (Man et al. 2020).

Biochar má prokazatelně pozitivní účinky na trávicí trakt a zdraví zvířat, mírně negativní dopady na zdraví zvířat byly doposud pozorovány velmi ojediněle. To nám dává možnost pro široké využití biocharu v chovech hospodářských zvířat. Mechanismy fungování biocharu (adsorpce a redoxní aktivita) doposud nejsou všechny známe a pochopené, stejně tak působení biocharu na zdraví zvířat, například jak jeho přidavkem dochází zvýšení příjmu krmiva. Účinky biocharu na složení mikrobioty u koní taktéž nejsou známe a doposud nebyly ověřovány. Proto je potřeba dalších výzkumů v těchto oblastech.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit účinky podávání biocharu na zastoupení skupin bakterií ve výkalech koní.

2.2 Hypotézy

Podávání biocharu koním ovlivní relativní zastoupení jednotlivých skupin bakterií ve výkalech. Biochar:

- zvýší zastoupení celulolytických, hemicelulolytických a pektinolytických bakterií
- sníží zastoupení patogenních bakterií

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí trakt a střevní mikrobiota koní

Současný kůň patří do rodu *Equus*, který se vyvinul před 1 milionem let ze svého předka *Eohippa* (ten začal evoluci před 60 miliony let). Evoluce koně se shodovala s vývojem jeho životního prostředí (původně žil v lesích, které byly vytlačeny volnými plochami), přizpůsoboval se environmentálním a geografickým změnám.

Není přesně známo, kdy byl kůň domestikován. Také není známo, zda se jeho gastrointestinální trakt přizpůsoboval příjmu píce s vysokým obsahem vlákniny dostupným v dané době, či zda si kůň nevolil typ krmiva podle vhodnosti vůči svému gastrointestinálnímu traktu (Al Jassim & Andrews 2009).

3.1.1 Specifika trávení u koní

Pro koně je typické trávení vlákniny v tlustém střevě pomocí přítomných symbiotických mikroorganismů (Al Jassim & Andrews 2009). Střevní mikroby, mezi které patří prvoci, houby a bakterie, fermentují vlákninu a produkují těkavé mastné kyseliny (Kobayashi et al. 2006), zejména kyselinu octovou, propionovou a máselnou. Ty dohromady významně přispívají k denním energetickým požadavkům koní (dokonce až z 70–80 %) (Morrison et al. 2020). Kromě této fermentace u koní dochází i k fermentaci v žaludku, zejména při přijímání potravy bohaté na nestrukturální sacharidy. Při tom však dochází kvůli kyselosti žaludku zejména k produkci kyseliny mléčné a malému množství mastných kyselin s krátkým řetězcem (Al Jassim & Andrews 2009).

Koně neomezeným přístupem ke krmivu přijímají potravu 10 až 12 hodin denně. Tímto způsobem si udržují plný žaludek a nepřetržitý přísun živin (jak pro samotné zvíře, tak pro mikrobiální komunitu tlustého střeva). Kontinuální příjem potravy koni pomáhá překonat problém s menším objemem žaludku, který je ve srovnání s jinými druhy býložravců podobné velikosti těla, například se skotem, relativně malý. V kontrastu s malým objemem žaludku je způsob podávání krmiva, zejména u sportovních (nejčastěji u dostihových) koní, kterým je krmivo předkládáno standardně dvakrát denně a podávaná krmná dávka obsahuje velké množství jadrných krmiv (Al Jassim & Andrews 2009).

V optimálním případě je škrob u koní tráven v tenkém střevě. Při krmení krmnou dávkou s vysokým obsahem škrobu (zejména koncentrovanými krmivy) se však škrob dostává i do tlustého střeva, kde je rychle fermentován. To v tlustém střevě způsobuje snížení pH, zvýšení koncentrace laktobacilů a zvýšení koncentrace kyseliny mléčné (Duvnjak et al. 2018).

Zachování zdraví koní při krmení koncentrovanými (jadrnými) krmivy je výzvou pro nutriční specialisty, veterináře i majitele koní. Tento styl krmení koní vyžaduje lepší pochopení anatomických, fyziologických a funkčních vlastností koňského gastrointestinálního traktu a také mikrobiálního ekosystému, jeho vlivech na organismus zvířete a vliv stravy na mikroby (Al Jassim & Andrews 2009).

Gastrointestinální trakt koní se, stejně jako ostatních býložravců, skládá z dutiny ústní, jícnu, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva a konečníku (Geor et al. 2013).

- Dutina ústní

Koně mají citlivé, svalnaté a vnímavé pysky, které jim slouží k výběru a příjmu krmiva. Na rozdíl od skotu mají koně horní i dolní řezáky, díky nimž mohou potravu ukousnout blíže k zemi (až v rámci milimetrů). Koně mají horní čelist širší než spodní, žvýkají pohybem ze strany na stranu (vertikálně a laterálně). Kruhovými pohyby při žvýkání velmi účinně drtí krmivo stoličkami a třenovými zuby a zároveň jej promíchávají se slinami. Koně mají hypsodontní chrup, který dorůstá (2–3 mm/rok), čímž se kompenzuje jeho obrušování při žvýkání (Hembroff 2006).

Sliny jsou u koní vylučované příušní, mandibulární a podjazykovou žlázou. Koně za den vyprodukují až 40 l slin (Hynd 2019), přičemž jejich množství závisí na formě krmiva a struktuře obsahu. Jejich produkce je u koní stimulována pouze přítomností krmiva v ústní dutině a žvýkáním, nikoliv, jako u jiných zvířat, v reakci na pach či při pohledu na krmivo (Al Jassim & Andrews 2009). Sliny koní obsahují pouze malé množství amyláz (Cichorska et al. 2014), jejich hlavní funkcí není počáteční trávení živin, ale promaštění potravy a tvorba pufru (pH slin je zásadité a dosahuje hodnoty 9, sliny obsahují sodík, vápník, hořčík, bikarbonát, fosfor) (Hynd 2019).

- Hltan a jícen

Jícen koní je unikátní. Na rozdíl od jiných zvířat nemůže kůň zvracet ani regurgitovat žaludeční obsah do jícnu. Je to způsobeno tím, že svalovina jícnu je tvořena pouze částečně z příčně pruhované svaloviny (do oblasti na úrovni srdce), v dalším úseku je tvořena již jen hladkou svalovinou (Hembroff 2006). Druhým důvodem je to, že u vstupu jícnu do žaludku se nachází svěračový sval, který znemožňuje návrat zažitiny a plynů ze žaludku (Hynd 2019).

- Žaludek

Ve srovnání s jinými velkými druhy zvířat má kůň malý žaludek, tvoří pouze 8 % až 10 % trávicího traktu, s kapacitou 7,5 až 15 l. Žaludek má dvě odlišné části: horní s dlaždicovým epitelem bez slizniční vrstvy; a spodní žláznatou. Hranicí těchto dvou oblastí žaludku je margo plicatus. Ve sliznici žláznaté části žaludku se nacházejí krycí buňky, které sekretují kyselinu chlorovodíkovou. Kyselina chlorovodíková je vylučována nepřetržitě, což může způsobovat spolu s dalšími faktory vznik žaludečních vředů. Kromě toho dochází ve žláznaté části žaludku k sekreci pepsinu, lipázy, bikarbonátu a hlenu. Hlen je velmi důležitý pro ochranu povrchu sliznice před účinkem kyseliny chlorovodíkové (Geor et al. 2013).

V žaludku je většina tráveniny zadržena po dobu 2–6 hodin, než je posunuta do tenkého střeva. Žaludek však téměř nikdy není prázdný, neboť po zastavení příjmu krmiva se peristaltika žaludku sníží (Van Weyenberg et al. 2006).

- Tenké střevo

V tenkém střevě probíhá enzymatické trávení a absorpce většiny tuků, sacharidů (nestrukturálních) a bílkovin (Hembroff 2006; Geor et al. 2013).

Tenké střevo je přibližně 22 metrů dlouhé. 20 metrů je volně pohyblivě zavěšeno na okruží (mezenteriu), z tohoto důvodu je střevo náchylné ke kýlám či torzím (Hembroff 2006).

Do první části tenkého střeva, dvanáctníku, ústí vývod slinivky břišní a žlučovod (Marvan et al. 2017). Protože kůň nemá žlučník, je žluč vylučována rovnou do dvanáctníku, kde napomáhá emulgaci tuků. Taktéž tráveninu spolu s pankreatickou šťávou více ředí. Pankreatická šťáva je u koní vylučována nepřetržitě, její sekrece se zvyšuje 3–4krát během 2 až 3 minut od počátku příjmu krmiva. U koní se navíc pankreatická šťáva vylučuje ve větší míře ve srovnání se skotem a ovcemi (u koní je to konkrétně 10–12 l/100 kg živé hmotnosti za 24 hodin ve srovnání s 5 l/100 kg živé hmotnosti u skotu a 1 l/100 kg živé hmotnosti u ovcí). Pankreatická šťáva má pufrční účinky a také napomáhá zachovávat podmínky, které jsou vhodné pro velkou a různorodou mikrobiální populaci ve slepém a tlustém střevě (Hembroff 2006; Geor et al. 2013).

- Tlusté střevo

Po průchodu tenkým střevem se potrava dále dostává do tlustého střeva, které se dělí na tři tvarem a funkcí odlišné části: slepé střevo, tračník a konečník. Slepé střevo je u koní dobře rozvinuté (Hembroff 2006; Marvan et al. 2017) a slouží jako fermentační vak, kde dochází k mikrobiálnímu rozkladu a absorpci živin a tekutin z tráveniny, která prošla částečným enzymatickým trávením. Dalšími produkty mikrobiální fermentace jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem a plyny (Elghandour et al. 2018).

U koní tvoří tlusté střevo cca 60 % objemu gastrointestinálního traktu (Geor et al. 2013). Jedná se o objemný (85–112 l tekutiny) avšak krátký orgán, který se z hlediska mikrobiomu podobá bachoru (Al Jassim & Andrews 2009). Stěny postrádají klky a mikroklky, ale obsahují žlázy pro vylučování hlenu (Geor et al. 2013).

Slepé střevo se u koní nachází v pravé straně břišní dutiny ve fixní poloze (Hembroff 2006) a má objem asi 50 l (Marvan et al. 2017). Slepé střevo je tvořeno řadami záhybů/vaků (tzv. haustry), které zpomalují průchod tráveniny (Hynd 2019).

Na slepé střevo navazuje tlusté střevo – tračník. Vzestupný tračník se u koní nazývá „velký tračník“ a skládá se z ventrálního a dorzálního tračníku. Přechod mezi nimi je velmi úzký a zpožďuje transport velkých částic z ventrálního do dorzálního tračníku. To zvyšuje jejich retenční čas a fermentovatelnost. V tlustém střevě pokračuje fermentace (Hembroff 2006) a vstřebávají se živiny (konkrétně mastné kyseliny s krátkým řetězcem a vitaminy rozpustné ve vodě – zejména vitamin B) (Davies 2017), hořčík, sodík či bílkoviny a sacharidy uniklé trávení v tenkém střevě) (Hynd 2019). Také se zde resorbuje velké množství vody a zhutňují se odpadní produkty trávení, které vstupují do konečníku (Hembroff 2006).

Konečník je koncový úsek tlustého střeva, dlouhý přibližně 30 cm (Budras et al. 2012). Hromadí se zde nestrávené krmivo a formují se výkaly (Marvan et al. 2017).

3.1.1.1 Onemocnění koní spojená s trávením

Střevní mikrobiota je komplexní společenstvo, které má vliv na trávení, imunitu, ochranu organismu před patogeny a metabolismus. Z toho důvodu jsou poruchy mikrobioty (dysbióza) spojeny s řadou onemocnění, a to jak v trávicím traktu, tak mimo něj (Schoster et al. 2015). Souvislost mezi gastrointestinálními onemocněními a fekální mikrobiotou je oblastí aktivního výzkumu napříč živočišnými druhy, nejen u koní (Willette et al. 2021).

Stejně jako u jiných živých tvorů vede ignorování a porušování přirozených potřeb (vzniklých v průběhu evolučního procesu) zvířat ke komplikacím a zdravotním problémům. Koně trpí poruchami výživy a nemocemi běžnými u intenzivně chovaných zvířat, jako je acidóza, kolika, laminitida a žaludeční vředy (Al Jassim & Andrews 2009). Průjmy, enterotoxémie a zejména koliky představují 50 % zdravotních problémů vedoucích ke smrti dospělých koní (Gonçalves et al. 2002). Při výběru krmiva pro koně je proto důležité myslet na zvláštní anatomické a fyziologické vlastnosti trávicího systému koně (Al Jassim & Andrews 2009).

Nedostatečný přísun dietní vlákniny a vysoká koncentrace jadrných (koncentrovaných) krmiv obsahujících velké množství energie, spolu s nižší frekvencí podávání a příjmu krmiva jsou uměle vzniklými problémy moderních systémů chovu koní (Al Jassim & Andrews 2009). Sadet–Bourgeteau et al. (2016) doporučují denně podávat alespoň 10 g sušiny sena na 1 kg hmotnosti koně pro správnou funkci metabolismu a udržení vhodných podmínek pro symbiotické organismy.

Aby si koně udrželi zdravý trávicí trakt, musí ideálně neustále přijímat krmivo, které má nižší obsah nestrukturálních sacharidů a sacharidů rozpustných ve vodě (Al Jassim & Andrews 2009). Příjem krmné dávky bohaté na živiny a nedostatek pohybové aktivity vyvrcholily u moderních koní ve vysokou prevalenci obezity (Morrison et al. 2020).

K podobným metabolickým poruchám jako při nadměrném příjmu jadrných krmiv může docházet při příjmu velkého množství trav bohatých na oligosacharidy, jakými jsou například fruktany. Protože kůň nemá enzymy na jejich efektivní trávení, fruktany přecházejí až do tlustého střeva, kde podléhají mikrobiální fermentaci (Al Jassim & Andrews 2009).

Přestože je vláknina důležitá, Gonçalves et al. (2002) uvádí, že její nadbytek (zejména pokud se jedná o přijímání objemného krmiva nízké kvality či nízké stravitelnosti) může způsobovat zdravotní problémy jakými jsou ucpání tenkého střeva a rozvinutí koliky.

Narušení přirozené fekální mikrobioty nastává i vlivem stresu z dopravy, hladověním, účinky anestetik či po chirurgickém zákroku či antimikrobiální terapii (Schoster et al. 2015).

Průjem je typickým příznakem narušení střevního společenství. Vysoké procento průjmů, u kterých nelze najít původce, vede k předpokladu, že příčinou je disharmonie střevní mikrobioty (Key & Sasse 1996).

3.1.1.1.1 Laminitida

Laminitida je v současnosti považována spíše za klinický syndrom spojený se systémovým onemocněním nebo jako jeho důsledek (endokrinní onemocnění, seps, syndrom systémové zánětlivé odpovědi – SIRS) než samostatné onemocnění. Historicky byla laminitida spojena zejména se sepsí, SIRS a přetížením organismu škrobem. Nicméně v 80. letech 20. století byly publikovány první hypotézy spojující laminitidu s endokrinním onemocněním (Patterson-Kane & McGowan 2018). Nejčastěji je spojována s Cushingovým syndromem, syndromem inzulinové rezistence (také známý jako koňský metabolický syndrom) či s léčbou kortikosteroidy (Asplin et al. 2007).

Laminitida je definována jako ztráta spojení mezi vnitřní kopytní stěnou a distální falangou (kost na konci prstu), což má za následek zatlačení kosti dolů do kopyta, zničení okolních tepen a žil, a nakonec rozdrčení škáry a korunky chodidla (Tuniyazi et al. 2021).

Jedná se o jedno z nejzávažnějších onemocnění končetin koní (Tuniyazi et al. 2021) a zároveň o jeden z nejvíce oslabujících stavů pro koňovité (Patterson-Kane & McGowan 2018). Končetina a všechny její součásti nemohou být zdravé, pokud zbytek těla není zdravý, neboť na končetinách se odráží stav celého organismu (Orsini et al. 2009).

Při klinickém projevu obvykle pozorujeme u koně kulhání na jednu či více končetin, ztuhlost, přesun váhy na končetinách, abnormální postoj a nechuť k pohybu, citlivost na tlak na kopyta či zvýšené tepenné pulzy. U mnoha koní pozorujeme za nějaký čas od rozvinutí laminitidy také změny kopytní stěny (Patterson-Kane & McGowan 2018).

Laminitida má rozsáhlé důsledky na welfare koní (Bailey et al. 2004). Nejedná se o smrtelné onemocnění, ale zdravotní problémy způsobené laminitidou mohou být pro koně velmi vysilující. Léčba laminitidy může být náročná, zejména pokud dojde k morfologickým změnám v kopytě. Může dojít i trvalému kulhání koně. Ve vážných případech, kdy zvíře trpí značnými bolestmi, se přistupuje k eutanazii. Na druhou stranu je velké množství koní, kteří se po laminitidě zotaví a žijí plnohodnotný život, dokonce se mohou vrátit do sportu (Belknap & Geor 2017).

Ukazuje se, že ke vzniku laminitidy přispívá velké množství faktorů, do kterých lze zařadit management krmení, dříve prodělaná zranění, obezitu a březost. Nejčastější příčinou rozvoje laminitidy je příjem příliš velkého množství sacharidů, což zahrnuje například krmnou dávku s velkým množstvím jadrných krmiv (Tuniyazi et al. 2021) či spásání některých pastvin, a to zejména těch, ve kterých jsou přítomny trávy s vyšším obsahem cukru (Bailey et al. 2004). Příjem příliš velkého množství sacharidů způsobí nerovnováhu bakteriální komunity tlustého střeva a vede ke sledu událostí přispívajících k rozvoji laminitidy (Tuniyazi et al. 2021). Parsons et al (2007) uvádí, že věk, plemeno či pohlaví koně pravděpodobně nejsou faktory mající spojitost s rozvojem akutní laminitidy.

Ukazuje se, že koně s laminitidou mají významně odlišný mikrobiom tlustého střeva oproti zdravým koním. Jedná se zejména o zvýšenou relativní četnost rodu *Lactobacillus* a obecné snížení diverzity bakteriální komunity (Tuniyazi et al. 2021).

Přesné patofyziologické mechanismy laminitidy jsou bohužel stále nejasné (Tuniyazi et al. 2021). Bailey et al. (2004) upozorňují na to, že ve skupině zvířat žijících ve stejných podmínkách trpí laminitidou pouze někteří jedinci, přičemž častěji se jedná o poníky. Orsini et al. (2009) dodávají, že je nutné znát rizikové faktory jednotlivých koní a podle toho se řídit.

Laminitida se může projevovat různorodými klinickými projevy, protože působí na každého koně odlišně. Jednotlivé případy se liší i v průběhu stadií laminitidy, včetně projevů bolesti (Bras & Morrison 2021). Například laminitidy vznikající následkem sepsí bývají progresivnější a závažnější, kdežto endokrinopatické laminitidy bývají málo progresivní a koně se z nich zotavují relativně snadno a dobře (Belknap & Geor 2017).

Pro popis laminitid byly stanoveny fáze:

- Vývojová – nastává před klinickými příznaky, bývá nepovšimnuta, ale již dochází k lamelárnímu poranění kopyta
- Akutní – je indikována s nástupem klinických příznaků
- Chronická – pozdější fáze onemocnění, kterou doprovází deformace kopytní stěny (Bras & Morrison 2021)

Endokrinopatická laminitida je nyní uznávána jako nejběžnější forma přirozeně se vyskytující laminitidy u koní a poníků ve vyspělých zemích. Tato forma se primárně projevuje kulháním (v průběhu studie v USA a Evropě byla identifikována v 90 % případů laminitidy projevující se kulháním) (Patterson-Kane & McGowan 2018). Endokrinopatická laminitida postihuje především koně s obezitou a inzulinovou dysregulací, zejména pokud jsou tito koně krmeni dietou hojnou na nestrukturální sacharidy (van Eps & Burns 2019).

Laminitida stále zůstává nepříjemným a vysoce rizikovým problémem zdraví a welfare koní. Ačkoliv se snažíme o pochopení mechanismů vedoucích k tomuto stavu, není možné mu zcela účinně předcházet a ani opravit již poraněnou lamelární tkáň. Nejlepším řešením je prevence, případně co nejrychleji nastupující léčba, neboť při pozdějším zásahu již prognóza není tak příznivá (Bras & Morrison 2021). Vzhledem k nepříznivé prognóze u koní s těžkou laminitidou, bolestivostí a závažností onemocnění Parsons et al. (2007) zdůrazňuje, že by mělo být zvýšeno úsilí zaměřené na prevenci rozvoje laminitidy spíše než na její léčbu. Treiber et al. (2006) podotýká, že nejlepší je vyhýbání se rizikovým faktorům vzniku laminitidy, především těch nutričních.

Možnosti a způsob prevence závisí na několika faktorech. Větší pozornost věnujeme zejména koním, kteří v minulosti laminitidu prodělali (Belknap & Geor 2017). Vnímavým koním omezujeme pastvu v jarním a podzimním období (období pomalého růstu porostu, ale vysokého obsahu sacharidů – fruktanů) (Longland & Byrd 2006). K laminitidám koní také dochází při pastvě na rychle rostoucím porostu po vydatných deštích – v kombinaci s hojným slunečním zářením se zde hromadí ve vodě rozpustné sacharidy v důsledku zvýšené fotosyntézy. Je důležité přecházet na novou pastvu postupně, aby si koně přivykli (Frank 2011). V posledních letech si majitelé koní více uvědomují, že je důležité kontrolovat hmotnost koní a příjem sacharidů. Jako praktický a účinný prostředek prevence závažnějších fází laminitidy byla zavedena kryoterapie, která je funkční při zavedení v počátcích onemocnění. Dalším účinným a levným prostředkem prevence laminitid je každodenní aerobní cvičení s koněm (Orsini et al. 2009).

3.1.1.1.2 Kolika

Kolika neboli abdominální bolesti jsou nejčastějším projevem gastrointestinálního onemocnění u dospělých koní (Hillyer & Mair 1997).

Kolika je vážné zdravotní postižení, který se vyskytuje u koní po celém světě a může být život ohrožující (Al Jassim & Andrews 2009). Jde o nejčastější akutní zdravotní problém u koní. Proto je schopnost majitele rozeznat koliku a vyhledat pomoc kritickým prvním krokem pro vývoj tohoto onemocnění i jeho výsledek (Bowden et al. 2019).

Kolika je nejčastějším důvodem, proč je ke koni akutně přivolán veterinář. Je důležité, aby majitelé byli schopni rozeznat příznaky koliky. U koní můžeme sledovat řadu ukazatelů, které nám pomohou vyhodnotit závažnost probíhajícího onemocnění. Jedná se rektální teplotu, barvu sliznic, frekvenci dýchání, srdeční frekvenci či poslech střevních pohybů. Diagnóza může být náročná nejen chovatele, ale i pro veterináře. Pozdní reakce na zdravotní stav koně je běžně způsobena nedostatkem znalostí majitele a nepochopením signálů vydávaných koněm (Bowden et al. 2019).

Pro diagnostiku koliky a jejího typu je důležité kromě rozeznání příznaků také délka jejich projevu, historie léčení koně a jeho předchozí onemocnění, dřívější kolikové epizody, jeho apetit, příjem vody, defekace a mikce (močení) (Southwood & Fehr 2012).

Mezi typické kolikové příznaky řadíme hrabání země, ohlížení se na slabiny, kopání do břicha a válení se. Koliky bývají často děleny podle příznaků na:

- Mírné koliky – zahrnují přerušované ohlížení se na slabiny, kopání do břicha, nechutenství, lehání a někdy i válení.
- Středně těžké koliky – vytrvalejší válení se, kůň je roztržitý, nechce chodit a může se potit.
- Vážné koliky – vytrvalé válení se a kopání, může být těžké koně udržet při chůzi na nohou, kůň je pokryt potem a často i odřeninami z válení se a vstávání (Southwood & Fehr 2012).

Některé příznaky, které můžeme pozorovat u kolik, mohou ve skutečnosti signalizovat jiné onemocnění. Například dlouhotrvající ležení může značit některé neurologické onemocnění (koňský herpes virus, botulismus), úrazy kosterní soustavy či závažnou laminitidu. Ztichlá peristaltika může být spojená kromě koliky i s postižením ledvin či jater (Southwood & Fehr 2012).

Vážné koliky se vyskytují v relativně malém množství případů, avšak rychlý léčebný zásah je u nich zásadní. Dokonce i kritické případy se však mohou projevovat méně výraznými klinickými příznaky (Bowden et al. 2019). U koní s těžkou kolikou bývá úmrtnost vysoká, i v případě rychlého převezení na kliniku (Gonçalves et al. 2002)

Kolikou může způsobovat velké množství faktorů (Gonçalves et al. 2002). Mezi faktory zvyšující riziko koliky se řadí nejčastější:

- Management krmení (změna krmení, typ a kvalita krmiva) – koně na pastvinách tráví příjmem krmiva 75 % dne a 50 % noc oproti, boxově ustájeným, kteří dostávají krmivo běžně dvakrát denně (Gonçalves et al. 2002; Al Jassim & Andrews 2009). Southwood & Fehr (2012) také upozorňují na nebezpečí krmení koncentráty v množství větším jak 2,5 kg sušiny na den.
- Vnitřní faktory koní (věk, plemeno, pohlaví, temperament) – určité typy kolik jsou častější u konkrétních skupin koní, např. chirurgický zákrok je častější u starších koní. Arabští koně se zdají více ohrožení z hlediska rozvoje koliky a je u nich častější výskyt enterolitiáz.
- Management chovu (podmínky ustájení, typ a změny v aktivitách) – zejména u sportovních koní jsou charakteristickou příčinou stresující či intenzivní aktivity. Koně celoročně chovaní na pastvinách mají menší riziko koliky oproti koním boxově ustájeným. Větší riziko rozvoje koliky je u koní přijímajících příliš velké mnoho vlákniny (například koně přijímající slámu ve velkém množství).
- Vnitřní parazité (způsob odčervování, přítomnost parazitů) – zejména se jedná o tasemnice *Anoplocephala perfoliata* a *Strongylus vulgaris*.
- Anamnéza (předchozí koliky) – existuje větší pravděpodobnost opětovného výskytu koliky, zejména pokud má kůň v anamnéze operaci břicha (Gonçalves et al. 2002; Al Jassim & Andrews 2009).

Dalšími rizikovými faktory pro rozvoj koliky může být nedostatečný přístup k pastvě a vodě, zvýšený pohyb a přeprava. K rozvoji koliky mohou přispět i špatné zuby – neúčinné žvýkání a následné požívání dlouhých částic krmiva může narušit průchod tráveniny traktem (Gonçalves et al. 2002; Al Jassim & Andrews 2009).

Byl také zdokumentován vliv ročních období. Například ve Spojeném království byl hlášen nárůst výskytu kolik během jarních a podzimních měsíců. Je známo, že jarní pastviny jsou bohaté na BNLV (bezdušikáté látky výtažkové) a někdy mají nevyvážený obsah minerálních látek. V tlustém střevě tyto látky podléhají rychlé fermentaci, což vede k hromadění plynů a kyselin a následně vzniku kolik (Al Jassim & Andrews 2009).

Některé faktory nemohou být ovlivněny lidskou vůlí (např. faktory vnitřní či ty, které souvisejí s počasím), avšak většina faktorů zvyšujících riziko koliky závisí na ošetřovateli, tudíž by měly být pod kontrolou (Gonçalves et al. 2002).

Koliku můžeme klasifikovat na základě segmentu postiženého střeva a/nebo podle typu léze (poranění, poškození). Mezi nejčastější typy kolik patří plynová kolika, křečová kolika, impakce velkého kolonu tlustého střeva a posuny velkého kolonu tlustého střeva (Rhodes & Madrigal 2021).

U koní chovaných v oblastech s písčitou půdou a špatnou kvalitou pastvin může docházet po dlouhodobém přijímání písku s potravou (Loschelder & Gehlen 2017) k jeho hromadění v tlustém střevě, což může následně vést k rozvoji impaktní koliky (impakce = ucpání) a průjmu (Lindroth et al. 2022). Riziko přijímání písku v potravě se může vyskytnout i u koní krmených ze země či držných na již spasených pastvinách. Řešením může být omezení pobytu na písčité půdě a podávání krmiva na vyvýšeném místě (Loschelder & Gehlen 2017).

Recidivující kolika je mnohými veterinárními lékaři považována za jeden z nejvíce frustrujících problémů gastrointestinálního traktu koní. Tito koně mají také relativně vyšší úmrtnost. Diagnostika chronické a recidivující koliky zůstává stále velmi složitá. Definitivní diagnózu může poskytnout chirurgické vyšetření břicha, což je nákladný a velký chirurgický zákrok, který navíc nemusí přinést požadovaný výsledek (Hillyer & Mair 1997).

Schoster et al. (2015) navrhli, že změny mikrobiomu koní by mohly sloužit k určení pravděpodobnosti rozvoje koliky. Willette et al. (2021) také zmiňují, že odlišnosti mikrobiomu zdravých koní a koní s kolikami by mohly potenciálně přispět k pochopení příčin kolik a vést k preventivním strategiím a možnostem léčby.

3.1.1.1.3 Žaludeční vředy

Žaludeční vředy jsou jednou z nejčastějších chorob žaludku koně. Žaludeční vředy jsou u koní běžným problémem a zejména u sportovních koní mají velký klinický a ekonomický význam (např. špatné výsledky koně při závodech a s tím spojený nízký zisk pro majitele) (Gehlen et al. 2021; Hwang et al. 2022).

V koňském žaludku je nepřetržitě vylučovaná kyselina chlorovodíková (Hembroff 2006). Pokud je snížena produkce slin (obsahují hydrogenuhličitan, který tlumí kyselé pH) (Galinelli et al. 2019) a hlenu (tvoří se v žlázatě části žaludku), dochází k prodloužení doby, kdy je neglandulární část žaludku vystavena působení kyseliny chlorovodíkové (Hwang et al. 2022). Je prokázáno, že volný přístup k vláknitému krmivu či častější krmení riziko vytvoření vředů snižuje, protože přítomnost píce v žaludku omezuje negativní působení kyseliny chlorovodíkové (Galinelli et al. 2019).

Jejich rozvoj je nejčastější u sportovních koní, především dostihových a výkonnostních. Tomu může přispívat krmení potravou bohatou na jádrná krmiva dvakrát denně a omezením krmiva před výkonem. Díky nízkému obsahu vlákniny v krmné dávce a s tím spojené nižší produkci slin dochází k prodloužení doby, kdy je žaludek vystaven žaludeční kyselině, což v kombinaci se stresem z intenzivní aktivity a dlouhodobým pobytem v uzavřených prostorech může napomáhat rozvoji žaludečních vředů (Al Jassim & Andrews 2009).

Žaludeční vředy se u koní vyskytují s prevalencí 53–93 % (nejmenší prevalence u koní využívaných k rekreaci, největší u intenzivně trénovaných koní). Někteří jedinci nevykazují žádné klinické příznaky, takže se u nich na ulceraci (výskyt vředů) nikdy nepříjde (Ribeiro et al. 2016; Böhm et al. 2018).

Výskyt žaludečních vředů není spojen s typickými projevy. Mezi některé klinické příznaky řadíme sníženou chuť k jídlu, špatnou kvalitu srsti, změny temperamentu v důsledku bolesti a nepohodlí, sníženou tělesnou kondici, opakující se koliky (Böhm et al. 2018) či ztrátu výkonnosti, která má i ekonomický význam (zejména při závodech) (Gehlen et al. 2021).

Management krmení a složení krmné dávky hraje důležitou roli ve vývoji vředů. Mezi rizikové faktory patří například denní příjem více než 2 g škrobu na kg hmotnosti koně (Böhm et al. 2018), podávání nekvalitního krmiva či dlouhé prodlevy mezi kmeními (Al Jassim & Andrews 2009). Mezi další potenciální faktory se řadí podávání nesteroidních protizánětlivých léků, snížené prokrvení žaludku či zvýšený stres (Paul et al. 2021), který je často spojen se pracovním vyčerpáním (Ribeiro et al. 2016).

Kromě krmení koncentrovanými krmivy bohatými na nestrukturní sacharidy řadíme mezi faktory vzniku žaludečních vředů dávkované podávání krmiva či nedostatek krmiva po delší časový úsek (například z důvodu anorexie či nutného odebrání krmiva třeba po operaci koliky). U koní chovaných na pastvě se vyvinou zřídka (Hembroff 2006; Al Jassim & Andrews 2009).

Pro spolehlivou diagnostiku žaludečních vředů využíváme gastrokopii. Jiné vyšetřovací metody nemohou poskytnout dostatečně konkrétní informace o výskytu, lokalizaci a závažnosti nálezů. Pro dlouhodobý léčebný a terapeutický úspěch (žaludeční vředy často recidivují) je nutné kontrolovat a upravit podmínky ustájení, krmení a aktivit a dále omezit rizikové faktory (Gehlen et al. 2021).

3.1.1.1.4 Toxiny

- Mykotoxiny

Mykotoxiny v krmivech jsou celosvětovým problémem, postiženo bývá až 25 % světové produkce. Mykotoxiny pochází především z plísní, jejichž růstu na čerstvém i skladovaném krmivu je obtížné zabránit. Mohou mít za následek závažná onemocnění hospodářských zvířat, proto se do krmiv obvykle přidávají adsorbenty, které mykotoxiny před požitím vážou (Schmidt et al. 2019).

Mezi nejběžnější mykotoxiny patří aflatoxin, deoxynivalenol, zearalenon a ochratoxin (Lao & Mbega 2020). Kromě nich je u koní důležité sledovat i hladiny fumonisinu (Urošević et al. 2011).

V případě, kdy zvířata dlouhodobě konzumují kontaminované krmivo, vyskytují se u nich četné zdravotní komplikace a nemoci. Mykotoxiny mohou mít mutagenní či karcinogenní účinky, mohou způsobovat snížení produkce, horší gastrointestinální aktivitu či imunosupresivní poruchy (Lao & Mbega 2020).

Koně jsou z mykotoxinů nejcitlivější na fumonisin. Cílovými orgány postiženými intoxikací jsou centrální nervová soustava, játra a srdce. Fumonisin způsobuje neurotoxické onemocnění leukoencephalomalacii a hepatotoxický syndrom, které se mohou objevit nezávisle či současně. U neurotoxického onemocnění je typická nekoordinovanost, bezcílné kroužení, paréza, slepota, či deprese a vysoká úmrtnost (i bez klinických příznaků). Hepatotoxický syndrom se vyskytuje méně často, mezi příznaky se řadí ztráta chuti k jídlu, deprese, otok hlavy, žloutenka a zvýšená koncentrace bilirubinu a aktivita jaterních enzymů (Urošević et al. 2011).

Použití adsorbentů, jako například biocharu, aktivního uhlí, hlinitokřemičitanů, bentonitu či zeolitu vykazuje dobré výsledky při snižování množství vstřebávaných mykotoxinů do krve zvířat (Lao & Mbega 2020).

- Endotoxémie

Endotoxémie se vyskytuje jako sekundární onemocnění (Vidovic & Huskamp 1999).

Primárním onemocněním předcházejícím endotoxémii může být například střevní onemocnění koní zahrnující ischemii (poruchu prokrvení) či zánět, což může být doprovázeno výraznou proliferací gramnegativních střevních bakterií a rozpadem slizniční bariéry (Oikawa & Shiga 2001). Pokud je narušena intaktnost slizniční bariéry, dochází ke zvýšené absorpci lipopolysacharidů a dochází endotoxémii a/nebo septikémii. Oblasti slepého a tlustého střeva (vzestupný tračník) jsou u koní považovány za oblasti s největší patologickou absorpcí endotoxinu (Vidovic & Huskamp 1999).

Poškození gastrointestinálního traktu je u koní úzce spojeno s rozvojem endotoxémie a sepse. Tyto dva stavy se mohou vyskytovat společně, zejména pokud septický šok vede ke sníženému průtoku krve a poruše prokrvení v oblasti střeva (Hurcombe & Holcombe 2016).

Kromě poškození gastrointestinálního traktu dochází k rozvoji sepse a/nebo endotoxémie například v důsledku neonatální bakteriální sepse, infekční enteritidy, metritidy, zadržené placenty či bakteriální pneumonie (Werners & Bryant 2012).

Sepse/septikémie je popisována jako systémová zánětlivá reakce na infekci (Sheats 2019). Seps je způsobená mikrobiální invazí, kdy mikroby napadají nezasažené části těla, což vede k systémovému onemocnění. Endotoxémie označuje přítomnost endotoxinů (složky buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií) v systémovém oběhu (Werners 2016).

Koně s časnou endotoxémií/sepsí mohou vykazovat nejasné klinické příznaky zahrnující nechutenství, nižší aktivitu, nižší příjem vody, tachykardii či tachypnoi (Hurcombe & Holcombe 2016). Léčba endotoxémie a sepsise se primárně zaměřuje na prevenci a léčbu zánětlivé reakce (Werners 2016).

Koně nejsou příliš citliví na endotoxémii, endotoxiny se běžně nacházejí ve střevě koní. Proto jsou schopni rychle eliminovat endotoxiny z oběhu (Vidovic & Huskamp 1999).

3.1.2 Mikroorganismy trávicího traktu koní

Fyziologická střevní mikrobiota koní zahrnuje komplexní společenství mikroorganismů, které je přítomno v gastrointestinálním traktu zdravého organismu (Fey & Sasse 1996). Za normální situace je kůň a jeho střevní mikrobiota v symbiotickém a dynamickém vztahu (Su et al. 2020). Střevní mikrobiota hraje zásadní roli ve zdraví hostitele, napomáhá trávení potravy, vstřebávání živin, syntéze vitamínů a mastných kyselin s krátkým řetězcem, chrání hostitele před patogeny, stimuluje imunitní systém a epitelární buňky (Schoster et al. 2015; Massacci et al. 2019). Anaerobní střevní mikrobiota je částečně zodpovědná za tvorbu těkavých mastných kyselin (TMK), zejména butyrátu (Fey & Sasse 1996) a mimo tyto kyseliny produkuje i některé vitaminy (Cichorska et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že pro koně a jejich zdraví je nezbytný příjem vlákniny, bakterie rozkládající vlákninu (fibrolytické) jsou u koní esenciální (Hynd 2019). Ve slepém střevě (konkrétně ve slepém střevě a tračniku) probíhá intenzivní rozklad vlákniny, přičemž vznikají těkavé mastné kyseliny – acetát, propionát a butyrát (Geor et al. 2013). Z jejich rozkladu kůň získává 60–70 % energie, přičemž 30 % z toho pochází ze samotného slepého střeva (Su et al. 2020). Přesto je trávení vlákniny u koní méně efektivní než u přežvýkavců, což je pravděpodobně způsobeno rychlejší pasáží krmiva v gastrointestinálním traktu koní (Hynd 2019). Vláknu také lépe tráví koně zvyklí na příjem objemných krmiv, protože jejich střevní mikrobiální komunita je substrátu přizpůsobená (v objemná krmiva jsou na vlákninu bohatá). Pro rozklad vlákniny jsou hlavně důležité bakterie a houby, protozoa při rozkladu celulózy pravděpodobně nehrají příliš důležitou roli (Geor et al. 2013).

V malém množství se ve zdravém střevním společenství mohou vyskytovat i patogeny. Dělí se na rezidentní (detekovatelné pravidelně po dobu alespoň několika týdnů) a přechodné (obvykle přijaté s potravou, neschopné replikace v gastrointestinálním traktu (Fey & Sasse 1996)).

Z fyziologického hlediska hraje mikrobiální komunita tlustého střeva koní podobně důležitou roli jako mikrobiota předžaludku u skotu (Fey & Sasse 1996). Mikrobiální komunita tlustého střeva u koní, zejména bakterie rozkládající vlákninu, je však mnohem méně pochopena než komunita složeného žaludku přežvýkavců (Al Jassim & Andrews 2009). Konkrétní prohlášení o koňském střevním mikrobiomu ztěžuje také to, že počet kvalitativních i kvantitativních vyšetření střevního mikrobiomu koní je celkově nízký, kvalitativní informace jsou často dostupné pouze pro jednotlivce (Fey & Sasse 1996).

Mikrobiální diverzita je považována za důležitý faktor zdraví trávicího traktu (Schoster et al. 2015). Poruchy střevní mikrobioty (= dysbióza) mohou být spojeny s celou řadou onemocnění ve střevech i mimo ně. Mezi tyto nemoci patří například kolika či laminitida (Schoster et al. 2015). S dysbiózou střevního společenství je spojené i narušení energetické bilance, například při obezitě či souvisejícím metabolickým onemocnění (Morrison et al. 2020).

3.1.2.1 Metody zjišťování složení střevní mikrobioty u koní

Nejběžnějším testovacím materiálem pro analýzu střevního mikrobiomu je vzorek výkalů, neboť je snadné jej získat. Vzorky výkalů však mohou obsahovat pouze obsah z distálních úseků střeva. Existují však případy studií, kdy autoři použili zažítinu i z jiných částí střeva. Další možností je odběr vzorků pomocí kanyly, což nám umožňuje studovat mikrobiom slepého střeva za měnících se experimentálních podmínek (Fey & Sasse 1996). Mikrobiální složení výkalů však plně neodráží mikrobiální složení různých oblastí v gastrointestinálním traktu, což ztěžuje interpretaci výsledků (Schoster et al. 2015).

Ve 20. století se pro zkoumání mikrobiomu gastrointestinálního traktu nejvíce využívaly klasické bakteriologické metody, přímý nátěr a kultivace. Vzhledem k velkému množství přítomných mikroorganismů byla podrobná kvalitativní a kvantitativní analýza střevního mikrobiomu složitým procesem z hlediska času, materiálu a personálu (Fey & Sasse 1996). Kultivační metody také umožňovaly pouze částečný pohled na složitost mikrobiomu, protože ne všechny místní mikroorganismy již byly někdy kultivovány (Costa et al. 2015).

Pokroky v biotechnice a sekvenování umožňují podrobnější kvantitativní analýzu střevního mikrobiomu. Tyto sekvenační techniky byly využity i k lepšímu pochopení vlivu faktorů, jakými jsou antimikrobiální léčba a věk zvířete, na střevní mikrobiom koní. Dále vedly k lepšímu pochopení patofyziologie onemocnění souvisejících s mikrobiotou střev a umožnily vývoj účinných preventivních či léčebných opatření (Schoster et al. 2015). Nové technologie sekvenování zlepšily naše chápání v ohledu složení a interakce komplexních bakteriálních populací, nejvýznamněji právě o společenstvech gastrointestinálního traktu (Costa et al. 2015). V porovnání s tradičními metodami se sekvenování nové generace jeví jako efektivnější při analýze struktur mikrobiomu, zejména u druhů těžko kultivovatelných (Su et al. 2020).

DNA sekvenování se začalo rozvíjet po roce 1972 a v posledních dekáдах se rychle rozvinulo. Toto sekvenování je proces, při kterém určujeme pořadí nukleových bazí (základní stavební jednotky DNA). Dá se říct, že překládáme DNA organismu do formátu, který je pochopitelný pro vědce a výzkumníky (Sung 2017).

Základem bakteriálních analýz byl po desetiletí gen 16S rRNA (Johnson et al. 2019). Geny 16S rDNA jsou mezi bakteriálními taxony, rody a druhy vysoce zachované. Sekvence genu 16S rDNA obsahují i variabilní oblasti, které umožňují diverzifikaci v rámci stejného druhu či genomu. Z toho důvodu se tyto geny používají k rekonstrukci evoluční historie, klasifikaci a analýze fylogenetických vztahů mezi bakteriálními druhy (Shanmugasundaram et al. 2022).

V posledních letech se začalo využívat vysoce výkonné sekvenování celého genomu (Johnson et al. 2019). Sekvenování nové generace neboli NGS (z anglického „next-generation sequencing“) je poměrně nově vyvinutá metoda umožňující mimo jiné rekonstrukci genomu. Tato technologie dramaticky změnila způsob získávání genomických dat ze vzorků – místo studia konkrétního úseku nám NGS umožňuje studovat celý genom. V dnešní době jsme schopni získat stovky bilionů bazí DNA za den a očekává se, že v budoucnu se tato hodnota ještě navýší (Sung 2017).

Metody určování střevního mikrobiomu pomocí sekvenací samozřejmě nejsou bezchybné, mohou se vyskytnout technické problémy jako je zkreslení primerů PCR a rozdílné účinnosti extrakce DNA z různých organismů v komplexních komunitách. I přesto tyto techniky velmi výrazně rozšiřují naše povědomí o mikrobiálním složení mikrobiomu (Caporaso et al. 2012).

3.1.2.2 Složení střevní komunity u koní

Střevní komunita koní je považován za citlivější než u jiných monogastrických zvířat (Fey & Sasse 1996). Disturbance intestinální mikrobioty mohou být příčinou zažívacích potíží. Aby bylo možné tyto disturbance odhalit a rozeznat rozdíly ve střevní mikrobiotě, je nutné složení a strukturu normálního střevního společenství znát (Fey & Sasse 1996). Pochopení podobností a rozdílů střevního společenství (např. mezi jednotlivými plemeny koní) má potenciál zlepšit personalizovanou mikrobiální modifikaci, zejména tu, která se zabývá zlepšením sportovního výkonu koní (Massacci et al. 2019). Interpretace výsledků studií mikrobioty je však stále obtížná, protože soubory dat jsou malé a změny v chovu mají významný dopad (Schoster et al. 2015).

Střevní mikrobiální komunita koní je komplexní ekosystém složený z tisíců bakteriálních druhů a mnoha dalších mikroorganismů. Přesněji, dosahuje koncentrace přibližně 10^9 mikroorganismů na gram zažitiny ve slepém střevě a skládá se z přibližně 108 bakteriálních rodů a alespoň 7 kmenů (Massacci et al. 2019).

Mezi symbiotické mikroorganismy koňského střeva řadíme bakterie, houby, prvoky, archea a viry. Tyto mikroby jsou fylogeneticky různorodé skupiny, které jsou na sobě závislé prostřednictvím složitých trofických vztahů. Velká část koňské střevní mikrobioty je jedinečná pro každé zvíře a mikrobiální společenství se navíc v různých částech gastrointestinálního traktu vzájemně liší i v bohatosti. Mikroby přispívají k trávení přijaté potravy a zdraví zvířat. Mikrobiální diverzita vychází z preference mikrobů pro různé substráty a vede k produkci různých metabolitů jakými je mikrobiální protein, acetát, propionát, butyrát, metan a další. Také k tomu přispívá preference mikrobů k různým endo-environmentálním podmínkám, zejména pH ve střevech (Elghandour et al. 2018).

Uvádí se, že prvoci a archea se u koní nachází ve srovnání s přežvýkavci v nižším množství (Elghandour et al. 2018).

Navzdory kyselému pH se v žaludku nachází 106–108 cfu/ml mikrobů. Nejvíce dominantní jsou přitom pravděpodobně laktobacily, které mají sklon k nízkému pH (Elghandour et al. 2018).

Je potvrzené, že v různých oddílech střeva se vzájemně odlišuje složení místní mikrobiální komunity. Zatímco mezi tenkým a tlustým střevem jsou významné rozdíly, mikrobiota slepého střeva a kolonu je velmi podobná. V přední části gastrointestinálního traktu nejčastěji nacházíme bakterie kmene *Firmicutes* a *Pseudomonatoda* (dříve nazývané *Proteobacteria*), v zadní části trávicího traktu se vyskytují hlavně bakterie kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (Su et al. 2020). Nejhojnější ve všech úsecích střeva koní je kmen *Firmicutes* (Costa et al. 2015).

V tenkém střevě dominuje 106–109 cfu/ml striktně anaerobních střevních mikrobů, které zahrnují laktobacily, enterobakterie, enterokoky, streptokoky a bakterie využívající laktát. U koní krmených koncentrovanými krmivem je v tenkém střevě (a žaludku) vyšší množství anaerobních bakterií než v tlustém střevě. U koní krmených pastvou je rozložení anaerobních mikrobů více rovnoměrné. To by mohlo být způsobeno rozdílem pH, protože koncentrované krmivo uniklé trávení v žaludku se v tlustém střevě rychle rozkládá a způsobuje zde kyselejší (nižší) pH. To je v kontrastu s objemnými krmivem, které během mikrobiální fermentace pH střevního obsahu zvyšují (Elghandour et al. 2018).

Díky téměř neutrálnímu pH a pomalému průchodu tlustým střevem je v tlustém a slepém střevě vyšší počet mikrobů, přibližně 109 a 108 cfu/ml a také jejich větší diverzita (Elghandour et al. 2018). Hlavní část mikrobiální komunity tlustého střeva představují bakterie, po nich podle množství anaerobní houby, prvoci a archea (Massacci et al. 2019).

Ačkoliv fermentace u koní probíhá v komoře slepého a tlustého střeva, existují mezi mikrobiálními populacemi těchto úseků GIT (gastrointestinálního traktu) značné rozdíly. Ve slepém střevě se nachází vyšší populace fibrolytických bakterií, zatímco amylolytické bakterie (producenti kyseliny mléčné, uživatelé kyseliny mléčné a streptokoky) jsou hojnější v tlustém střevě (Elghandour et al. 2018). Mezi hlavní druhy celulólytických bakterií slepého střeva patří *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flaveciens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Clostridium spp.* a *Butyrivibrio spp.* (Elghandour et al. 2018).

V oblasti slepého střeva je prokázána přítomnost streptokoků, laktobacilů, enterobakterií, aerobních bacilů, zárodků *Bacteroides* a klostridií. Obligátně anaerobní zárodky tvoří 39–45 % mikrobioty slepého střeva, což je nízká hodnota ve srovnání s bachorem přežvýkavců (Fey & Sasse 1996).

Mezi místní dominantní protozoa se řadí *Blepharocys*, *Paraisotricha sp.*, *Buetschila* či *Cycloposthium*. Ve slepém střevě se také vyskytují houby, například *Caecomyces equi*, která se podílí na rozkladu lignocelulózy (Cichorska et al. 2014).

Masacci et al. (2019) studovali základní mikrobiom (neboli jádrový, angl. „core microbiome“) u koní (rody sdílené u 99 % vzorků). Toto jádro se skládalo z 30 rodů patřících do dosud neklasifikovaných čeledí *Lachnospiraceae* (kmen *Firmicutes*), *Porphyromonadaceae* (kmen *Bacteroidetes*) a *Ruminococcaceae* (kmen *Firmicutes*). Většina těchto rodů patřila mezi 30 nejpočetnějších, což podporuje koncept sdíleného a konzervovaného fekálního mikrobiomu mezi všemi jedinci (Masacci et al. 2019).

Schoster et al. (2015) objevili, že ve zkoumaných mikrobiomech u 8 koní převládaly kmeny *Firmicutes*, *Pseudomonatoda*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres* a *Spirochaetes*.

Převládající kmenem střevního společenství koní je tedy *Firmicutes*, na druhém místě se nejčastěji vyskytuje buď kmen *Bacteroidetes* či *Verrucomicrobia* (Paßlack et al. 2020).

Stabilita taxonů by mohla být vysvětlena důležitou rolí těchto taxonů ve fyziologii nebo metabolismu u jednotlivých plemen koní. Například rod *Clostridium* hraje klíčovou roli v modulaci střevní homeostázy během celého života a zejména komenzální klostridie hrají důležitou roli v metabolické pohodě kolonocytů (epiteliální buňky sliznice tlustého střeva) tím, že uvolňují butyrát jako konečný produkt fermentace (Masacci et al. 2019).

Při akumulaci kyseliny mléčné v tlustém střevě (v důsledku rychlé fermentace škrobu) dochází spolu se zvýšením koncentrace bakterií mléčného kvašení ke snížení koncentrace celulólytických bakterií (Al Jassim & Andrews 2009). K této rychlé fermentaci škrobu může dojít za situace, kdy koně přijmou větší objem jadrného krmiva, které má vyšší energetickou hodnotu a větší obsah škrobu než potrava s vyšším obsahem vlákniny, kterou se koně v průběhu evoluce naučili přijímat. Problém nastává, když se potrava dostane z tenkého střeva, které má omezenou kapacitu, do tlustého střeva, kde dojde k proliferaci bakterií produkujících kyselinu mléčnou. Tím se zde zvýší obsah laktátu, těkavých mastných kyselin a následným snížením pH střeva může dojít k rozvinutí střevních a metabolických poruch jako je laminitida a kolika (Murray et al. 2014).

3.1.2.3 Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty

U každého koně sledujeme jeho vlastní unikátní fekální mikrobiální profil. Předpokládá se, že individualita koně je faktorem, který mikrobiotu koně ovlivňuje nejvíce. Mikrobiální komunitu ovlivňuje několik proměnných, včetně věku koně, jeho plemene, výživy, ale i sociálního chování, environmentálních podmínek (přístup k pastvě, intenzita práce, roční období) a používání probiotik či prebiotik (Theelen et al. 2021; Willette et al. 2021). Z velkého množství faktorů (zejména individuality zvířat) vyplývá, že definice „normálního mikrobiomu“ je obtížně definovatelná (Paßlack et al. 2020).

Citlivost střevního mikrobiálního společenství na vnější podmínky, jako jsou změny ve stravě, management chovu, výskyt nemocí či terapeutické intervence, nejsou dostatečně dobře pochopeny (Willette et al. 2021).

Je stále více důkazů, že na složení střevní komunity koní má významný vliv potrava. Střevní mikrobiota je poměrně stabilní při krmení stejnou krmnou dávkou. Byly pozorovány rozdíly při krmení senem, trávou či krmnou dávkou s vysokým obsahem tuku nebo sušiny (Schoster et al. 2015). Fekální komunitu může ovlivnit i dlouhá prodleva mezi krmením, zejména po více jak 10 hodinách bez krmiva. V takovém případě se mikrobiální společenstvo začíná vracet do normálního stavu do 24 hodin po podání krmiva (Willette et al. 2021). Vzhledem k tomu bychom měli omezovat náhlé změny v krmné dávce koní (zejména změny zahrnující zvýšení koncentrovaných krmiv), neboť střevní mikrobi (zejména mikroorganismy podílející se na štěpení vlákniny) jsou na tyto změny citliví (Collinet et al. 2021).

Schoster et al. (2015) uvádí, že transport, anestezie a hladovění mají významný vliv na fyziologické složení fekálního společenství. Autoři pozorovali změny v relativním zastoupení kmenů, tříd a řádů. Při transportu na krátkou vzdálenost došlo ke snížení výskytu *Firmicutes* a nárůstu *Pseudomonatoda*, ale nedošlo ke změně diverzity. V jimi provedené studii došlo u koní po transportu a hladovění ke snížení výskytu *Clostridiales*, které jsou jednou z hlavních složek střevní mikrobiální komunity koní.

Podle Willette et al. (2021) se fekální mikrobiota mění v závislosti na ročním období či povětrnostních podmínkách. Schoster et al. (2015) dále uvádí předpoklad, že prostá změna prostředí, ve kterém kůň žije, nemá vliv na změny střevního společenství.

Byl zjištěn vliv plemene na střevní mikrobiom (nebyl pozorován pouze u koní, ale i u prasat, přežvýkavců a kura domácího). Avšak zdá se, že plemeno koně má na fekální mikrobiom omezený vliv. Bylo ale zjištěno, že střevní mikrobiota koně Przewalského je rozmanitější než u domestikovaných koní. Analýza genu 16S rRNA odhalila větší diverzifikaci střevního mikrobiomu původních tažných koní v Japonsku oproti lehkým plemenům. Autoři Masacci et al. (2019) předpokládali, že rozdíly byly způsobeny tím, že původní tažní koně byli přizpůsobeni chladnému klimatu a horším stravovacím podmínkám (zimní lesní porost, kůra, větvičky, bambusová tráva, což mělo za následek větší populaci fibrolytických bakterií). Další zajímavostí je fakt, že byla zjištěna pozoruhodná podobnost u střevního mikrobiomu u plemen quarter horse, morgan, american paint horse a tenneseeský mimochodník. Vliv plemene koně na střevní mikrobiální komunitu je navíc také ovlivněn faktory prostředí (ustájení, geografie, výživa, management chovu) (Masacci et al. 2019).

Masacci et al. (2019) zjistili, že plemeno hannoverský kůň měl ze zkoumaných plemen největší diverzitu mikrobiální střevní komunity, koně plemene lusitano měli různorodost nižší.

Genetická výbava hostitele zřejmě utváří podobu střevního mikrobioty, přesto je její vliv pravděpodobně nízký (dědičnost 2–8 %) ve srovnání s faktory managementu chovu jako jsou krmení a pohybová aktivita. Rozsah, v jakém může genetická výbava jedince ovlivnit fekální mikrobiální složení zůstává neznámý (Masacci et al. 2019).

3.2 Biochar

Biochar (někdy také nazýván biouhel) je černý uhlíkatý materiál podobný dřevěnému uhlí, který vzniká z různých druhů biomasy v průběhu děje známého jako pyrolýza. Pyrolýza biocharu probíhá za nízkého přístupu kyslíku a při průměrné teplotě 700 °C (Schmidt et al. 2019; Lao & Mbega 2020;). Jedná se o porézní látku bohatou na uhlík, který v biocharu zůstává dlouhodobě uložen (EBC 2022).

Biochar je definován svými kvalitativními charakteristikami, použitými surovinami, udržitelnou výrobou a konečným použitím. Jedná se o velmi všestranný materiál se stále se rozšiřujícími možnostmi použití v zemědělství, environmentálním inženýrství a prvovýrobě (EBC 2022).

Biochar získal pozornost široké veřejnosti až po roce 2007, kdy byl navržen jako nástroj pro sekvestraci uhlíku. Od té doby se rozšiřují možnosti jeho agronomické, environmentální a průmyslové aplikace (Ok et al. 2015). Dnes se vyznačuje dostatečnou ekologicky udržitelnou výrobou, kvalitou a vlastnostmi použití (EBC 2022). Většina současného výzkumu biocharu (a aktivního uhlí) se zaměřuje na jeho potenciál při zmírňování změn klimatu, zlepšování vlastností půdy, nakládání s odpady a modulaci znečištění životního prostředí (Lao & Mbega 2020). Taktéž je možné biochar používat pro odstraňování těžkých kovů, pesticidů a dalších nežádoucích látek z vody (Hass & Lima 2018).

V současné době je evropský certifikát biocharu (European Biochar Certificate, zkráceně EBC) dobrovolným průmyslovým standardem v Evropě, ve Švýcarsku je však povinný pro veškerý biochar prodávaný pro použití v zemědělství (EBC 2022).

EBC zavedla řadu certifikačních tříd, bezpečnostní předpisy pro různé aplikace a také definuje, co lze a nelze považovat za biochar. Jednotlivé certifikační třídy mají vlastní požadavky, každý biochar a produkt na bázi biocharu musí být označen třídou a pod tou prodáván (například nelze prodávat biochar EBC-Agro jako stavební materiál) (EBC 2022).

Certifikační třídy biocharu podle EBC jsou následující:

- EBC-Feed – splňuje všechny požadavky EU ohledně krmiv, kromě této certifikace musí být výrobce schválen i jako producent krmiv.
- EBC-Agro – splňuje požadavky EU o hnojivech, některé země uplatňují ještě navíc vlastní požadavky, např. Německo požaduje minimální obsah uhlíku 80 % pro biochar z neupraveného dřeva.
- EBC-AgroOrganic – taktéž splňuje požadavky EU o hnojivech, navíc splňuje požadavky nařízení Komise EU o ekologické produkci, Švýcarsko vyžaduje tuto certifikaci (umožňují však pouze dřevní biomasu jako vstupní surovinu), EBC-Agro není dostačující.
- EBC-Urban – poskytuje standard pro biochar používaný při výsadbě stromů, údržbě parků, zdobení chodníků, okrasných rostlinách a odvodňování a filtraci dešťové vody. Hlavním rizikem těchto použití je riziko kontaminace podzemních a povrchových vod a bezpečnost práce. Například biochar aplikovaný do městské půdy bude fungovat jako adsorbent environmentálních toxinů (např. polyaromatické uhlovodíky z výfukových plynů automobilů). EBC-Urban lze také použít pro sanaci znečištěných půd, sedimentů, podzemních vod či pro produkci okrasných a nepotravinářských rostlin.
- EBC-ConsumerMaterials – určen pro použití v potravinářských produktech či v produktech, které mohou přijít do přímého kontaktu s pokožkou, například kelímky na kávu, zubní kartáčky, koberce, textilie, květináče. Biochar musí být součástí produktu tak, aby se z daného předmětu nevolňoval uhelný prach.
- EBC-BasicMaterials – zaručuje udržitelně vyráběný biochar, který lze použít v prvovýrobě, jako je například výroba stavebních materiálů, elektroniky, kompozitních materiálů (lože, lyže, auta) bez rizika pro životní prostředí a uživatele (EBC 2022).

3.2.1 Pyrogenní uhlíkaté materiály

Biochar, aktivní uhlí a také dřevěné uhlí jsou blízce příbuzné uhlíkaté materiály, které se mohou lišit svými vlastnostmi, aplikací, vstupní surovinou a výrobními postupy (Joch et al. 2022). Odlišují se zejména na základě způsobu aplikace (Man et al. 2020).

Rozdíl mezi aktivním, dřevěným uhlím a biocharem nemusí být v literatuře správně definován, je potřeba přísnějších pravidel pro používání těchto termínů (Willson et al. 2019).

3.2.1.1 Biochar

Biochar je vzhledem ke své šetrnosti k životnímu prostředí využíván pro nakládání s odpady, sanaci půd, snižování skleníkových plynů či pro výrobu energie. Dále je jeho využití, vzhledem k poréznímu povrchu, možné mimo jiné při úpravě půd, při čištění vod či pro absorpci znečišťujících látek ze vzduchu.

Biochar nejen snižuje množství uhlíku emitovaného do atmosféry, ale také je ekologickou náhradou aktivního uhlí a dalších uhlíkatých materiálů (Cha et al. 2016).

Man et al. (2020) uvádí, že oproti aktivnímu uhlí prochází biochar aktivací při použití pro zlepšení půdních vlastností, ale při využití jako přísady do krmiv pro zvířata není aktivace nutná.

3.2.1.2 Dřevěné uhlí (charcoal)

Spolu s biochary se používá pro řadu přínosů pro životní prostředí, pro sekvestraci (vázáni uhlíku z atmosféry) uhlíku, zmírnění globální změny v klimatu a zlepšení kvality půdy a produktivity plodin (Toth & Dou 2015).

Na rozdíl od biocharu se dřevěné uhlí historicky používalo jako palivo pro vytápění a vaření (Man et al. 2020). V dnešní době je vyráběno jak pro topné, tak pro průmyslové účely (Kloss et al. 2012) (například v metalurgii) (Lehmann & Joseph 2015).

Vstupní biomasou pro pyrolýzu dřevěného uhlí je dřevo. Vznikající dřevěné uhlí neprochází aktivací (na rozdíl od aktivního uhlí či biocharu) (Man et al. 2020).

3.2.1.3 Aktivní uhlí

Aktivní uhlí je porézní uhlíkatý materiál, který lze vyrobit karbonizací a aktivací biologických organických látek. Má četné možnosti využití ve vědě, lékařství či v potravinářském průmyslu (doplněk stravy) (Edmunds et al. 2016).

Biomasa prochází při výrobě aktivního uhlí pyrolýzou za vysoké teploty a následně aktivací prostřednictvím chemických aktivačních činidel (kyseliny, anorganické soli, aktivační plyny jako je pára či oxid uhličitý) (Man et al. 2020).

Je známý jako jeden z nejstarších léků na poruchy trávení u lidí i zvířat (Schmidt et al. 2019). Jeho používání pro lékařské účely sahá až do starověku v řadě kultur po celém světě (Toth & Dou 2015).

U mnoha druhů hospodářských zvířat (včetně koní) bylo živočišné uhlí podáváno ke zmírnění řady zažívacích problémů, např. koliky, plynatosti, endotoxémie, stavů po požití toxinů. To vše jsou stavy, které se vyskytují často a podávání aktivního uhlí lze díky adsorpčnímu účinku (vychytávání většiny léků a četných toxinů) považovat za relativně jednoduchou a účinnou léčbu, často účinnější než vypumpování žaludku (Edmunds et al. 2016; Schmidt et al. 2019).

Podle Schmidt et al. (2019) opakovaný příjem aktivního uhlí (či biocharu) zrychlil eliminaci mnoha průmyslových a environmentálních toxinů (např. dioxiny a polychlorované bifenylly = PCB) a látek jako je aspirin, karbamazepin, dapson, dextropropoxyfen, srdeční glykosidy a dalších (Schmidt et al. 2019).

3.2.2 Výroba biocharu

3.2.2.1 Vstupní suroviny

Společnou charakteristikou všech zdrojů biomasy je efektivita nákladů, šetrnost k životnímu prostředí a také schopnost zlepšit recyklaci organických odpadů vzniklých v zemědělství, lesnictví a zpracovatelském průmyslu (Lao & Mbega 2020). Využití rostlinných zbytků a další sekundární rostlinné biomasy je žádoucí pro ochranu klimatu a pro uzavření koloběhu živin (EBC 2022).

Suroviny pro výrobu biocharu se liší svým složením, přítomností částic prachu, obsahu vlhkosti, ligninu, celulózy a hemicelulózy, které ovlivňují vlastnosti daných biocharů po pyrolýze (Kloss et al. 2012).

Kloss et al. (2012) například v průběhu studie jako vstupní surovinu pro výrobu biocharu používali pšeničnou slámu, topolové či smrkové dřevo.

Schmidt et al. (2019) zmiňuje jako další druhy biomasy pro tvorbu biocharu například skořápky kokosových ořechů, rýžové slupky, bambus, kukuřičný klas, dřevo či slámu.

Pyrolýzou nerostlinné biomasy jako jsou čistírenské kaly, chlěvská mrva, hnůj obsahující bioplynové digestáty, kosti a jateční odpady, mohou také vznikat cenné suroviny využitelné v biohospodářství a pro ochranu klimatu. Tyto suroviny však zatím nejsou v seznamu povolených surovin EBC. Ze seznamu jsou také vyloučeny suroviny s chemickými přísadami, suroviny kontaminované, nebo s rizikem kontaminace z nekontrolovatelného zdroje (např. chemicky ošetřené dřevo, papírenské kaly apod.) (EBC 2022).

Přestože kontaminovaná surovina není v krmivu povolena, stopové kontaminace (např. léčivy či mykotoxiny) nelze zcela vyloučit. Aby byla zajištěna jejich pyrogenní degradace, musí být teplota pyrolýzy alespoň 500 °C po dobu alespoň 10 minut (EBC 2022).

Zdá se, že pro produkci biocharu určeného pro krmení hospodářských zvířat doposud není žádný preferovaný druh používané vstupní biomasy a více záleží na dodržení standardů výroby (Schmidt et al. 2019). EBC (2022) uvádí, že pro výrobu krmného biocharu je vhodná čistá rostlinná biomasa (nekontaminovaná, neobsahující chemické látky apod.). Biochar určený jako krmné aditivum by měl projít pyrolýzou při teplotě v rozmezí 350–1100 °C po dobu 3 minut až 12 hodin. Dále by se pro splnění požadavků nařízení EU pro výrobu biocharu jako krmiva pro zvířata teplota pyrolýzy neměla v průběhu procesu lišit o více než 20 % (Man et al. 2020).

3.2.2.2 Pyrolýza

Pyrolýza je proces tepelného rozkladu biomasy rostlinného původu za podmínek s nedostatkem či úplnou absencí kyslíku (Kloss et al. 2012).

Ještě před vstupem do procesu pyrolýzy je nezbytná přísná kontrola surovin, protože možné nečistoty (kusy kovu, plastu, skla, kamenů) kontaminující biochar představují potenciální riziko pro bezpečnost krmiv. Také je nutné kontrolovat zařízení na pyrolýzu (chybějící šrouby, oděr zařízení), aby se do biocharu nedostávaly kovové a jiné nečistoty. Proto se doporučuje nechat biomasu projít magnetickým separátorem kovů, odlučovačem kamenů a také pomlít na < 3 mm (silikát a kámen nejsou toxické ani škodlivé) (EBC 2022).

Pro výrobu biocharu jsou nedostatečné tradiční pece na výrobu dřevěného uhlí. Moderní zařízení na pyrolýzu a také určité moderní typy pecí jsou v dnešní době připraveny na energeticky efektivní výrobu biocharu z velkého množství různých surovin, bez negativního dopadu na životní prostředí. I přes to však může existovat riziko využívání zastaralých biotechnologií, kdy se většina původního uhlíku ze suroviny uvolňuje jako toxické emise do atmosféry. Pokud jsou pyrolytické plyny zachyceny a čistě spáleny či využity (např. jako bioolej pro chemický průmysl), dopad na životní prostředí je neutrální či dokonce lepší ve srovnání se spalováním biomasy (EBC 2022).

Jsou známy tři hlavní faktory, které mají velký vliv na vlastnosti vzniklého biocharu, jedná se o teplotu během pyrolýzy, délku pyrolýzy a typ použité biomasy (Lao & Mbega 2020).

Teplota pyrolytického procesu závisí na charakteru používané biomasy; např. dřevěná biomasa může vyžadovat teploty vyšší 1000 °C, naopak biomasa ze zemědělskopřůmyslových odpadů může být pyrolýzována již za teplot kolem 300 °C. Vyšší teploty často vedou ke vzniku biocharů s větší povrchovou plochou ve srovnání s použitím nízkých teplot (Lao & Mbega 2020).

Pyrolýza musí být energeticky efektivní. Cca 35–60 % energie obsažené v surovině biomasy je nakonec obsaženo v pyrolytickém plynu, který je obvykle spalován v pyrolýzní jednotce. Část této energie se využívá k ohřevu biomasy pro pyrolýzu. Přebytečné teplo se používá např. na sušení biomasy, vytápění či výrobu elektřiny (EBC 2022).

Během pyrolýzy prochází biomasa řadou fyzikálních, chemických a molekulárních změn. Dochází ke ztrátě hmoty, tudíž i ke zmenšení objemu, nedochází však k velké změně původní struktury suroviny. Také dochází ke změnám v poměrech C/N, O/C, pórovitosti a plochy povrchu (Kloss et al. 2012).

V průběhu pyrolýzy se tvoří mimo jiné aromatický uhlík, uhličitany a množství různých těkavých organických sloučenin, které tvoří velkou část pyrolytického plynu, který kondenzuje na povrchu a pórech biocharu. Pyrolytické plyny zároveň nesmí uniknout do atmosféry, musí být využity znovu nebo spáleny (EBC 2022).

Byl studován vliv využití jednotlivých druhů surovin a vliv teploty v průběhu pyrolýzy na kvalitu a charakteristiky biocharu. I přes to neexistuje dostatek znalostí o tvorbě potenciálně toxických sloučenin, které po pyrolýze zůstávají v biocharu (Kloss et al. 2012). Pyrolytické produkty ze surovin, které nejsou uvedeny na seznamu vhodných surovin EBC (např. průmyslové odpady a fosilní uhlík jako hnědé uhlí) by neměly být považovány za biochar a nesmí se s nimi obchodovat pod značkou EBC. Certifikační třída EBC-BasicMaterials definuje, co lze považovat za biochar a co už ne. Látky vzniklé pyrolýzou, které překračují limitní hodnoty EBC-BasicMaterials musí být považovány za (potenciálně) toxický odpad a musí být jako odpadní materiál zlikvidovány (EBC 2022).

3.2.2.3 Aktivace

Ke zlepšení účinnosti pyrogenních uhlíkatých materiálů se používají fyzikální a chemické techniky aktivace (Lao & Mbega 2020).

Aktivní uhlí prochází aktivací vždy a dřevěné uhlí se běžně neaktivuje vůbec (Man et al. 2020). Biochar podle Man et al. (2020) prochází chemickou či fyzikální aktivací v případě jeho následného využití do půdy, ale při použití jako krmného aditiva se aktivace biocharu spíše neprovádí.

Fyzikální aktivace pyrogenních uhlíkatých materiálů se někdy nazývá aktivace plynem, protože se pro tuto metodu využívá plyn, zejména CO₂, ozon či pára (Cha et al. 2016). Při fyzikální úpravě zahrnuje první fáze karbonizaci biomasy, přičemž materiály procházejí pyrolýzou při teplotách 300–1000 °C v inertních podmínkách tvořených plynným dusíkem a argonem. Aktivace karbonizovaných materiálů se provádí jejich vystavením oxidačnímu stavu v přítomnosti kyslíku či vodní páry při teplotách až 1200 °C (Lao & Mbega 2020).

Pro chemickou aktivaci se biomasa připravená k pyrolýze impregnuje chemikáliemi, nejlépe silnou zásadou, kyselinou či solí, například kyselinou sírovou (H₂SO₄), hydroxidem draselným (KOH), chloridem zinečnatým (ZnCl₂), hydroxidem sodným (NaOH), či chloridem vápenatým (NaCl₂). Následně prochází biomasa procesem karbonizace při mírně nižších teplotách (cca 700 °C) než při fyzikální aktivaci (Lao & Mbega 2020). Man et al. (2020) podotýká, že pokud materiály projdou chemickou aktivací zásadou či kyselinou, měla by být tato aktivační činidla odstraněna vodou před použitím biocharu jako přísady do krmiva.

Chemická aktivace je preferovanější než fyzikální aktivace, zejména kvůli nižší používané teplotě a kratšímu času potřebnému k aktivaci biocharu (Lao & Mbega 2020).

Aktivace biocharu pomocí fyzikálního či chemického zpracování zahrnuje přeměnu biocharu na aktivovaný biochar, které je poréznější, má zlepšený obsah uhlíku a povrchovou plochu, nízký obsah popela, nízkou vlhkost a dlouhou životnost (Lao & Mbega 2020). Aktivace biocharu výrazně zvyšuje povrchovou plochu, zejména otevřením mikropórů (Schmidt et al. 2016).

Schmidt et al. (2016) podotýká, že aktivace biocharu nemusí být u krmného biocharu výhodou, protože vzniklé mikropóry mohou být příliš malé na absorbování převážně velkých molekul a bakteriálních patogenů, které jsou pro trávení zvířat důležité.

3.2.3 Vlastnosti biocharu

Biochar je vysoce porézní, odolný a nerozpustný organický materiál (Lao & Mbega 2020). Jeho vlastnosti jsou ovlivněny řadou faktorů. Strukturní vlastnosti jsou ovlivněny složením vstupní suroviny (obsah celulózy, hemicelulózy, ligninu), podmínkami zpracování (aktivace, sušení surovin), použitou teplotou při pyrolýze či délkou pyrolytického procesu (Man et al. 2020).

Hmotnost původní biomasy se během pyrolýzy sníží o více než 50 % v důsledku ztráty uhlíku, vodíku a kyslíku. Oproti tomu nedochází ke ztrátám například těžkých kovů, což vede k jejich zvýšené koncentraci. Koncentrační účinek však nebývá kritický, pokud biomasa nerostla na kontaminovaných půdách či nebyla kontaminována odpady. Nadlimitní hodnoty vyžadují další kontroly biomasy, přesto je nebezpečí úniku těžkých kovů do prostředí malé (EBC 2022).

Charakteristiky a vlastnosti biocharů se mění s použitou vstupní surovinou a teplotou pyrolýzy. Přesto tyto dva faktory stále nejsou dostatečně prozkoumány (Kloss et al. 2012; Lu et al. 2021). Například biochary ze slámy vykazují vyšší obsah popela a stopových i rozpustných prvků, ale nižší tepelnou stabilitu ve srovnání s biochary získanými ze dřeva. Se zvyšující se teplotou pyrolýzy se zvyšuje aromaticita a akumuluje se více uhlíku (Kloss et al. 2012). Vyšší teploty pyrolýzy také vedou ke vzniku menších částic u výsledného biocharu, přičemž velikost částic je jedním z hlavních faktorů při použití biocharu jako doplňku krmiva přežvýkavců. Hrubé částice biocharu mají ve srovnání s jemnějšími částicemi nižší stravitelnost píče a v bacheru méně fermentují (Man et al. 2020).

V závislosti na vstupní surovině a podmínkách pyrolýzy obsahuje biochar 40–80 % uhlíku, 0,1–0,8 % dusíku, 1–2 % draslíku a 5–6 % vápníku (Willson et al. 2019). EBC (2022) uvádí obsah organického uhlíku v biocharu v rozmezí 35–95 % sušiny v závislosti na surovině biomasy a teplotě pyrolýzy. Například pyrolyzovaná sláma obsahuje obvykle 40–50 % a dřevo či ořechové skořápky 70–90 % uhlíku (EBC 2022).

Molární poměr H/C je indikátorem stupně karbonizace a tím i stability biocharu. Poměr O/C je pro charakterizování biocharu a jeho odlišení od ostatních produktů karbonizace (EBC 2022).

Kromě organického materiálu se biochar skládá také z minerálních sloučenin. Minerály, které je možné nalézt v biocharech, zahrnují SiO_2 , CaCO_3 , KCl, CaSO_4 , dusičnany, oxidy či hydroxidy (Kloss et al. 2012).

Vyšší pyrolytická teplota mění i minerální složení biocharu. Obsahy fosforu, draslíku, vápníku, hořčíku, zinku, železa a manganu rostou s vyšší použitou teplotou při pyrolýze, naopak obsah dusíku klesá. Tyto změny jsou klíčové při používání biocharu jako doplňku krmiva vzhledem k rozdílným potřebám minerálních prvků u různých zvířat (Man et al. 2020).

Obsah makro a mikroprvků v různých biocharech závisí na výběru suroviny. Obsah látek v biocharu musí být deklarován alespoň pro dusík, fosfor, draslík, hořčík, vápník a železo. Pro použití v zemědělství a chovu zvířat jsou informace o chemickém složení ze zákona vyžadovány, pro materiálové použití jsou obsahy prvků méně relevantní. Přesto mohou v závislosti na aplikaci ovlivnit určité vlastnosti materiálu, zejména při vyšším obsahu vápníku, draslíku a hořčíku (při přidání do krmiva mohou ovlivnit poměr mezi prvky). Proto je deklarace chemického složení povinná také pro třídy certifikace materiálů (EBC 2022).

Většina biocharů je zásadité povahy (McAvoy et al. 2020). Vysoké hodnoty pH jsou způsobeny akumulací bazických kationtů v biocharu. K alkalitě biocharů přispívá také tvorba kalcitu při pyrolýze za vyšší teploty (stopy kalcitu již od teploty 460 °C) (Kloss et al. 2012). M al. (2015) zmiňují, že silně alkalický biochar vzniká při vyšší teplotě pyrolýzy u vstupních surovin s velkým množstvím popela (např. tráva či rýžové slupky).

Díky rozmanitosti vlastností biocharu je důležité si před výběrem biocharu definovat, k jakému účelu má biochar sloužit (Kloss et al. 2012).

3.2.3.1 Adsorpce

Biochar má vysokou adsorpční kapacitu pro plyny, patogeny, těžké kovy a řadu různých toxinů jako jsou mykotoxiny, rostlinné toxiny, pesticidy a také toxické metabolity nebo patogeny (Schmidt et al. 2019; Joch et al. 2022). Schmidt et al. (2019) zmiňuje, že biochar má obzvláště silnou adsorpční nebo supresivní kapacitu pro gramnegativní bakterie (např. *E. coli*) s vysokou metabolickou aktivitou.

Adsorpční terapie využívající aktivovaný biochar jako nestravitelný sorbent je považována za jeden z nejdůležitějších způsobů prevence škodlivých nebo smrtelných účinků orálně požitých toxinů (Schmidt et al. 2019).

Z toxikologického hlediska je většina účinků biocharu založena na jednom či několika následujících mechanismů:

- Selektivní adsorpce některých toxinů
- Koadsorpce krmných látek obsahujících toxin
- Adsorpce následovaná chemickou reakcí ničící toxin
- Desorpce dříve adsorbovaných látek (v dřívější fázi trávení) (Schmidt et al. 2019).

Výhodou použití biocharu je jeho vlastnost „enterální dialýzy“. To znamená, že již adsorbované lipofilní a hydrofilní toxiny mohou být biocharem odstraněny z krevní plazmy, protože adsorpční síla velkého povrchu biocharu interaguje s vlastnostmi propustnosti střeva (Schmidt et al. 2019).

Adsorpční kapacita závisí zejména na specifickém povrchu, povrchovém náboji a velikosti a rozmístění pórů. Aktivací biocharu se výrazně zvýší jeho specifický povrch (z cca 300 m² na více jak 900 m²), nárůst povrchu je nicméně způsoben především otevřením mikropórů. To znamená, že aktivace biocharu nemusí nijak významně zvýšit specifickou adsorpční kapacitu pro určité látky či organismy, ale lze toho dosáhnout pouze úpravou parametrů pyrolýzy (Schmidt et al. 2019).

3.2.3.2 Redoxní aktivita

Ačkoliv schopnost adsorpce je u biocharu nejvýznamnější, k vysvětlení jeho pozitivních účinků nestačí. Redoxní aktivita biocharu je obecně přehlížena, ale důležitá funkce biocharu (Schmidt et al. 2019).

Biochary fungují jako tzv. geobaterie a geovodiče, které mohou přijímat, uchovávat a zprostředkovávat elektrony z biochemických reakcí a pro chemické reakce. Vysokoteplotní biochary (teplota pyrolýzy nad 600 °C) bývají dobrými geovodiči, nízkoteplotní biochary (teplota pyrolýzy v rozmezí 400–500 °C) fungují naopak jako geobaterie, především díky fenolovým a chinonovým povrchovým skupinám. Díky tomu mohou vysokoteplotní i nízkoteplotní biochary působit jako elektronové mediátory v biotických i abiotických redoxních reakcích (Schmidt et al. 2019).

Biochar může elektrony přijímat a darovat. Elektrická vodivost biocharu však není založena na kontinuálním toku elektronů (jako např. u měděného drátu), ale na diskontinuálním přesakování elektronů (Schmidt et al. 2019).

Při mikrobiálním rozkladu organických látek v gastrointestinálním traktu potřebují trávicí mikrobi akceptor elektronů hromadících se při degradaci organických molekul. Protože elektrony neexistují ve volném stavu za podmínek okolního prostředí a nemohou být buňkami skladovány ve větším množství, jsou organismy závislé na donoru (např. metabolizovaná organická hmota) a akceptoru elektronu. Redoxní reakce jsou reakce, kde jsou molekuly či atomy darující elektron (donory) spojeny elektrochemickými reakcemi s molekulami či atomy elektron přijímající (akceptor). Těchto reakcí se mohou účastnit ještě elektronové mediátory, které spojení přemostují (Schmidt et al. 2019).

Biochar může působit jako elektronový mediátor (zprostředkovatel elektronů), čehož se využívá při jeho přidavku do krmiva. Dobře vyvážený režim krmení zvířat by měl obsahovat dostatek látek zprostředkujících elektrony, ale u vysokoenergetických diet používaných v intenzivních chovech hospodářských zvířat bývá jejich zásoba nedostatečná. Biochar či jiné netoxické elektronové mediátory se přidávají pro zlepšení efektivity průběhu redoxních reakcí, což může následně zvýšit efektivitu příjmu krmiva (Schmidt et al. 2019).

3.2.4 Využití biocharu v zemědělství

Z hlediska zemědělství je nejvíce rozšířené používání biocharu při úpravě a zlepšování půdních vlastností. Konkrétně se jedná o zlepšení produktivity rostlin, vlastnosti půdy zadržovat vodu či zlepšení dostupnosti půdních živin (Lehmann & Joseph 2015).

Hnojivo vzniklé přidáním biocharu může význačně zvýšit výnosy (biochar zvyšuje dostupnost živin v hnoji). První možností získání tohoto hnojiva je přímé smíchání biocharu s organickou hmotou (hnůj, močůvka, kompost). Druhou možností je zkrmování biocharu, který při průchodu trávicím traktem zachycuje organické i minerální sloučeniny, váže je ve své porézní struktuře a tím obohacuje odcházející výkaly (Schmidt et al. 2019).

Biochar se rozkládá pomaleji než původní biomasa, tudíž jako hnojivo způsobuje nižší ztráty živin a také nižší emise skleníkových plynů během skladování i při aplikaci do půdy (Schmidt et al. 2019). Po aplikaci do půdy je biochar stabilní po desetiletí až staletí a ukládá tak uhlík, který byl z atmosféry odstraněn fotosyntézou (i proto je diskutován jako jedna z nejslibnějších negativních emisních technologií) (Hagemann et al. 2018). Také bylo zjištěno, že biochar zvyšuje pufrací kapacitu půdy (schopnost vyrovnávat změny v pH) (Shi et al. 2017).

Vhodnost biocharu k použití do půdy závisí na vstupní surovině a teplotě při pyrolýze, neboť může mít silný dopad na stabilitu nativní organické hmoty půdy a půdních organismů. Mimo to mohou představovat i potenciální ekotoxikologické problémy. Proto je důležité, aby biochary byly zkoumány nejen z hlediska příznivého přínosu, ale i ekotoxikologických rizik (Kloss et al. 2012; Lu et al. 2021).

Dalším možným využitím biocharu je jeho přidávání do krmiva hospodářských zvířat. Účinky a využití biocharu při úpravě půdy jsou však mnohem více prozkoumány (Schmidt et al. 2019).

3.2.5 Využití biocharu ve výživě zvířat

Na první pohled se může zdát poněkud nepřírozené krmit zvířata biocharem či dřevěným uhlím, ale ve skutečnosti i divocí savci občas jedí biochar pokud jej mají k dispozici (např. dřevěné uhlí po divokých přírodních požárech). Bylo pozorováno, že losi a jeleni okusují dřevo ze spálených stromů v Yellowstonském národním parku. Také u domácích psů byla zaznamenána konzumace briket z dřevěného uhlí. Malá opice zanzibarská (*Procolobus kirkii*) pravidelně konzumuje dřevěné uhlí, aby lépe trávila mladé listy indické mandle, přičemž vědci dodatečnými adsorpčními testy zjistili u daného dřevěného uhlí překvapivě dobrou adsorpci organických látek (Schmidt et al. 2019).

Materiál podobný biocharu, aktivní uhlí, je používán pro akutní léčbu zvířat již po mnoho staletí. V posledním desetiletí se začal používat biochar jako nadějný krmný suplement (obvykle v přídávku 1–40 g/kg příjmu sušiny do krmné dávky) pro zlepšení zdraví zvířat, efektivitu krmiva a produkci u zvířat (Joch et al. 2022).

Ve Spojených státech není biochar veden jako schválená složka krmiva, ačkoliv jeho bezpečnost používání jako přídávku do krmiv je potvrzena chemickými analýzami (McAvoy et al. 2020). V Evropě, jmenovitě v Německu, Rakousku a Švýcarsku je však široce používán jako běžný doplněk krmiva v chovu skotu (Schmidt et al. 2019).

Kritéria pro výrobu krmného biocharu jsou přísnější než pro ostatní způsoby jeho využití. Pro výrobu biocharu ke krmným účelům je povoleno používat pouze biomasu ze seznamu povolených surovin. Tyto suroviny nesmí obsahovat organické či anorganické nečistoty (barvy, rozpouštědla, plasty apod.) a měly by být 100 % biologického původu (Man et al. 2020).

Biochar by neměl být zkrmován bez kompletní analýzy a kontroly všech relevantních parametrů současných krmivářských předpisů. Analýzu by měla provádět akreditovaná laboratoř specializující se na biochar a analýzu krmiv (Schmidt et al. 2019).

3.2.5.1 Použití ve výživě zvířat

Kvalitní biochar je netoxický, dokonce požitelný. Z toho důvodu se začal využívat i v chovu zvířat (Schmidt et al. 2019). Jedná se o potenciálně účinnou krmnou přísadu pro zlepšení trávení potravy a zdraví střev (Joch et al. 2022).

Na základě výborných adsorpčních vlastností biocharu ve vztahu k pesticidům, insekticidům a herbicidům, které se stále častěji vyskytují v krmivech pro zvířata, je biochar používán jako přísada do krmiva. Zvláště důležitou vlastností biocharu je jeho vlastnost adsorpce glyfosátu, herbicidu, který v současnosti kontaminuje většinu krmiv vyráběných z geneticky modifikované kukuřice, řepky a sóji (Schmidt et al. 2019). Biochar se přidává do krmiv pro hospodářská zvířata i za účelem adsorpce a odstranění znečišťujících látek a těžkých kovů. Ty se do těl zvířat dostávají převážně kontaminovanou potravou (znečištění životním prostředím, hmyzem, činností mikrobů) (Man et al. 2020).

Pokud je zabráněno tvorbě prachu z biocharu (podává se vlhký), lze biochar přidávat do všech běžných krmných směsí a obvykle se dá mísit se všemi běžnými krmivy (Schmidt et al. 2019). Krmný biochar se obvykle míchá s krmivem v množství cca 0,1 % až 0,4 % denního příjmu krmiva (Man et al. 2020). Kvalitní biochar je možné také přidávat do pitné vody pro zvířata. V případně akutní intoxikace by měl být podán ve vodné suspenzi (Schmidt et al. 2019).

Od roku 2010 je biochar stále častěji chovateli hospodářských zvířat používán jako doplněk do krmiva ke zlepšení zdraví zvířat, zvýšení účinnosti příjmu krmiva a také jejich produktivity. Zároveň se biochar po vyloučení z těla zvířete stává cenným organickým hnojivem, neboť se v průběhu trávení obohacuje o organické sloučeniny bohaté na dusík (Schmidt et al. 2019).

Od roku 2012 používají biochar němečtí a švýcarští farmáři při výrobě siláže ke stabilizaci mléčného kvašení, snížení rizika napadení plísněmi a tvorby mykotoxinů. Zdá se, že schopnost biocharu zadržovat vodu tlumí v siláži obsah vody a snižuje tvorbu přebytečných fermentačních kapalin (Schmidt et al. 2019).

Mechanismy biocharu v průběhu trávení u zvířat začaly být zkoumány poměrně nedávno, proto většina výsledků v této oblasti pochází z empirických výzkumů. Většina dostupných publikací na účinky biocharu u hospodářských zvířat se zaměřuje na jeho využití ve výživě drůbeže. Důvodem pro to je jednoduchost provedení a menší nákladovost než u studií na velkých přežvýkavcích či prasatech (Schmidt et al. 2019).

Při podávání biocharu byly u hospodářských zvířat pozorovány některé z následujících účinků:

- Zvýšení příjmu krmiva
- Přibírání na hmotnosti – v pozitivním ohledu
- Zvýšená účinnost krmiva
- Vyšší produkce a kvalita vajec u drůbeže – například zlepšení síly vaječných skořápek či zvýšení obsahu kolagenu ve vejcích (prodlužuje jejich trvanlivost)
- Posílení imunitního systému
- Zlepšení kvality masa – v některých studiích bylo např. zjištěno zlepšení kvality tržního masa a složení vepřového tuku, se zvýšením obsahu nenasycených mastných kyselin a snížením nasycených tuků a lepší skladovatelnost masa
- Snížení veterinárních nákladů
- Potenciál nahrazení antibiotik podporujících růst biocharem – v některých zemích stále není zakázáno podávání těchto antibiotik, biochar nemá negativní vedlejší účinky na životní prostředí jako antibiotika (Schmidt et al. 2019)
- Podpoření růstu a míry přežitelnosti u ryb (Man et al. 2020)

Kromě potenciálních účinků při vázání toxinů není u biocharu zcela pochopen mechanismus, kterým může zvýšit příjem krmiva u hospodářských zvířat (McAvoy et al. 2020).

Krmení krmivem s přídatkem biocharu může u zvířat pomoci i při napadení parazity. Například u koz může snížit výskyt tasemnic a oocyst kokcií. U skotu může biochar účinně imobilizovat rotaviry a koronaviry. U telat trpících průjmami kvůli parazitárním prvokům *Cryptosporidium parvum* po přidavku biocharu významně klesá počet oocyst ve výkalech (Schmidt et al. 2019).

Biochar taktéž může poskytnout rozsáhlé plochy pro mikrobiální růst a zlepšit účinnost mikrobiální fermentace díky své porézní struktuře, velké povrchové ploše a vlastnostem zprostředkování elektronů v biologických redoxních reakcích (Joch et al. 2022).

Přídavek biocharu do krmné dávky má potenciál zlepšit klima v ustájení zvířat či snížení emisí skleníkových plynů. Kromě toho může v kombinaci s podestýlkou (sláma, piliny) snižovat výskyt onemocnění drápů u drůbeže, paznehtů u skotu či omezit nežádoucí pachy (Schmidt et al. 2019).

Přidávání biocharu je také možný způsob snížení produkce metanu a zvýšení energie pocházející z příjmu krmiva (Elghandour et al. 2018). Jedním z důvodů snížení emisí metanu po podávání biocharu skotu by mohl být přenos elektronů mezi biocharem a mikroorganismy (Schmidt et al. 2019). Mimo to větší povrchy biocharu přispívají ke zvýšení populací metanotrofních mikrobů, které snižují produkci metanu. To také vede ke zlepšení účinnosti krmiva (McAvoy et al. 2020).

Snižování emisí skleníkových plynů je důležitým aspektem udržitelnosti planety. U přežvýkavců je produkován ve větším množství (skot produkuje 200–500 l metanu denně), ale například rostoucí populace koní může zvýšit i jejich podíl na produkci skleníkových plynů, přestože jako monogastři vykazují jejich menší produkci (stejně jako u dalších monogastrických býložravců až 80 l/den). Také bylo prokázáno, že různé biochary mají různé účinky na snižování emisí metanu. To se pravděpodobně odvíjí od teploty pyrolýzy a druhu vstupní biomasy, což jsou kritéria ovlivňující přenos elektronů mezi různými bakteriálními druhy (Elghandour et al. 2018; Schmidt et al. 2019). Výsledky studií z Evropy, Ameriky a Nového Zélandu nicméně naznačují, že samotný přírůstek biocharu (bez dusičnanů jako zdroje kyslíku nebo jako akceptoru elektronů) nemusí emise metanu z trávicího traktu skotu snižovat (Schmidt et al. 2019).

Bylo pozorováno, že biochar jako složka krmiva může zlepšit stravitelnost potravy u prasat a přežvýkavců, stejně tak fermentaci v bachoru u přežvýkavců (McAvoy et al. 2020). McAvoy et al. (2020) zmiňují, že pokud byla skotu či ovcím v průběhu studie nabídnuta krmná dávka s přírůstkem biocharu a bez ní, zvířata více preferovala krmnou dávku bez biocharu, avšak i přes nízkou preferenci krmiva s biocharem došlo u daných jedinců ke zlepšení stravitelnosti krmiva.

Jednou z dalších výhod biocharu je mírnění nepříznivých účinků látek, které se přirozeně vyskytují v krmivech a mohou být potenciálně škodlivé, například taniny (třísloviny). Taniny jsou sloučeniny, které se vyskytují v krmivech s vysokým obsahem bílkovin (například v luštěninách) a jejich výrazná chuť může zvířata odpuzovat, což snižuje stravitelnost krmiv a přírůstek hmotnosti (Schmidt et al. 2019).

Negativní účinky biocharu na zvířata byly obecně ve studiích pozorovány ojediněle. Za hlavní rizika dlouhodobého podávání biocharu můžeme považovat změnu složení střevního mikrobiomu a potenciální ztrátu některých léčiv či krmných živin (např. složek rozpustných v tucích – vitaminů, karotenoidů (Schmidt et al. 2019), či minerálů), neboť je některé biochary mohou kvůli svým relativně nespecifickým sorpčním vlastnostem vázat a imobilizovat (Joch et al. 2022).

3.2.5.2 Použití biocharu u koní

Funkční vlastnosti biocharu a výsledky u jiných druhů hospodářských zvířat naznačují, že koně mohou mít prospěch z kontinuálního krmení biocharem. Konkrétně u nich biochar může zvýšit účinnost mikrobiální fermentace a stravitelnost krmiva. Také může zlepšit celkový zdravotní stav adsorpcí toxinů a plynů, zabránit acidóze tlustého střeva či ji alespoň zmírnit pufrováním pH (Joch et al. 2022).

Joch et al. (2022) naznačuje, že dietní zařazení biocharu do krmné dávky může být bezpečným a levným opatřením pro zamezení překyselení obsahu tlustého střeva u koní, neboť v průběhu výzkumu autoři zaznamenali zvýšené fekální pH po přidání biocharu do krmné dávky.

4 Metodika

Experiment proběhl v experimentální stáji Výzkumného ústavu živočišné výroby v Praze (Netluky, Česká republika). Experimentální protokol byl schválen Etickou komisí Výzkumného ústavu živočišné výroby. S koňmi bylo zacházeno v souladu s platnou legislativou České republiky a Evropské unie (směrnice 2010/63/EU, o ochraně zvířat používaných pro výzkumné účely).

4.1 Biochar

Biochar používaný jako přídatek do krmné dávky v průběhu experimentu byl vyroben v procesu o 2 fázích ve dvouhořákovém zplyňovacím kotli. Vstupní surovinou pro výrobu bylo měkké smrkové dřevo.

V první fázi prošlo měkké smrkové dřevo procesem pyrolýzy při 500–600 °C po dobu 3–6 hodin. Ve druhé fázi došlo k částečné oxidaci těkavých látek biomasy při teplotě cca 900 °C a následné auto-aktivaci biocharu vodní párou a oxidem uhličitým při teplotách postupně se snižujících z 900 °C na 750 °C v průběhu 1 hodiny.

Výsledkem procesu byl biochar s vysokým obsahem uhlíku, popela, velkou pórovitostí a vyšším pH (oproti původní biomase). Charakteristiky a vlastnosti získaného biocharu byly uvedeny do tabulky (Tabulka 1). Přestože biochar použitý v experimentu nebyl oficiálně certifikován, splňoval normu European Biochar Certificate (EBC) pro zkrmování biocharu hospodářským zvířatům.

Podíl jednotlivých velikostních frakcí biocharu byl stanoven proséváním 200 g biocharu po dobu 10 minut za použití testovacích sít s velikostmi ok 0,5, 2 a 5 mm (Retsch, Haan, Německo) a vibrační síťové třepačky (Analysette 3 Pro, Fritsch, Idar-Oberstein, Německo). Příslušná frakce byla vypočtena jako poměr hmotnosti frakce ku vstupním 200 g biocharu. Vzorek byl před analýzou složení sušen při 180 °C ve vakuu (<1 Pa) po dobu 12 hodin, aby se uvolnila eventuálně absorbovaná vlhkost. Měření fyzisorpce dusíku za kryogenních podmínek (77,35 K) byla provedeno pomocí ASAP 2020 a ASAP 2050 automatizovaných přístrojů pro objemovou adsorpci plynu (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, USA). Po hodině v rotátoru (Multi Bio RS-24, Biosan, Riga, Lotyšsko) a 30 minutách stání bylo měřeno pH vzorků biocharu v poměru 1:10 s vodou pomocí pH měřiče (inoLab pH/Cond Level 1, SenTix 41 elektroda, WTW, Weilheim, Německo). Celková alkalita byla stanovena reakcí s HCl a následnou zpětnou titrací. Obsah sušiny byl stanoven sušením 10 g vzorku při 105 °C do konstantní hmotnosti. Obsah popela byl stanoven při teplotě 550 °C podle ISO 18122 (ISO, 2015a). Elementární složení (C, H, N, S a O) bylo analyzováno pomocí elementárního analyzátoru (Flash EA 1112, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) v konfiguraci CHNS/O. Obsahy minerálů (Ca, P a K) a stopových prvků (Mn, Zn a Cu) v biocharu byly analyzovány atomovou absorpční spektroskopií (AAS), atomovou emisní spektroskopií (AES) a indukčně vázanou plazmovou optickou emisní spektroskopií (ICP-OES). Před analýzou byl vzorek biocharu digestován pomocí směsi HNO₃/HCl po 1 hodinu při 200 °C ve vysokotlaké mikrovlnné troubě (CEM Mars 5, CEM Corp., Matthews, NC, USA).

Tabulka 1: Charakteristiky a vlastnosti biocharu použitého do krmné dávky

Parametr	Biochar
Charakteristika	
Vstupní surovina	měkké dřevo (smrkové)
Podmínky pyrolýzy	maximálně 900 °C, do 7 hodin
Podíl jednotlivých frakcí	>5 mm (50 g/kg) 2-5 mm (148 g/kg) 0,5-2 mm (409 g/kg) <0,5 mm (438 g/kg)
Povrch (S_{BET} , m ² /g)	525
pH	11
Chemické složení	
Sušina (g/kg sušiny)	979
Popel	114
C	846
H	6,7
N	1,8
O	30,9
P	0,9
S	0,2
K	4,0
Ca	19,5
Mg	2,4
Zn	0,2
Cu	0,02

4.2 Zvířata a design experimentu

Pro pokus bylo vybráno a použito osm dospělých teplokrevných koní (6 klisen a 2 valaši o stáří 12.1 ± 5.3 roky a tělesné hmotnosti 613.8 ± 39.3 kg). Koně byli individuálně ustájeni v boxech o 12 m² s volným přístupem k vodě v automatických napáječkách a solnému lizu obsahujícímu chlorid sodný (NaCl).

Koně byli využiti v křížovém (crossover) designu experimentu rozdělenému do dvou fází po 15 dnech.

Každá fáze sestávala z 10 dní adaptace na krmnou dávku a následně z 5 dní sběru dat. V průběhu 5 dní zaměřených na sběr byly první 4 dny sbírány veškeré výkaly a 5. den byly koním odebrány vzorky krve. Po ukončení této první fáze se vyměnila krmná dávka mezi skupinami. Aby se zamezilo možnosti ovlivnění výsledků experimentu předchozí krmnou dávkou, bylo mezi jednotlivými fázemi zařazeno tzv. očistné období 13 dní.

V průběhu adaptační fáze měli koně přístup do suchého výběhu alespoň po 4 hodiny denně a v průběhu fáze sběru dat byli denně 30 minut voděni. Všichni koně zahrnutí do experimentu byli považováni za prosté vnitřních parazitů, neboť byli před začátkem experimentu odčerveni orální pastou (Equiverm, Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika).

4.3 Krmná dávka

Před začátkem experimentu byli koně rozděleni do skupin po dvou dle pohlaví a tělesné hmotnosti a následně náhodně přiřazeni do skupiny s jednou ze dvou krmných dávek. Krmné dávky byly následující:

1. Kontrolní – základní krmná dávka skládající se z lučního sena a mačkaného ječmene (na částice menší 2 mm) v poměru 80:20 sušiny krmiva.
2. Biochar – základní krmná dávka s přídatkem 10 g biocharu na 1 kg sušiny krmné dávky.

Koně byli krmeni 15 g sušiny krmné dávky na 1 kg jejich tělesné hmotnosti. Toto množství bylo vypočítáno dle požadavků NRC, aby koním poskytovalo 100 % požadavků na stravitelnou energii. Toto množství bylo rovnoměrně rozděleno do dvou krmných dávek, které byly koním podávány 2x denně pravidelně v 5:00 a 17:00. Koně celkově (při průměrné tělesné hmotnosti 614 kg, příjmu 15 g sušiny na kilogram tělesné hmotnosti a suplementace biocharu 10 g na kilogram sušiny) přijímali průměrně 92 g biocharu za den na koně.

Koním bylo napřed podáno luční seno a o 30 minut později byl podaný mačkaný ječmen. Ve skupině s krmnou dávkou s přídatkem biocharu se biochar ručně míchal s drceným ječmenem a vzniklá směs byla zvlhčena. V kontrolní skupině byl drcený ječmen bez biocharu také zvlhčován.

4.4 Sběr vzorků výkalů a jejich analýza

Výkaly byly sbírány z betonové podlahy boxů čtyři po sobě jdoucí dny (11.–14. den). Každý den byly všechny sebrané výkaly od jednoho koně zváženy, smíchány a proporcionálně rozděleny na vzorky (cca 5 % denní produkce). Vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C do konce fáze sběru vzorků, kdy byly rozmrazeny a smíchány do jednoho složeného vzorku za celé období pro chemické analýzy a pro analýzu mikrobiomu.

4.5 Analýza mikrobiomu

Pro analýzu mikrobiomu byla využita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Před jejím provedením bylo nutné izolovat bakteriální DNA ze zkoumaných vzorků.

4.5.1 Izolace DNA

DNA byla nejprve extrahována z 200 mg každého vzorku výkalů pomocí QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) v souladu s pokyny výrobce s přidavkem opakovaného třepání se zirkoniovými kuličkami dle protokolu Yu a Morisson 2004, pro zvýšení výtěžku DNA. Ke kvantifikaci konečného výtěžku DNA byl použit Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko). Extrahovaná DNA byla normalizovaná na stejnou koncentraci molekul (5 ng/μL) a udržována při -20 °C před PCR.

4.5.2 PCR

Oblast V4 genu 16S rRNA byla amplifikována pomocí primerů 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') a 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Složení směsi (Master Mixu) a množství obsažených složek je uvedeno v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Složení směsi a množství komponent Master Mixu pro PCR

Komponenta	Množství na jednu reakci (μl)
Fast Hifi polymerase	0,25
10x HiFi Buffer	5
T4 bacteriophage Gene 32 product	0,5
dNTP	0,5 od každého
Primer (forward, reverse)	0,2 od každého
Vzorek izolované DNA	2
PCR voda	16,35
celkem	25

PCR reakce byla následující: 1. počáteční denaturace při teplotě 95 °C po dobu 45 sekund, 2. ochlazení na teplotu 50 °C pro hybridizaci, 3. při teplotě 68 °C dále proběhla elongace a 4. 5minutová extenze proběhla při teplotě 68 °C. Na konec byla reakce udržována při 4 °C.

Protože byl výtěžek DNA normalizován napříč všemi vzorky, všechny vzorky prošly stejným počtem cyklů. Cykly byly předem upraveny tak, aby se snížila pravděpodobnost vzniku chimérických sekvencí (vznik spojením sekvencí z několika vzorků).

4.5.3 Agarozová gelová elektroforéza a 16S rRNA identifikace

Výsledky každé reakce byly ověřeny pomocí elektroforézy (1% agarozový gel obarvený pomocí SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Thermo Fisher, USA) a dokumentovány v systému Gel Doc XR+ (BioRad, USA). Všechny vzorky byly amplifikovány v triplikátech a smíchány.

K sekvenování všech produktů PCR byla použita Platforma MiniSeq (Illumina, USA). Analýza výsledných ampliconů byla provedena prostřednictvím datové pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) a databáze SILVA (v128) (Quast et al. 2013). Data byla normalizována na nejnižší hloubku vzorku („sample depth“ 17 232 sekvencí/vzorek) a na úrovni kmene, třídy a rodu byla zaznamenána relativní bakteriální hojnost.

Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí alfa diverzity (intrahostitelská diverzita, vypovídá o druhové rozmanitosti konkrétního vzorku). Ta byla hodnocena popisem a porovnáním bohatosti bakteriální komunity ve vzorku pomocí indexu bohatosti (Chao1 index bohatosti), diverzity (Simpsonův index) a vyrovnanosti (Shannonova vyrovnanost) a dále byl použit index rovnosti Pielou.

5 Výsledky

Všichni koně si během studie udržovali dobré zdraví, nebyly u nich zaznamenány žádné známky gastrointestinálních poruch. Krmné dávky byly koňmi dobře přijímány, oba koncentráty (ječmen s biocharem či bez něj) byly zcela spotřebovány do 20 minut po podání krmiva a odmítnutí sena bylo zanedbatelné.

Suplementace biocharu neovlivnila rozsah fermentace zadního střeva a fekální koncentrace celkových těkavých mastných kyselin se mezi ošetřeními také nelišila. Koncentrace fekálního amoniaku po přidavku biocharu do krmné dávky také nebyla změněna.

Analýza fekálního mikrobiomu koní v pokusu byla provedena pomocí 16S rRNA identifikace. Složení mikrobiomu u koní zahrnutých v experimentu bylo zaznamenáno z taxonomického hlediska na úrovni kmene, třídy a rodu. Porovnání relativního zastoupení bakterií ve střevní komunitě skupiny koní krmených krmnou dávkou s přidáním biocharu a koňmi krmenými kontrolní krmnou dávkou byly na každé taxonomické úrovni zaznamenány do skládaného sloupcového grafu.

Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi skupinou koní krmených krmnou dávkou s přidavkem biocharu a bez něho, biochar v krmné dávce neovlivnil mikrobiální populaci.

5.1 Bakteriální mikrobiom

5.1.1 Výsledek analýzy

Výsledky statistické analýzy diverzity byly zaznamenány do tabulky (Tabulka 3).

Statistické vyhodnocení těchto dat prokázalo, že v diverzitě, bohatosti a rovnoměrnosti bakteriálního mikrobiomu koní krmených krmnou dávkou s přidavkem biocharu a bez něho se nevyskytovaly žádné statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$).

Tabulka 3: Indexy diverzity, bohatosti a rovnoměrnosti mikrobiálních společenstev u koní krmených krmnou dávkou s (biocharem) nebo bez (kontrola) suplementace biocharem

Index	Krmná dávka		SEM	P-hodnota
	Kontrola	Biochar		
Shannonův index diverzity	8.172	8.032	0.1633	0.2980
Simpsonův index diverzity	0.982	0.974	0.0076	0.2987
Chao1 index bohatosti	849.4	853.4	61.48	0.8925
Pielou index vyrovnanosti	0.884	0.870	0.0148	0.2764

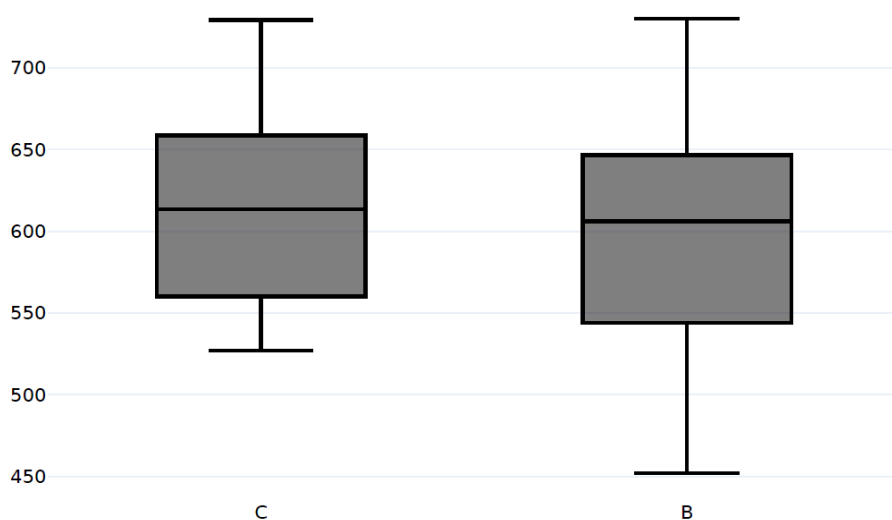
SEM = standardní chyba průměru

5.1.2 Bohatost mikrobiomu

Co se týče bohatosti střevní mikrobioty, u koní krmených krmnou dávkou s přidavkem biocharu nebyla zjištěna větší diverzita oproti koním krmeným kontrolní krmnou dávkou bez suplementu.

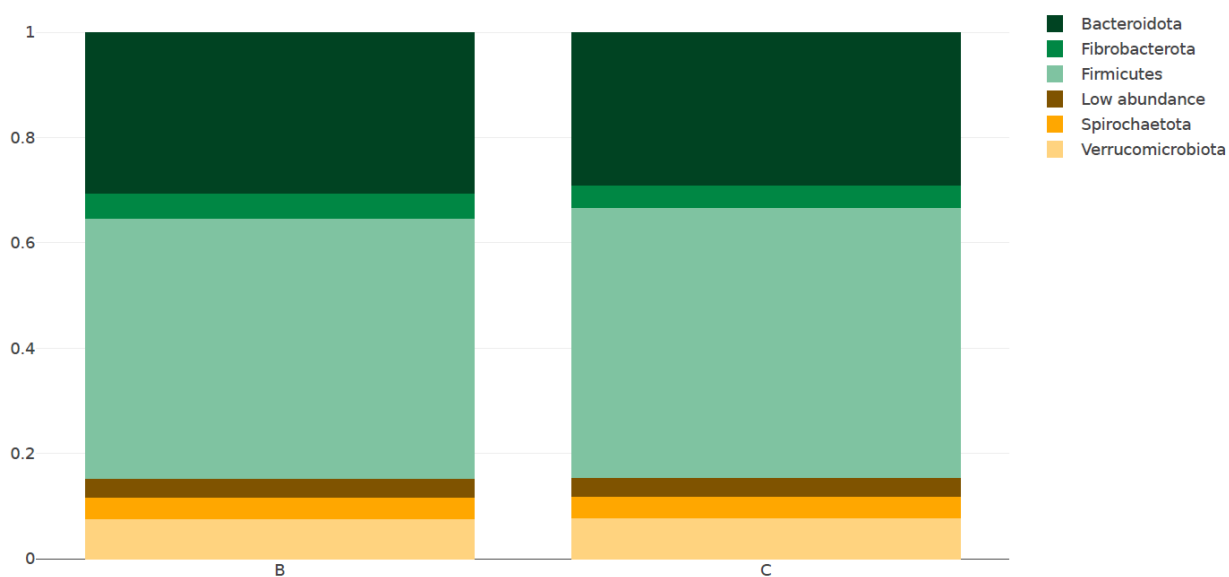
Diverzita mikroorganismů u skupiny koní s krmnou dávkou suplementovanou biocharem (B) a kontrolní skupiny (C) je znázorněna v krabicovém grafu (Obrázek 1).

Obrázek 1: Diverzita mikroorganismů u kontrolní skupiny (C) a u skupiny se suplementací biocharem (B)



5.1.2.1 Na úrovni kmene (Phylum)

Obrázek 2: Relativní hojnost na úrovni kmene u skupiny s přidavkem biocharu (B) a kontrolní skupiny (C)



Obrázek 2 vyobrazuje relativní hojnosti bakteriálních kmenů, které se vyskytovaly ve střevní mikrobiotě koní krmných krmnou dávkou s přidavkem biocharu (B) a kontrolní skupiny (C) koní.

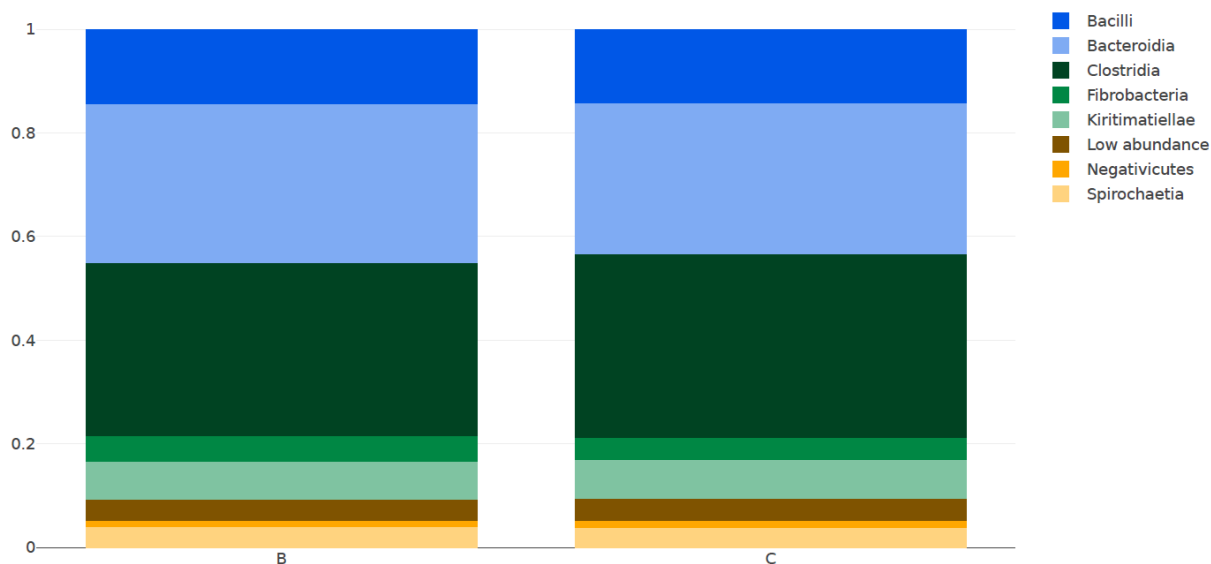
Bylo prokázáno, že na úrovni kmene u obou skupin koní se ve střevní mikrobiotě vyskytovaly nejvíce bakterie z kmene *Firmicutes*, *Bacteroidota* a *Verrucomicrobiota*.

Kmen *Firmicutes* se vyskytoval v mikrobiotě skupiny s krmnou dávkou (KD) suplementovanou biocharem v procentuálním zastoupení 51,24 % a u skupiny s kontrolní KD v 53,11 %. Kmen *Bacteroidota* u skupiny s biocharem v 31,64 % a u kontrolní skupiny v 30,17 %. Kmen *Verrucomicrobiota* u skupiny s biocharem byl v 7,88 % a u kontrolní v 8,12 %. *Fibrobacterota* zastupoval u skupiny s biocharem 4,97 % a u kontrolní skupiny 4,37 % a bakteriální kmen *Spirochaetota* 4,26 % u skupiny s biocharem a u kontrolní v 4,22 %.

Jak je vidět v procentuálních zastoupeních jednotlivých kmenů, u skupiny koní krmných přidavkem biocharu se oproti kontrolní skupině zastoupení bakterií zvýšilo u kmene *Bacteroidota* o 1,47 %, u *Fibrobacterota* o 0,6 % a *Spirochaetota* se navýšily o 0,04 % a naopak výskyt bakteriálních kmenů *Firmicutes* se snížil o 1,87 % a *Verrucomicrobiota* o 0,24 %.

5.1.2.2 Na úrovni třídy (Class)

Obrázek 3: Relativní hojnost na úrovni třídy u skupiny s přidavkem biocharu (B) a kontrolní skupiny (C)



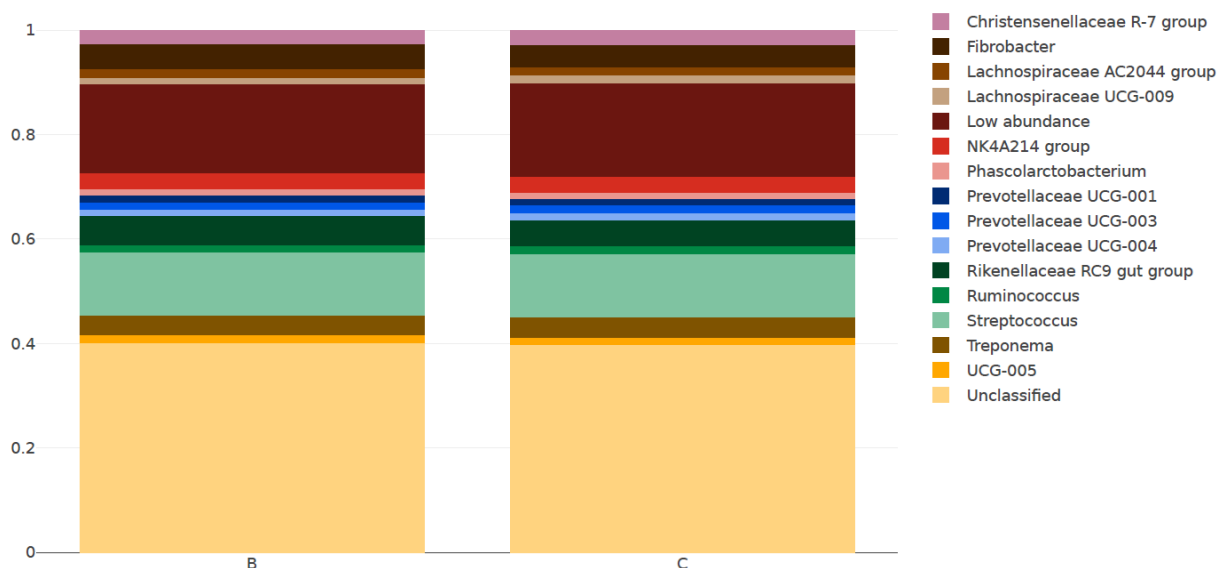
Jak zobrazuje Obrázek 3, na úrovni třídy bylo prokázáno, že ve střevním společenství u obou skupin koní se nejvíce vyskytovaly bakterie ze tříd *Clostridia*, *Bacteroidia* a *Bacilli*. Následovaly bakterie ze tříd *Kiritimatiellae*, *Fibrobacteria*, *Spirochaetia*, skupina bakterií z různých tříd s nízkou hojností a bakterie z třídy *Negativicutes*.

Třída *Bacilli* se vyskytovala v mikrobiotě skupiny koní krmených krmnou dávkou suplementovanou biocharem v 15,06 %, u kontrolní skupiny v 14,8 %, třída *Fibrobacteria* u skupiny krmené biocharem v 5 %, u kontrolní v 4,4 %. Bakteriální třída *Kiritimatiellae* u skupiny s biocharem v 7,63 % a kontrolní v 7,88 %. Třída *Bacteroidia* zastupovala 31,81 % z bakteriálních tříd u skupiny krmené biocharem a 30,36 % u kontrolní skupiny. Třída *Clostridia* byla u skupiny koní s biocharem v 34,97 % a u kontrolní v 37,09 %, *Spirochaetia* u skupiny s biocharem v 4,14 % a u kontrolní v 4,07 % a *Negativicutes* v 1,39 % u skupiny s biocharem a 1,4 % u kontrolní krmné dávky.

Jak je vidět na procentuálních četnostech zastoupení bakteriálních tříd v mikrobiotě skupiny koní krmených krmnou dávkou suplementovanou biocharem a kontrolní krmnou dávkou, vyskytovaly se mezi nimi malé rozdíly. U skupiny s biocharem se oproti kontrolní skupině vyskytovaly třídy *Bacilli* o 0,26 % více, *Fibrobacteria* více o 0,6 %, *Bacteroidia* o 1,45 % ve vyšší četnosti a *Spirochaetia* o 0,07 % více. V mírně nižších četnostech se u skupiny se suplementací biocharem vyskytovaly bakteriální třídy *Kirimatiellae* (o 0,25 % méně oproti kontrolní), *Clostridia* (o 2,12 % méně) a *Negativicutes* (o 0,01 % méně).

5.1.2.3 Na úrovni rodu (Genus)

Obrázek 4: Relativní hojnost na úrovni rodu u skupiny s přidavkem biocharu (B) a kontrolní skupiny (C)



Obrázek 4 vyobrazuje relativní hojnosti bakteriálních rodů zastoupených v mikrobiotě koní krmených biocharem a kontrolní krmnou dávkou. Na úrovni rodu se u koní obou skupin vyskytovalo 14 bakteriálních rodů a dále skupina neklasifikovaných rodů bakterií a skupina bakteriálních rodů s velmi malou hojností. Nejvíce se u obou experimentálních skupin koní vyskytoval bakteriální rod *Streptococcus*, *Rikenellaceae* a *Fibrobacter*.

Největší část rodů v mikrobiotě obou skupin nebyla klasifikována (48,37 % u experimentální skupiny a 48,44 % u kontrolní). Rod *Streptococcus* se nacházel v mikrobiotě koní s krmnou dávkou suplementovanou biocharem v hojnosti 14,61 %, u kontrolní skupiny v 14,86 %. *Rikenellaceae* zaujímal u experimentální skupiny koní 6,77 % bakteriálních rodů a u kontrolní skupiny 6,14 %. *Fibrobacter* se nacházel v mikrobiotě experimentální skupiny v hojnosti 5,78 % a 5,13 % u kontrolní. Rod *Treponema* zaujímal 4,65 % rodů střevní mikrobiální komunity pokusné skupiny koní a 4,66 % kontrolní skupiny. *Ruminococcus* se nacházel v 1,46 % u skupiny se suplementovanou KD a v 1,72 % u kontrolní skupiny.

Jak vyplývá z uvedených procentuálních četností zastoupení vybraných bakteriálních rodů v mikrobiotě skupiny koní s krmnou dávkou s přídatkem biocharu a kontrolní krmnou dávkou, nevyskytovaly se mezi nimi velké rozdíly. U skupiny koní s biocharem v krmné dávce se oproti kontrolní skupině ve větší hojnosti vyskytovaly rody *Rikenellaceae* (o 0,63 % více) a *Fibrobacter* (o 0,65 % více). V mikrobiotě koní skupiny krmných doplňkem biocharu měly oproti kontrolní skupině menší zastoupení bakteriální rody *Streptococcus* (nižší o 0,25 %) a *Treponema* (o 0,01 %).

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo ověřit účinky podávání biocharu na zastoupení skupin bakterií ve výkalech koní.

6.1 Bakteriální mikrobiota

Koňská střevní mikrobiota je citlivější než mikrobiální společenství u jiných zvířat (Fey & Sasse 1996) a velká část mikrobioty je jedinečná a individuální pro každé zvíře (Elghandour et al. 2018), což může interpretace o složení mikrobioty ztěžovat (Schoster et al. 2015). Základní mikrobiom by měl obsahovat rody bakterií společných u 99 % jedinců ve vzorku (Massacci et al. 2014). Jeho existence upoutala pozornost vědců a také nevědecké části společnosti poté, co byl identifikován lidský základní mikrobiom (Dougal et al. 2014).

Massacci et al. (2014) studovali základní mikrobiom u celkově 189 koní od šesti různých plemen, o které bylo pečováno podobným způsobem. Zjistili, že základní mikrobiota se skládala ze 30 rodů patřících do čeledí *Lachnospiraceae* (kmen *Firmicutes*), *Porphyromonadaceae* (kmen *Bacteroidota*) a *Ruminococcaeae* (kmen *Firmicutes*). Dougal et al. (2014) zjistili, že *Lachnospiraceae* existuje u většiny savců včetně člověka, tudíž by mohla patřit do základního mikrobiomu všech savců. Význam této čeledi není překvapující, protože jsou známými producenti butyrátu, který má ochrannou funkci pro kolonocyty ve střevní stěně (Dougal et al. 2014). Výsledky korespondují s našimi výsledky, protože kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidota* se vyskytovaly v mikrobiotě koní v našem pokusu v největších hojnostech. Toto zjištění není překvapivé vzhledem k faktu, že oba kmeny zahrnují druhy celulolytických bakterií.

Bylo již provedeno několik studií zkoumajících bakteriální komunitu u koní s využitím NGS (Dougal et al. 2014), ale jen malé procento z nich se zaměřilo na to, jak je střevní bakteriální komunita ovlivněna potravou, kterou kůň přijímá, ačkoliv je ovlivnění střevní mikrobioty typem krmiva známý fakt. Například Dougal et al. (2014) zjistili, že i při použití různých krmiv (senná krmná dávka, krmná dávka bohatá na tuky, krmná dávka bohatá na škrob) lze v základní mikrobiotě nalézt dominantní řád *Clostridiales* (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaeae*). To koresponduje i s našimi výsledky, neboť třída *Clostridia* (nadřazená řádu *Clostridiales*) byla nejhojnější bakteriální třídou v mikrobiotě koní zahrnutých v našem experimentu (u obou skupin). Velká hojnost bakterií ze třídy *Clostridia* je v mikrobiotě koní způsobena tím, že třída obsahuje zástupce celulolytických bakterií, které jsou pro koně důležité, protože přijímají velké množství celulózy v potravě.

Biochar je potenciálně efektivním krmným aditivem, které může mít pozitivní účinky na střevní bakteriální komunitu, zlepšení trávení a obecně na zachování zdraví zvířat. Jako přídatek do krmiv se používá zejména pro své vlastnosti absorpce (toxinů, mikroorganismů, chemikálií) (Schmidt et al. 2019). Doposud existuje poměrně málo studií, které by zkoumaly a hodnotily efekty biocharu na koňský organismus, natož vliv biocharu na bakteriální střevní komunitu. Joch et al. (2022) se zabývali účinky suplementace biocharu do krmné dávky koní na stravitelnost živin z krmiva, přičemž nezjistili žádné statisticky významné účinky přidáním biocharu do krmné dávky. Zvýšení stravitelnosti živin po přidání biocharu byla zjištěna u ovcí (McAvoy et al. 2020), prasat (Schubert et al. 2021) či krav (Saleem et al. 2018).

V našem experimentu se fekální bakteriální mikrobiota koní příliš nelišila v hojnostech zastoupení taxonomických skupin bakterií v porovnání experimentální skupiny a kontrolní skupiny. Nejsou známy žádné předchozí studie ohledně vlivu přidání biocharu do krmné dávky na mikrobiální komunitu u koní, avšak u některých jiných druhů zvířat podobné studie proběhly. Námi zjištěné výsledky korespondují s výsledky studie Prasai et al. (2016), kteří prováděli experiment s přidáním biocharu u nosných slepic a také nezaznamenali významné změny v mikrobiotě pokusných slepic oproti kontrolní skupině. Významné změny ve složení mikrobiální komunity u slepic nezjistili ani Willson et al. (2019), přestože v průběhu studie použili biochar ze dvou různých vstupních surovin. Goiri et al. (2021) studovali vliv přidání biocharu u kuřat brojlerů, kdy zjistili, že biochar neovlivnil druhovou bohatost a diverzitu bakterií ve slepém střevě, ale došlo u pokusné skupiny ke zvýšení relativních četností rodů *Ruminococcus*, *Blautia* a nedefinovaných rodů z čeledi *Ruminococcae*, *Lachnospiraceae* a *Erysipelotrichaceae* a zároveň došlo ke snížení relativních četností bakterií z rodů *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Clostridium* a nedefinovaných rodů z čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcae*. Menší změny bakteriální mikrobioty nijak nenarušili rovnováhu společenství. Zdá se, že v tomto případě změny v mikrobiotě souvisely s vlastností biocharu přijímat, ukládat a zprostředkovávat elektrony (redoxní aktivita), kdy biochar působil jako elektronový mediátor, redoxní reakce probíhaly efektivněji a došlo ke zlepšení využití krmiva. Goiri et al. (2021) však upozorňují, že podávání biocharu mělo u kuřat v počátku výkrmu negativní efekt na konverzi krmiva a přírůstek buď z důvodu negativního efektu na nezralou mikrobiotu střev či kvůli adsorpci živin způsobené biocharem (biochar může adsorbovat i potřebné živiny (Joch et al. 2022)). Rozdílné výsledky Goiri et al. (2021) oproti Willson et al. (2019) a Prasai et al. (2019) mohou být způsobeny zejména jinou skupinou experimentálních zvířat, protože Prasai et al. (2019) a Willson et al. (2019) prováděli pokus na dospělých nosnicích, ale Goiri et al. (2021) využívali mladá kuřata brojlerů. U pokusů probíhajících na podobných kategoriích zvířat mohou být rozdíly způsobeny zejména vlastnostmi a charakteristikami použitého biocharu, kromě faktorů prostředí či managementu chovu.

V rozporu se zjištěním předchozích autorů zabývajících se drůbeží, Han et al. (2019) zjistili výrazně větší bohatost a mikrobiální diverzitu ve slepém střevě potkanů, kterým bylo podáváno krmivo s přídatkem biocharu. Rozdíly v zjištění autorů mohou být opět způsobeny buď různými charakteristikami použitého biocharu (teplota pyrolýzy, vstupní biomasa) nebo prováděním studií na různých druzích zvířat.

Zjistili jsme, že u obou skupin (se suplementovanou KD i s kontrolní KD) koní se vyskytovaly sestupně podle četností bakteriální kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobiota*, *Fibrobacterodota* a *Spirochaetota*. V souladu s tím Salem et al. (2018) uvádí, že kmen *Firmicutes* a *Bacteroidetes* jsou nejvíce zastoupené kmeny bakteriální komunity koní, což potvrzuje i Su et al. (2020). Paßlack et al. (2020) uvádí, že druhým nejčastějším kmenem střevního bakteriálního společenství u koní jsou buď *Bacteroidetes* nebo *Verrucomicrobiota*. Výsledky našeho pokusu se tedy s těmito autory shodují. Zastoupení kmenu *Firmicutes* se po přidavku biocharu snížil (o 1,87 %) a *Fibrobacterota* a *Bacteroidota* se zvýšily (*Fibrobacteroidota* o 0,6 %, *Bacteroidota* o 1,47 %) oproti kontrolní skupině, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšením pH výkalů po přidavku biocharu, což souvisí i se zvýšením pH ve střevech. Hojnost kmenu *Firmicutes* se při vyšším pH snižuje, naopak bakteriální kmeny *Bacteroidota* a *Fibrobacteroidota* mají vyšší hojnost v neutrálnějším až mírně alkalickém prostředí (Duncan et al. 2009).

Mezi experimentální a kontrolní skupinou koní se vyskytovaly pouze menší rozdíly na úrovni třídy i rodu. Objevili jsme, že se ve střevním společenství u koní obou skupin nejvíce vyskytují třídy *Clostridia*, *Bacteroidia* a *Bacilli*, přičemž největší rozdíl je u tříd *Clostridia* (o 2,12 % méně v experimentální krmné dávce) a *Bacteroidia* (vyšší o 1,45 % ve skupině s experimentální krmnou dávkou). Na úrovni rodů bakterií se ve střevní mikrobiotě obou skupin koní vyskytovaly rody *Streptococcus*, *Rikenellaceae* a *Fibrobacter*, přičemž největší změny vykazovaly četnosti rodu *Fibrobacter* a *Rikenellaceae*. Tamayao et al. (2021) hodnotili bakteriální společenství bachoru přežvýkavců (in vitro) a zjistili, že také nebylo statisticky významně ovlivněno přidavkem biocharu, s výjimkou *Rikinellaceae*. U nás se četnosti *Rikenellaceae* nezměnily, ale to může být dáno jinou mikrobiotou v bachoru a ve slepém střevě.

6.2 Zastoupení celulólytických, hemicelulólytických a pektinolytických bakterií

Bakterie štěpící vlákninu se nacházejí v zadní části GIT vzhledem k vhodným podmínkám – pomalejší průchod tráveniny, vyšší pH, objemné tlusté střevo. Al Jassim et al. (2011) uvádí jako převládající celulólytické bakterie *Ruminococcus flavefaciens* a dále *Fibrobacter succinogenes* a *Ruminococcus albus*. Daly et al. (2001) předpokládají, že nejčastější celulólytické bakterie jsou *Ruminococcus flavefaciens* a *Fibrobacter spp.* Muhonen et al. (2021). Schoster et al. (2015) uvádí, že někteří zástupci Clostridiales jsou také celulólytické bakterie, které štěpí celulózu.

S tvrzením autorů se shodují i naše výsledky. Zjistili jsme mírné zvýšení (o 0,6 %) hojnosti bakterií kmene *Fibrobacterota* (do kterého spadá rod *Fibrobacter spp.*) po přidavku biocharu do KD a také mírné snížení rodu *Ruminococcus* (patří do třídy *Clostridia*) o 0,57 % oproti kontrolní skupině. I přesto se zastoupení celulolytických, hemicelulolytických a pektinolytických bakterií v mikrobiotě koní experimentální skupiny statisticky významně nezměnilo oproti kontrolní skupině, změna byla pouze mírně z hlediska číselných hodnot. Terry et al. (2019) uvádí, že na štěpení hemicelulóz se podílí *Fibrobacter spp.*, *Prevotella (Bacteroideta)* a *Ruminococcus (Firmicutes)*. Nárůst celulolytických bakterií může být spojen se zvýšením pH, protože celulolytickým bakteriím nesvědčí kyselé prostředí (Russel & Wilson 1996), vyšší pH je spojeno s vlastnostmi biocharu – je alkalické povahy.

6.3 Zastoupení patogenních bakterií

Jak již bylo zmíněno v literární rešerši (Fey & Sasse 1996), ve zdravém organismu se mohou vyskytovat i patogenní bakterie bez výskytu zdravotních problémů. Ty nastávají až ve chvíli, kdy je organismus (v tomto případě GIT koní) oslabený, či ještě nemá osídlený trávicí trakt rezidentní mikrobiotou (Papoušková et al. 2019).

Papoušková et al. (2019) uvádí, že mezi nejvýznamnější bakteriální patogeny gastrointestinálního traktu zvířat řádíme *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* či *Campylobacter coli*. Dicks et al. (2014) uvádí jako potenciálně patogenní bakterie pro koňskou střevní mikrobiotu například bakteriální třídu *Bacilli*, čeleď *Enterobacteriaceae* či rody *Clostridium* (některé), *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, či *Salmonella*.

V našem experimentu jsme nezjistili statisticky významné změny v zastoupení patogenních bakterií v mikrobiotě koní. S přidavkem biocharu jsme zaznamenali mírné snížení četností bakterií ze třídy *Clostridia* (o 2,12 % vůči kontrolní skupině) a zvýšení hojnosti bakterií ze třídy *Bacilli* (o 0,26 %). Důvodem snížení třídy *Clostridia* by mohlo být zvýšení pH biocharu, Guo et al. (2021) uvádí, že při přidání biocharu do krmné dávky se hojnost *Clostridia* snižuje (při přidavku 2 % biocharu oproti 1 % znatelněji). U prasat zjistili Han et al. (2014), že doplněk biocharu potlačil vylučování gramnegativních koliformních bakterií a gramnegativních bakterií *Salmonella* do výkalů oproti kontrolní skupině. Prasai et al. (2016) po přidavku biocharu do krmné dávky u nosných slepic zaznamenali snížení potenciálně patogenních druhů bakterií, například kmenu *Proteobacteria* či konkrétně *Clostridium aldense* či *Bacteroides dorei*. Snížení hojnosti kmenu *Proteobacteria* po přidavku biocharu do krmné dávky nosnic pozorovali i Willson et al. (2019) spolu se snížením výskytu rodu *Campylobacter*. Willson et al. (2019) tvrdí, že dosud není znám mechanismus snižující přenos bakterie *Campylobacter hepaticus*, ačkoliv došlo ke snížení jejího výskytu. Snížení výskytu bakterií *Proteobacteria* bylo způsobeno významným snížením hojnosti ve dvou jejich třídách, *Epsilonproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*. Důvodem ke snížení bakterií *Proteobacteria* by mohlo být i zvýšené pH po přidavku biocharu, protože pro *Proteobacteria* je prospěšnější nižší pH (Guo et al. 2021) Autoři se však shodují, že přidavek biocharu by mohl napomoci snižovat zatížení patogeny bez toho, že by významně ovlivnili komplexní mikrobiotu. Rozdíly mezi studiemi budou způsobeny pravděpodobně jiným typem používaného biocharu a jeho vlastnostmi. Abit et al. (2014) zjistili, že povrchové vlastnosti biocharu ovlivňují jeho schopnost vázat bakterie. Proto může být adsorpce patogenních bakterií ovlivněna i pórovitostí používaného biocharu. Kapacita odstraňování bakterií se zvyšuje i s vyšším obsahem pevného uhlíku a snižuje se s obsahem popela a těkavých látek (Valença et al. 2021). Dalšími faktory, které mohou způsobit jiné výsledky ve studiích jsou například jiný typ podávaného krmiva, jiný živočišný druh a odlišnosti v trávení a také jiným složením fekální mikrobioty – u koní v naší studii jsme nezjistili přítomnost bakterií z kmenu *Proteobacteria*. Přítomnost *Proteobacteria* u koní zjistili Costa et al. (2012), přičemž zjistili, že hojnost tohoto kmenu se zvyšuje u koní s kolikou.

7 Závěr

Po statistickém vyhodnocení dat získaných ze sekvenační analýzy fekálního bakteriálního mikrobiomu byly zamítnuty obě hypotézy, které byly v diplomové práci předloženy. Podávání přídatku biocharu o daných vlastnostech (Tabulka 1) statisticky významně nezvýšilo relativní zastoupení jednotlivých skupin bakterií ve výkalech. Biochar statisticky významně nezvýšil zastoupení celulolytických, hemicelulolytických ani pektinolytických bakterií. Taktéž po přídatku biocharu nebylo pozorováno statisticky významné snížení zastoupení patogenních bakterií. Ačkoliv nebyly hodnoty změněny statisticky významně, byly zjištěny číselně vyšší hodnoty v zastoupení rodů celulolytických bakterií a také číselně nižší hodnoty bakteriálních rodů produkujících laktát. Nevýznamné výsledky mohly být způsobeny krátkodobým podáváním biocharu, dlouhodobé podávání by mohlo vykazat jiné výsledky.

Biochar jako přídatek do krmné dávky neměl žádný negativní efekt na zdraví či trávení koní. Naše výsledky naznačují, že podávání biocharu neovlivňuje složení bakteriální komunity a může tak být bez obav podáván koním s cílem využít jeho jiné pozitivní účinky na trávicí soustavu (úprava pH, vychytávání toxinů). V budoucích studiích je potřeba ověřit účinek biocharu z jiné vstupní suroviny na mikrobiom koní. Zároveň je třeba ověřit i vliv dlouhodobého krmení biocharu v krmné dávce. Předmětem dalších výzkumů by mohlo být využití přídatku biocharu jako prevence vzniku alimentárních onemocnění.

8 Literatura

Abit SM, Bolster CH, Cantrell KB, Flores JQ, Walker SL. 2014. Transport of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and Microspheres in Biochar-Amended Soils with Different Textures. *Journal of Environment Quality*, 43:371. DOI: 10.2134/jeq2013.06.0236.

Al Jassim RAM, Andrews FM. 2009. The Bacterial Community of the Horse Gastrointestinal Tract and Its Relation to Fermentative Acidosis, Laminitis, Colic, and Stomach Ulcers. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 25:199–215. DOI: 10.1016/j.cveq.2009.04.005.

Asplin KE, Sillence MN, Pollitt CC, McGowan CM. 2007. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal* 174:530-535. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.003.

Bailey SR, Marr CM, Elliott J. 2004. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *The Veterinary Journal* 167:129–142. DOI: 10.1016/s1090-0233(03)00120-5.

Belknap JK, Geor R. 2017. *Equine Laminitis*. Blackwell Publishing, Danvers.

Böhm S, Mitterer T, Iben C. 2018. The impact of feeding a high-fibre and high-fat concentrated diet on the recovery of horses suffering from gastric ulcers. *Pferdeheilkunde* 34:237-246. DOI: 10.21836/PEM20180304.

Bowden A, Burford JH, Brennan ML, England GCW, Freeman SL. 2019. Horse owners' knowledge, and opinions on recognising colic in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 52:262-267. DOI: 10.1111/evj.13173.

Bras R, Morrison S. 2021. Mechanical Principles of the Foot. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 37:581-618. DOI: 10.1016/j.cveq.2021.09.001.

Budras K-D, Sack WO, Röck S. *Anatomy of the Horse*. Werbedruck Aug. Lönneker GmbH & Ko. KG, Stadtoldendorf.

Callahan B, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581-583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.

Caporaso JG, et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* 6:1621–1624. DOI: 10.1038/ismej.2012.8.

Cichorska B, Komosa M, Nogowski L, Maćkowiak P, Józefia D. 2014. Significance of Nutrient Digestibility in Horse Nutrition – A Review. *Annals of Animal Science* 14:779–797. DOI: 10.2478/aoas-2014-0059.

Collinet A, Grimm P, Julliand S, Julliand V. 2021. Sequential Modulation of the Equine Fecal Microbiota and Fibrolytic Capacity Following Two Consecutive Abrupt Dietary Changes and Bacterial Supplementation. *Animals* 11:1278. DOI: 10.3390/ani11051278.

Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, Weese JS. 2012. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One* 7(7):e41484. DOI: 10.1371/journal.pone.0041484.

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS. 2015. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal* 205:74-80. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.03.018.

Daly K. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 38:141–151. DOI: 10.1016/s0168-6496(01)00178-7.

Davies Z. 2017. *Equine Science*. Wiley Blackwell, Hoboken.

Dicks LMT, Botha M, Dicks E, Botes M. 2014. The equine gastro-intestinal tract: An overview of the microbiota, disease and treatment. *Livestock Science* 160:69–81. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.11.025.

Dougal K, Gabriel DFO, Patricia H, Susan G, Eric P, Raymong G, Brian N, Harold SII, Sarah E, Charles N. 2014. Characterisation of the Faecal Bacterial Community in Adult and Elderly Horses Fed a High Fibre, High Oil or High Starch Diet Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE* 9(2):e87424. DOI: 10.1371/journal.pone.0087424

Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 11:2112–2122. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x.

Duvnjak M, Bošnjak A, Zadavec M, Pintar J, Grbeša D, Kiš G. 2018. Starch in horse diet improves feces microbiota, in vitro digestibility of fiber and dry matter. *Journal of Central European Agriculture* 19:918–930. DOI: 10.5513/jcea01/19.4.2114.

Edmunds JL, Worgan HJ, Dougal K, Girdwood SE, Douglas JL, McEwan NR. 2016. In vitro analysis of the effect of supplementation with activated charcoal on the equine hindgut. *Journal of Equine Science* 27:49-55. DOI: 10.1294/jes.27.49.

Elghandour MMY, Adegbeye MJ, Barbabosa-Pilego A, Perez NR, Hernández SR, Zaragoza-Bastida A, Salem AZM. 2018. Equine Contribution in Methane Emission and its Mitigation Strategies. *Journal of Equine Veterinary Science*. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.10.020.

European Biochar Certificate (EBC). 2022. European Biochar Certificate – Guidelines for a Sustainable Production of Biochar. European Biochar Foundation (EBC), Arbaz. Available from https://www.european-biochar.org/media/doc/2/version_en_10_1.pdf (accessed March 2022).

Fey K, Sasse HHL. 1996. Zur Darmflora des Pferdes Eine Literaturstudie. *Pferdeheilkunde* 6:855-863.

Frank N. 2011. Equine Metabolic Syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27:73-92. DOI: 10.1016/j.cveq.2010.12.004.

Galinelli N, Wambacq W, Broeckx BJG, Hesta M. 2019. High intake of sugars and starch, low number of meals and low roughage intake are associated with Equine Gastric Ulcer Syndrome in a Belgian cohort. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 105:18-23. DOI: 10.1111/jpn.13215.

Gehlen H, Priess A, Doherr M. 2021. Multicenter study on the etiology of gastric ulceration in horses in Germany. *Pferdeheilkunde* 37:395-407. DOI: 10.21836/PEM20210406.

Goiri I, Ruiz R, Atxaerandio R, Lavin JL, Díaz de Otálora X, García-Rodríguez A. 2021. Assessing the potential use of a feed additive based on biochar on broilers feeding upon productive performance, pH of digestive organs, cecum fermentation and bacterial community. *Animal Feed Science and Technology* 279:115039. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.115039.

Gonçalves S, Julliard V, Leblond A. 2002. Risk factors associated with colic in horses. *Vet Res* 33:641-652. DOI: 10.1051/vetres:2002044.

Guo X, Zheng M, Wu S, Zou X, Chen X, Zhang Q, Wang M. 2021. A Preliminary Investigation on Bacterial Diversity and Fermentation Quality of High-Moisture Alfalfa Silage Prepared with Biochar. *Agronomy* 11:1971. DOI: 10.3390/agronomy11101971.

Hagemann N, Spokas K, Schmidt H-P, Kägi R, Böhler MA, Bucheli TD. 2018. Activated Carbon, Biochar and Charcoal: Linkages and Synergies across Pyrogenic Carbon's ABCs. *Water* 10:182. DOI: 10.3390/w10020182.

Han J, Chen S, Li C. 2019. Integrative analysis of the gut microbiota and metabolome in rats treated with rice straw biochar by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *Scientific Reports* 9:17860. DOI: 10.1038/s41598-019-54467-6.

Han J, Zhang F, Du L, Han X, Chen W, Meng J. 2014. Effects of Dietary Biochar Including Vinegar Liquid on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Blood Characteristics and Fecal Noxious Gas Emission in Weaned Piglets. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 13, 1072-1079. DOI: 10.36478/javaa.2014.1072.1079.

Hass A, Lima IM. 2018. Effect of feed source and pyrolysis conditions on properties and metal sorption by sugarcane biochar. *Environmental Technology & Innovation* 10:16-26. DOI: 10.1016/j.eti.2018.01.007.

Hembroff DA. 2012 Digestion in the horse. *Veterinary Technician* 27:684.

Hillyer MH, MAIR TS. 1997. Recurrent colic in the mature horse: A retrospective review of 58 cases. *Equine Veterinary Journal* 29:421-424. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb03152.x.

Hwang H, Dong HJ, Han J, Cho S, Kim Y, Lee I. 2022. Prevalence and treatment of gastric ulcers in Thoroughbred racehorses of Korea. *J Vet Sci*. DOI: 10.4142/jvs.21247.

Hynd PI. 2019. *Animal Nutrition from Theory to Practice*. CSIRO Publishing, Clayton South.

Cha JS, Park SH, Jung S-C, Ryu C, Jeon A-K, Shin M-C, Park Y-K. 2016. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 40:1-15. DOI: 10.1016/j.jiec.2016.06.002.

Johnson JS, et al. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 10:5029. DOI: 10.1038/s41467-019-13036-1.

Joch M, Výborná A, Tyrolová Y, Kudrna V, Trakal L, Vadroňová M, Tichá D, Pohořelý M. 2022. Feeding biochar to horses: Effects on nutrient digestibility, fecal characteristics, and blood parameters. *Animal Feed Science and Technology* 285:115242. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2022.115242.

Kloss S, Zehetner F, Dellantonio A, Hamid R, Ottner F, Liedtke V, Schwanninger M, Gerzabek MH, Soja G. 2012. Characterization of Slow Pyrolysis Biochars: Effects of Feedstocks and Pyrolysis Temperature on Biochar Properties. *Journal of Environmental Quality* 41:990. DOI: 10.2134/jeq2011.0070.

Kobayashi Y, Koike S, Miyaji M. 2006. Hindgut microbes, fermentation and their seasonal variations in Hokkaido native horses compared to light horses. *Ecological Research* 21:285-291. DOI: 10.1007/s11284-005-0118-x.

Lao EJ, Mbega E. 2020. BIOCHAR AS A FEED ADDITIVE FOR IMPROVING THE PERFORMANCE OF FARM ANIMALS. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture* 4:86-93. DOI: 10.26480/mjsa.02.2020.86.93.

Lehmann J, Joseph S. 2015. *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation*. Routledge, New York.

Lin C, Stahl DA. 1995. Taxon-Specific Probes for the Cellulolytic Genus *Fibrobacter* Reveal Abundant and Novel Equine-Associated Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1349-1351. DOI: 10.1128/aem.61.4.1348-1351.1995.

Lindroth KM, Dicksved J, Vervuert I, Müller CE. 2022. Chemical composition and physical characteristics of faeces in horses with and without free faecal liquid – two case-control studies. *BMC Veterinary Research* 18:2. DOI: 10.1186/s12917-021-03096-1.

Longland AC, Byrd BM. 2006. Pasture Nonstructural Carbohydrates and Equine Laminitis. *The Journal of Nutrition* 136:2099S–2102S. DOI: 10.1093/jn/136.7.2099S.

Loschelder J, Gehlen H. 2017. Sandkolik beim Pferd – Übersicht und Fallbeispiele 33:591-596. DOI: 10.21836/PEM20170607.

Lu X, Yin Y, Li S, Ma H, Gao R, Yin Y. 2021. Effects of Biochar Feedstock and Pyrolysis Temperature on Soil Organic Matter Mineralization and Microbial Community Structures of Forest Soils. *Frontiers in Environmental Science* 9:717041. DOI: 10.3389/fenvs.2021.717041.

Man KY, Chow KL, Man YB, Mo WY, Wong MH. 2020. Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51:187–217. DOI: 10.1080/10643389.2020.1721980.

Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Massacci FR, Clark A, Ruet A, Lansade L, Costa M, Mach N. 2019. Inter-breed diversity and temporal dynamics of the faecal microbiota in healthy horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 0:1-18. DOI: 10.1111/jbg.12441.

McAvoy DJ, Burritt B, Villalba JJ. 2020. Use of biochar by sheep: impacts on diet selection, digestibility, and performance. *Journal of Animal Science* 98:1-9. DOI: 10.1093/jas/skaa380.

Morrison PK, Newbold CJ, Jones E, Worgan HJ, Grove-White DH, Dugdale AH, Barfoot C, Harris PA, Argo CM. 2020. The equine gastrointestinal microbiome: impacts of weight-loss. *BMC Veterinary Research* 16:78. DOI: 10.1186/s12917-020-02295-6.

Murray J-AM, Longland A, Moore-Colyer M, Dunnett C, Longland A. 2014. The effect of feeding a low- or high-starch diet on equine faecal parameters. *Livestock Science* 159:67–70. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.10.017.

Oikawa M, Shiga J. 2002. Equine Endotoxemia: Pathomorphological Aspects of Endotoxin-induced Damage in Equine Mesenteric Arteries. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 49:173-176. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2002.00436.

Ok YS, Uchimiya SM, Chang SX, Bolan N. 2015. *Biochar: Production, Characterization, and Applications*. CRC Press, London.

Orsini J, Galantino-Homer H, Pollitt CC. 2009. Laminitis in Horses: Through the Lens of Systems Theory. *Journal of Equine Veterinary Science* 29:105–114. DOI: 10.1016/j.jevs.2008.12.009.

Papoušková A, Masaříková M, Rychlík I, Čížek A. 2019. Vybrané kapitoly z veterinární bakteriologie I, Obecná bakteriologie. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno*.

Parsons CS, Orsini JA, Krafty R, Capewell L, Boston R. 2007. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230:885–889. DOI: 10.2460/javma.230.6.885.

Pašlack N, Vahjen W, Zentek J. 2020. Impact of Dietary Cellobiose on the Fecal Microbiota of Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 91:103106. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103106.

Patterson-Kane JC, Karikoski NP, McGowan CM. 2018. Paradigm shifts in understanding equine laminitis. *The Veterinary Journal* 231:33–40. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.11.011.

Paul LJ, Ericsson AC, Andrews FM, Keowen ML, Morales Yniguez F, Garza F, Banse HE. 2021. Gastric microbiome in horses with and without equine glandular gastric disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. DOI: 10.1111/jvim.16241.

Prasai TP, Walsh KB, Bhattarai SP, Midmore DJ, Van TTH, Moore RJ, Stanley D. 2016. Biochar, Bentonite and Zeolite Supplemented Feeding of Layer Chickens Alters Intestinal Microbiota and Reduces *Campylobacter* Load. *PLoS ONE* 11(4): e0154061 DOI: 10.1371/journal.pone.0154061

- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- Rusel JB, Wilson DB. 1996. Why Are Ruminant Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? *Journal of Dairy Science* 79:1503-1509. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4.
- Rhodes DM, Madrigal R. 2021. Management of Colic in the Field. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 37:421-439. DOI: 10.1016/j.cveq.2021.04.010.
- Ribeiro G, Lopes Correia da Silva LC, Belli CB, Vargas LP, Tesaro Piffer ML, Mirian M, Aparecida Feijó V, Fernandes WR. 2016. Occurrence of gastric ulcers in horses exercised on a treadmill. *Ciência Rural* 46:909–914. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150856.
- Sadet-Bourgeteau S, Philippeau C, Julliand V. 2016. Effect of concentrate feeding sequence on equine hindgut fermentation parameters. *Animal* 11:1146–1152. DOI: 10.1017/s1751731116002603.
- Saleem AM, Ribeiro GO, Yang WZ, Ran T, Beauchemin KA, McGeough EJ, Ominski KH, Okine EK, McAllister TA. 2018. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet. *Journal of Animal Science* 96:3121-3130. DOI: 10.1093/jas/sky204.
- Salem SE, Maddox TW, Berg A, Antczak P, Ketley JM, Williams NJ, Archer DC. 2018. Variation in faecal microbiota in a group of horses managed at pasture over a 12-month period. *Scientific Reports* 8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-26930-3.
- Shanmugasundaram K, Singha H, Saini S, Tripathi BN. 2022. 16S rDNA and ITS Sequence Diversity of *Burkholderia mallei* Isolated from Glanders-Affected Horses and Mules in India (2013–2019). *Curr Microbiol* 79:31. DOI: 10.1007/s00284-021-02701-8.
- Sheats K. 2019. A Comparative Review of Equine SIRS, Sepsis and Neutrophils. *Frontiers in Veterinary Science* 6:69. DOI: 10.3389/fvets.2019.00069.
- Shi R, Hong Z, Li J, Jiang J, Baquy A-A, Xu R, Qian W. 2017. Mechanisms for Increasing the pH Buffering Capacity of an Acidic Ultisol by Crop Residue-Derived Biochars. *J. Agric. Food Chem.* 65:8111-8119. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02266.
- Schmidt A-P, Kammann C, Gerlach A, Gerlach H. 2016. Der Einsatz von Pflanzenkohle in der Tierfütterung. *Ihtaka Journal* 364-394.
- Schmidt H-P, Hagemann N, Draper K, Kammann C. 2019. The use of biochar in animal feeding. *PeerJ*. DOI: 10.7717/peerj.7373.
- Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS. 2015. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine Veterinary Journal* 48:595–602. DOI: 10.1111/evj.12479.
- Schubert DC, Chuppava B, Witte F, Terjung N, Visscher C. 2021. Effect of Two Different Biochars as a Component of Compound Feed on Nutrient Digestibility and Performance Parameters in Growing Pigs. *Frontiers in Animal Science* 2. DOI: 10.3389/fanim.2021.633958.

Su S, et al. 2020. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses. *MicrobiologyOpen* 9:1085–1101. DOI: 10.1002/mbo3.1020.

Sugiaerto Y, Sunyoto NMS, Zhu M, Jones I, Zhang D. 2021. Effect of biochar addition on microbial community and methane production during anaerobic digestion of food wastes: The role of minerals in biochar. *Bioresource Technology* 323:124585. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124585.

Sung WK. 2017. *Algorithms for Next-generation Sequencing*. CRC Press, Boca Raton.

Tamayao PJ, Ribeiro GO, McAllister TA, Yang HE, Ominski KH, Okine EK, McGeough EJ. 2021. Effects of post-pyrolysis treated biochars on methane production, ruminal fermentation, and rumen microbiota of a silage-based diet in an artificial rumen system (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology* 273:114802. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114802.

Terry SA, Badhan A, Wang Y, Chaves AV, McAllister TA. 2019. Fibre digestion by rumen microbiota — a review of recent metagenomic and metatranscriptomic studies. *Canadian Journal of Animal Science* 99:678-692. DOI: 10.1139/cjas-2019-0024.

Theelen MJP, Luiken REC, Wagenaar JA, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Rossen JWA, Zomer AL. 2021. The Equine Faecal Microbiota of Healthy Horses and Ponies in The Netherlands: Impact of Host and Environmental Factors. *Animals* 11:1762. DOI: 10.3390/ani11061762.

Toth JD, Dou Z. 2015. Use and Impact of Biochar and Charcoal in Animal Production Systems. Pages 199-224 in Guo M, He Z, Uchimiya SM, editors. *Agricultural and Environmental Applications of Biochar: Advances and Barriers*. Soil Science Society of America, Madison. DOI: 10.2136/sssaspecpub63.2014.0043.5.

Treiber KH, Kronfeld DS, Hess TM, Byrd BM, Splan RK, Staniar WB. 2006. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228:1538–1545. DOI: 10.2460/javma.228.10.1538.

Tuniyazi M, He J, Guo J, Li S, Zhang N, Hu X, Fu Y. 2021. Changes of microbial and metabolome of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *BMC Veterinary Research* 17:11. DOI: 10.1186/s12917-020-02686-9.

Urošević M, Jajić JI, Miličić Z. 2011. Mycotoxins in horse feed: Incidence of deoxynivalenol in oat samples from stud farms. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke* 120:33–40. DOI: 10.2298/zmspn1120033u.

Valença R, Borthakur A, Mohanty S, Le H. 2021. Biochar role in improving pathogens removal capacity of stormwater biofilters. DOI: 10.1016/bs.apmp.2021.08.007.

Van Eps AW, Burns TA. 2019. Are There Shared Mechanisms in the Pathophysiology of Different Clinical Forms of Laminitis and What Are the Implications for Prevention and Treatment?. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 35:379-398. DOI: 10.1016/j.cveq.2019.04.001.

Van Weyenberg S, Sales J, Janssens GPJ. 2006. Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. *Livestock Science* 99:3-12. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2005.04.008.

Vidovic A, Huskamp B. Endotoxämie bei Kolikerkrankungen des Pferdes - Quantitative Bestimmung und klinische Relevanz. *Pferdeheilkunde* 15:325-334. DOI: 10.21836/PEM19990405.

Werners AH, Bryant CE. 2012. Pattern recognition receptors in equine endotoxaemia and sepsis. *Equine Veterinary Journal* 44:490-498. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00574.x.

Werners AH. 2016. Treatment of endotoxaemia and septicaemia in the equine patient. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40:1-15. DOI: 10.1111/jvp.12329.

Willette JA, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Hennessy ML, Dobbie T, Southwood LL. 2021. Experimental crossover study on the effects of withholding feed for 24 h on the equine faecal bacterial microbiota in healthy mares. *BMC Veterinary Research* 17:3. DOI: 10.1186/s12917-020-02706-8.

Willson N-L, Van TTH., Bhattarai SP, Courtice JM, McIntyre JR, Prasai TP, Moore RJ, Walsh K, Stanley D. 2019. Feed supplementation with biochar may reduce poultry pathogens, including *Campylobacter hepaticus*, the causative agent of Spotty Liver Disease. *PLOS ONE* 14(4) (e0214471). DOI:10.1371/journal.pone.0214471.

Yang Z, Kleindienst S, Straub D, Kretzschmar R, Angenent LT, Kappler A. 2021. A coupled function of biochar as geobattery and geoconductor leads to stimulation of microbial Fe(III) reduction and methanogenesis in a paddy soil enrichment culture. *Soil Biology and Biochemistry* 163:108446. DOI: 10.1016/j.soilbio.2021.108446.