

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	3
1 ÚVOD.....	4
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	5
2.1 Specifika trávení koní.....	5
2.1.1 Sekrece slin .....	5
2.1.2 Průběh trávení v žaludku.....	6
2.1.3 Trávení v tenkém střevě .....	7
2.1.4 Tlusté střevo .....	8
2.1.5 Mikrobiální fermentace v tlustém střevě.....	9
2.2. Stanovení stravitelnosti živin.....	10
2.3. Metody stanovení stravitelnosti krmiv u koní .....	11
2.3.1. <i>In vivo</i> stanovení stravitelnosti krmiv u koní .....	12
2.3.2. <i>In vitro</i> stanovení stravitelnosti krmiv u koní .....	14
2.4. Způsoby hodnocení obsahu energie v krmivech pro koně .....	16
2.4.1. Stanovení energie v krmivech .....	17
2.4.2. Výpočty stravitelné energie dle různých autorů a zdrojů.....	18
2.5. Výpočet krmné dávky pro koně.....	20
2.5.1. Výpočet potřeby příjmu sušiny .....	20
2.5.2. Výpočet příjmu vody.....	21
2.5.3. Výpočet potřeby energie .....	21
2.5.4. Výpočet potřeby dusíkatých látek (NL) pro koně.....	22
2.5.5. Potřeba lyzinu.....	23
2.5.6. Potřeba vápníku (Ca) a fosforu (P) .....	23
3 CÍL PRÁCE .....	24
4 MATERIÁL A METODIKA .....	25
4.1. Členění disertační práce.....	25
4.2. <i>In vivo</i> stanovení stravitelnosti krmiv.....	25
4.2.1. Bilanční pokusy.....	25
4.2.2. Experimentální stáje.....	25
4.2.3. Pokusná zvířata .....	26
4.2.4. Testovaná krmiva .....	26
4.3. Chemické analýzy.....	28

4.4.	<i>In vitro</i> stanovení stravitelnosti krmiv .....	34
4.4.1.	Vzorky krmiv .....	34
4.4.2.	Příprava vzorků .....	34
4.4.3.	Příprava pufrů.....	35
4.4.4.	Příprava očkovací látky a inkubace.....	35
4.4.5.	Výpočty byly provedeny dle metodik firmy ANKOM (2005).....	36
4.5.	Statistické analýzy .....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	38
5.1.	Stanovení stravitelnosti živin na základě metody <i>in vivo</i> u tradičních a netradičních krmiv pro koně .....	38
5.3.	Hodnocení stravitelností krmiv – <i>in vitro</i> metody .....	39
5.4.	Porovnání <i>in vivo</i> stravitelnosti a <i>in vitro</i> stravitelnosti vybraných živin.....	40
6	ZÁVĚR.....	42
7a	SOUHRN.....	44
7b	SUMMARY .....	46
8	SEZNAM LITERATURY .....	48
9	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	62
10	PŘÍLOHY .....	65

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADF	acido detergentní vláknina
ADL	acido detergentní lignin
AIA	acid insoluble ash - popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové
BE	brutto energie
BNLV	bezdušičkaté látky výtažkové
CFU	Colony Forming Units - jednotky tvořící kolonie
Cr - EDTA	chromitý komplex etylendiamintetraoctové kyseliny
DLG	Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft
GEH	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IVDMD	in vitro dry matter digestibility - in vitro stravitelnosti sušiny
IVTD	in vitro true digestibility - in vitro skutečná stravitelnost
KD	krmná dávka
Mcal	megakalorie
ME	metabolizovatelná energie
MJ	megajoul
NDF	neutrálně detergentní vláknina
NE	netto energie
NFC	Non-fibre carbohydrates - nestrukturní sacharidy
NL	dušičkaté látky
NRC	National Research Council
OM	organická hmota
pH	hodnota kyselosti
SE	stravitelná energie
SEk	stravitelná energie pro koně
strav.	stravitelnost, stravitelnosti
suš.,	sušina
TMK	těkavé mastné kyseliny
vlák.	vláknina
ZP	záchovná potřeba
ž.hm.	živá hmotnost

# 1 ÚVOD

Vědecké práce, týkající se fyziologie trávicí soustavy koně, potřeby energie a metabolismu bílkovin, byly vydány teprve koncem 19. století. Do dnešní doby nejsou zcela objasněny některé způsoby trávení a vstřebávání živin u koní. Vzhledem ke specifickému utváření trávicího traktu koní nelze využít a aplikovat široce zpracovaná data získaná pro přežvýkavce nebo ostatní monogastry. Navíc je problematika výživy a krmení koní o to složitější, že užitkovost koně není objektivně měřitelná, jako je tomu u ostatních hospodářských zvířat.

Nutriční hodnota krmiv pro koně byla vyjadřována ve škrobových jednotkách a hodnoty stravitelnosti krmiv se přebíraly od přežvýkavců. V současné době se u koní běžně používá pro vyjádření obsahu energie v krmivech tzv. stravitelná energie pro koně. Pro výživu koní v České republice je k dispozici málo údajů vypovídajících o stravitelnosti krmiv vyrobených na našem území, proto je většina údajů převzata ze zahraniční literatury. Mnoho krmiv je formulováno a prodáváno bez zkoumání jejich stravitelnosti.

Jednou z příčin nedostatku dat je ekonomická a časová náročnost *in vivo* pokusů se živými zvířaty. Vlivem této situace častěji dochází k využití a rozvoji tzv. *in vitro* metod. Jedná se o metody, které simulují podmínky trávicího traktu zvířete. Veškeré studie vznikaly modifikací technik popsaných Tilley a Terry (1963) a Goering a Van Soest (1970). Pro přežvýkavce jsou tyto metody rozsáhle zpracované a slouží jako výchozí metody pro pokusy u koní. Nejnovější studie potvrdily možnost použití koňských výkalů jako zdroje inokula k *in vitro* metodám. Z toho do budoucna vyplývá, že by tyto metody měly poskytovat platné výsledky o stravitelnosti krmiv pro koně.

Vědecké práce se stále zaměřují na stanovení správné potřeby živin a energie pro jednotlivé kategorie koní, a s tím související vliv výživy na výskyt různých onemocnění jako jsou koliky, laminitidy, žaludeční vředy a ortopedická onemocnění. Je proto důležité věnovat pozornost správné výživě a technice krmení koní.

Podstata disertační práce je velmi aktuální i z toho hlediska, že v České republice neustále rostou početní stavy koní. Celkový počet koní se u nás v posledních 10 letech téměř zdvojnásobil a za rok 2014 činí, podle Ústřední evidence koní, 81 124 zvířat.

Cílem této práce bylo stanovení stravitelnosti živin na základě metody *in vivo* a *in vitro* u tradičních a netradičních krmiv pro koně. Pro stanovení stravitelnosti živin na základě metody *in vitro* v přístroji Daisy<sup>II</sup> Incubator, bylo pro přípravu inokula, podle nejnovějších studií, využito tuhých výkalů koní. Získané hodnoty z obou metod byly porovnány mezi sebou a dále se zahraniční literaturou.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Specifika trávení koní

Kůň (*Equus caballus*) je z anatomického hlediska klasifikován jako nepřezvýkavý býložravec s jednoduše komorovým žaludkem (Nomina Anatomica Veterinaria, 2002) (Obrázek č. 1). Z fylogenetického pohledu je trávicí trakt koní přizpůsoben ke kontinuálnímu příjmu malých dávek potravy s vysokým obsahem rostlinné vlákniny, nejlépe pastvy (Argenzio, 1990).

Stejně jako v případě jiných monogastrických zvířat, se enzymatická degradace proteinů, tuků a sacharidů odehrává v žaludku a tenkém střevě. Další průběh trávení je analogií procesů, probíhajících v batoru přežvýkavců. Trávenina je přesunuta do rozšířeného slepého střeva, kde je podrobena mikrobiologické fermentaci (Obrázek 2). Tato činnost zahrnuje především rozpad frakcí vlákniny, stejně jako ostatních složek krmné dávky, které nebyly absorbovány v tenkém střevě. Z hlediska využití živin je u přežvýkavců proces fermentace efektivnější, protože se odehrává v batoru, tedy na začátku trávicího traktu (Budiansky, 1997). Zajištění mikrobiologické rovnováhy ve slepém střevě koní je nezbytné, a to nejen z hlediska jejich zdraví, ale i pro zajištění energetické rovnováhy (Pagan, 2008).

V průběhu evoluce se potravní projevy koní značně měnily. V dnešní době, díky přizpůsobivosti trávicího traktu, mohou koně přijímat různorodá krmiva. Využít co nejvíce potenciálu krmiv a zároveň se vyvarovat zdravotním poruchám trávicího traktu, vyžaduje znalosti a respektování specifických morfologických a fyziologických vlastností trávicího traktu koní. Rovněž znalost těchto detailů pomáhá při vývoji *in vitro* metod. Tato oblast vyžaduje mimořádnou pozornost a intenzivní vzdělávání (Choct a Kocher, 2000).

#### 2.1.1 Sekrece slin

Sekrece slin u koní probíhá kontinuálně během krmení, kdy je produkce slin stimulována žvýkáním. Dospělý kůň v průměru vyloučí 35 - 40 litrů slin denně (Moeller et al., 2008). U koní, na rozdíl od přežvýkavců nedochází, nebo jen v bezvýznamném množství, k sekreci alfa-amylázy. Alfa-amyláza je enzym, který umožňuje štěpit strukturní sacharidy, obsažené v buněčných stěnách píce. Z toho lze usuzovat, že enzymatická aktivita slin má u koní pouze malý podíl na trávení (Hintz a Cymbaluk, 1994; Frappe, 2010). Ve slinách se dále nachází hydrogenuhličitan sodný a chlorid sodný, jejich obsah působí jako pufrovací činidlo na tráveninu v proximální oblasti žaludku (Frappe, 2010). Uvádí se, že pH slin u různých jedinců má širokou škálu, v průměru se však uvádí hodnota 7,3 - 7,5 (Ellis a Hill, 2005).

### 2.1.2 Průběh trávení v žaludku

Koňský žaludek (Obrázek 3) je ostře zakřivený a leží mezi jícnem a tenkým střevem (Ellis a Hill, 2005). Ve srovnání s velikostí těla koně je objem žaludku relativně malý, přibližně 18 l, tedy 7,5 - 10 % z celkové kapacity zažívacího traktu; ve srovnání s 30,2 % a 61,3 % v případě tenkého a tlustého střeva (Argenzio, 1993; Frappe, 2010; Greet, 2000). Horní třetina žaludku je vyklenuta ve slepý vak, který je vystlán bezžláznatou sliznicí kutánního typu, která je pokračováním sliznice jícnu. Díky nízkému obsahu kyseliny chlorovodíkové v žaludeční šťávě (0,14 %) a příznivému pH 5 - 6 je umožněno v horním úseku žaludku trávení sacharidů pomocí enzymů rostlinných krmiv, enzymů slin a bakteriální činností (bakterie mléčného kvašení, streptokoky, kvasinky). Dominantní bakterie v tomto segmentu jsou *Lactobacillus equigenosus* a *Streptococcus criceti* (St. Pierre et al., 2012). Odbourávají se zde především lehce štěpitelné glycidy, jako cukry a škroby. Z těchto procesů vznikají kromě kyseliny mléčné a nižších mastných kyselin také plyny (oxid uhličitý, vodík) a produkty rozkladu bílkovin (amoniak, fenoly) (Frappe, 1998; Meyer et al., 1995; Frappe, 2010; Greet, 2000; McDonald et al., 2002). Celulóza se v žaludku koně netráví, vzhledem k nepřítomnosti celulólytické mikroflóry.

Další část žaludku tvoří vyústění jícnu takzvané česlo (kardie). Jedná se o lokalitu, kde dochází ke změně povrchového uspořádání *lamina epithelialis*; vrstevnatý dlaždicový epitel jícnu se mění v jednovrstevný cylindrický epitel žaludku. V této oblasti se nachází pás kardiálních žláz (*margo plicatus*), jedná se o hranici oddělující slepý vak od zadních částí žaludku, do nichž ústí vývody žláz, vylučujících žaludeční šťávu. Tato oblast je nejcitlivější na výskyt žaludečních vředů (Frappe, 2010; Greet, 2000). Dále se v místě přechodu do česla nachází vychlípenina jícnu, která tvoří záklopku. Záklopka se otevírá pouze směrem do žaludku. Díky této vychlípenině jícnu kuň nemůže zvracet, na rozdíl od jiných zvířat.

Sílicí motorika žaludku napomáhá posunu tráveniny do zadních částí žaludku; fundu (těla) a pyloru (vrátníku). Ve fundální a pylorické části klesá pH tráveniny, a to z hodnot 5 - 6, na méně než 3. Z tohoto důvodu ustává mikrobiální činnost a na řadu se dostává enzymatické trávení.

V pylorické části je vylučován do krevní plazmy hormon gastrin (Frappe, 2010). Gastrin řídí uvolňování kyseliny chlorovodíkové z parietálních buněk ve fundu. Dále sliznice fundu obsahuje cylindrické žláznové buňky, které vylučují pepsinogen (Frappe, 2010). Pepsinogen je díky kyselému prostředí aktivován na pepsin, což způsobuje hydrolýzu peptidové vazby na aminokyseliny (Stevens a Hume, 1995, Argenzio, 1990). Pepsin je nejvíce aktivní při pH 2 - 4 (Stevens a Hume, 1995) a jeho činnost je až 20 krát vyšší v pyloru než ve fundu (Frappe, 2010). Rozdíly pH ve fundu (5,4) a vrátníkové části (2,6) jsou způsobeny především pufrací schopností slin ve fundu, rozvrstvením tráveniny (Frappe, 2004) a zakřivením žaludku (Ellis a Hill, 2005). V případě, že je žaludek téměř prázdný, nachází se pH v rozmezí 1,5 - 2 kvůli nepřetržité sekreci kyseliny chlorovodíkové (Frappe,

2004). Pokud byli koně krmeni pouze senem, střední hodnota pH byla 3,1 po dobu více než 24 hodin, s typickým zvýšením po podávání krmiva v rozmezí od < 2,0 do > 5,0 (n = 5) (Murray a Schusser, 1993). Hlavním úkolem žaludečních kyselin je hydrolyza bílkovin enzymem pepsinem a v menší míře sacharidů (Hoffman, 2003; McDonald et al., 2002).

V žaludku se při pití zadrží pouze 10 % vypité vody, většina vody stéká nejkratší cestou z vyústění jícnu do pylorického otvoru podél tzv. malého zakřivení žaludku, nedochází tak k ředění žaludečních kyselin. Voda je vstřebávána v tlustém střevě (Frape, 2004; Greet, 2000). Krmivo je v žaludku zadržováno po dobu cca 15 minut a následně je posunováno do dvanáctníku. Některé živiny, zejména strukturní sacharidy, mohou zůstat v žaludku až 6 hodin. Ve skutečnosti žaludek nezůstává nikdy zcela prázdný (Jackson, 1997; Frape, 2004).

### **2.1.3 Trávení v tenkém střevě**

S ohledem na velikost těla koně je tenké střevo poměrně krátké, přibližně 19 - 30 m (Moore et al., 2001), s kapacitou 55 - 70 l v závislosti na velikosti koně (Davies, 2009). Pro srovnání délka střeva u skotu je okolo 40 m (Frape, 2004).

Tenké střevo je hlavním místem enzymatického rozkladu hydrolyzovatelných sacharidů, bílkovin, lipidů, minerálů a vitamínů. Probíhá zde trávení a vstřebávání přibližně 60 - 70 % bílkovin, 65 - 75 % rozpustných sacharidů a 15 - 25 % vlákniny (Hintz, 1990). Tenké střevo je také primárním místem trávení a absorpce tuku. Lipáza štěpí tuky na glycerol a těkavé mastné kyseliny (Davies, 2009). Koeficienty stravitelnosti tuku v tenkém střevě, ve srovnání s jinými monogastri (Józefiak et al, 2014; O'Neill et al., 2014), jsou relativně nízké, a to v rozmezí 55 - 70 % (Swinney et al., 1995). V počátečním úseku tenkého střeva je poměrně nízké pH (2,5 - 3,5), způsobené příchodem tráveniny, smíchané s kyselými žaludečními šťávami (Davies, 2009). Sekrece žluči a pankreatické šťávy ve dvanáctníku způsobí rychlý nárůst pH tráveniny na 7 - 7,5. To už je prostředí pro správné působení trávicích enzymů a absorpci živin přes stěnu střevní (Frape, 1998; Frape 2004).

Slinivka břišní vytváří nepřetržitě pankreatickou šťávu, za den přibližně 10 - 12 l na 100 kg ž.hm. (Frape, 2004). U koní, na rozdíl od jiných živočišných druhů, obsahuje pankreatická šťáva jen malé množství enzymů (Argenzio, 1990; Frape, 2004; Lorenzo-Figueras et al., 2007; Alexander a Hickson, 1969; Meyer a Coenen, 2003). Pankreatické enzymy jsou trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidáza, elastáza, kolagenóza, ribonukleáza, deoxyribonukleáza, lipáza, fosfolipáza, cholesterolesteráza, alfa-amyláza (Jelínek a Koudela, 2003). Kromě toho sekret dále obsahuje velké množství zásaditých sloučenin, především hydrogenuhličitanu sodného (Frape, 1998; Meyer et al., 1995).

Játra vylučují sekret zvaný žluč, jejím úkolem je vedle neutralizace prostředí ve střevě, také emulgace tuků. Na rozdíl od člověka kůň nemá žlučník, kde dochází k hromadění žluči. Je to z toho důvodu, že kůň je přizpůsoben ke kontinuálnímu příjmu krmiva převážně s vyšším podílem vlákniny, tudíž i žluč je vylučována kontinuálně (Davies, 2009).

#### **2.1.4 Tlusté střevo**

Tlusté střevo je hlavním místem mikrobiální fermentace a z hlediska schopnosti trávení živin je klíčem k porozumění výživy koní (de Fombelle et al., 2003a). Tlusté střevo je u koní přibližně 10 m dlouhé o objemu 50 až 60 l (Ellis a Hill, 2005). Průměrný rozsah pH v různých částech slepého střeva, změřený u koní během anestezie, se pohyboval v rozmezí 6,1 - 6,6 (de Fombelle et al., 2003b). Sliznice tlustého střeva tvoří klky, epitel se zanořuje do sliznice a tvoří krypty. Sliznice produkuje především hlen a hydrogenuhličitanové ionty (Hume, 1997).

Nestrávené a neresorbované živiny z krmiva spolu s enzymy a buňkami střevního epitelu putují do prvního úseku tlustého střeva, přibližně 30 až 45 minut poté, co hmota opustí žaludek. Většina tráveniny dosáhne slepého střeva a ventrální části tračníku do 3 hodin po nakrmení (Van Weyenberg et al., 2006). Průchod tráveniny tlustým střechem trvá 36 až 72 hodin (Sneddon and Argenzio, 1998).

Slepé střevo je velký slepý vak o délce cca 1,25 m a kapacitě 25 - 35 l, který je umístěn na distálním konci ilea (Frape, 2004; Ellis a Hill, 2005). Slepé střevo je hlavním místem absorpce vody (Frape, 2004). Slepé a tlusté střevo jsou odpovědné za přibližně 30 až 40 % trávení a vstřebávání bílkovin, 25 až 35 % rozpustných sacharidů a 78 až 85 % vlákniny (Hintz, 1990). Stěna slepého střeva je členěna čtyřmi podélnými pruhy, mezi nimiž jsou výdutě. Pohyby slepého střeva slouží k homogenizaci jeho obsahu (Frape, 2010).

Tračník u koní je asi 3,5 m dlouhý, o objemu 50 až 60 l. Podle průběhu se dělí na vzestupný, příčný a sestupný. Uspořádání tračníku je důležité pro řízení průtoku tráveniny (Ellis a Hill, 2005). Rychlost pasáže tráveniny závisí na rostoucím odporu přes každou bariéru, a také na střevní motilitě. Dále je rychlost průchodu tráveniny závislá na formě krmiva, pelety se pohybují rychleji než nasekané nebo dlouhé seno (Frape, 2010). Silné rytmické a non-rytmické kontrakce tlustého střeva mísí a posunují nestrávené zbytky do konečnicku (Frape, 2010).

Teplota v tlustém střevě savců je relativně stabilní a blíží se tělesné teplotě (Hume, 1997). Fyziologická teplota dospělých koní je 37,5 - 38,5 °C a u hříbat 38,5 - 39,3 °C. Green et al. (2005) zjistili, prostřednictvím nestravitelného senzoru, průměrnou teplotu zažívacího traktu koní v průběhu 24 hodin 38,0 °C (n = 8). Naproti tomu průměrná hodnota rektální teploty u obou pohlaví koní byla 37,7 °C (The Merck Veterinary Manual, 2010).



### 2.1.5 Mikrobiální fermentace v tlustém střevě

Odhaduje se, že 30 % (Kern et al., 1973) až 80 % (Kern et al., 1974) mikrobiální populace slepého střeva a tračníku je přísně anaerobní. Podle literatury (Kern et al., 1973 a 1974; Mackie a Wilkins, 1988; Jullian et al., 2001; Medina et al., 2002.; de Fombelle et al., 2003a) je obsah anaerobních mikroorganismů ve slepém střevě v rozsahu  $1,85 \times 10^7$  až  $2,65 \times 10^9$  CFU/ml. Bakterie mohou být rozděleny na celulolytické, proteolytické, glykolytické a laktobacily. Na fermentaci vlákniny se podílejí anaerobní bakterie jako *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* a *Selenomonas Streptococcus* (Mackie a Wilkins, 1988; Costa et al., 2012). Dále se ve slepém střevě nachází anaerobní houby *Caecomyces equi* (Gold et al., 1988) a *Piromyces mae* (Li et al., 1990). Anaerobní houby jsou schopny úspěšně rozkládat i velmi odolný vaskulární systém či sklerenchymální pletivo rostlin, obecně považované za nedegradovatelné. Houby jsou prvotními kolonizátory rostlinné biomasy, otvírají a zpřístupňují tak rostlinné stěny buněk dalším mikroorganismům (Nagpal et al., 2009; Mrázek, 2000). V mikrobiální populaci se dále vyskytují prvoci. Mezi dominantní prvoky patří: *Buetschila*, *Cycloposthium*, *Blepharocorys* a *Paraisotricha* sp. (Mackenthun et al., 2013.; Faubladiet et al., 2013).

Pro optimální mikrobiální aktivitu a absorpci těkavých mastných kyselin (TMK) je zapotřebí hodnota pH v tlustém střevě 6,5 (Frape, 2004). Pokud je pH nižší než 5, může dojít k poškození sliznice tlustého střeva a pomnožení mikrobiální populace, upřednostňující spíše produkci laktátu než TMK (Argenzio, 1990; Alexander a Hickson, 1969). Relativně malé změny v hodnotě pH mohou mít za následek výskyt tzv. subklinické acidózy. Na změny v krmné dávce rychle reaguje i mikrobiální populace. Moore a Dehority (1993) zjistili, že takové změny mohou vést ke snížení stravitelnosti sušiny, zároveň však nebyl prokázán dopad na sníženou stravitelnost vlákniny.

Mikrobiální růst a následný rozklad neškrobových polysacharidů na mastné kyseliny s krátkým řetězcem ve slepém střevě a tračníku závisí na dostupné energii a dusíku. Těkavé mastné kyseliny, vzniklé fermentační činností (nejvíce jsou zastoupeny acetát, propionát a butyrát), se stávají zdrojem energie pro koně (tvoří asi 30 % z celkové stravitelné energie) (Pond et al., 2005). Dusíkaté látky se redukují až na amoniak, který je buď využíván mikroorganismy k syntéze aminokyselin, nebo se resorbuje a detoxikuje.

Díky získání značného množství energie z vlákniny je možné, pro koně v lehké zátěži, využít zkrmování diety pouze z kvalitních objemných krmiv. Bylo zjištěno, že takové diety výrazně zvýšily hladiny acetátu v krevní plazmě před a po tréninku, a dále měly významný vliv na fermentaci v tlustém střevě a energetickou rovnováhu (Jansson a Lindberg, 2012; Clauss et al., 2013). Je také známo, že činnost řádně fungující mikroflóry dodává koním nejen mastné kyseliny s krátkým řetězcem ale i některé vitamíny (Mackenthun et al., 2013.; Faubladiet et al., 2013).

V případě, že je krmná dávka (KD) bohatá na nestrukturní sacharidy (NSC), nedokáže být

v tenkém střevě dobře strávena a využita i přes sekreci dostatečného množství potřebných enzymů (Cuddeford, 2001; Meyer et al., 1995; Rowe et al., 2001). Cuddeford (2000) uvádí, pokud je během jednoho krmení spotřeba NSC více než 0,4 % tělesné hmotnosti koně ( $\pm 2 - 4 \text{ g / kg ž.hm.}$ ), představuje to skutečnou hrozbu pro jeho zdraví (Cuddeford, 2000).

Výsledkem nedostatečného trávení NSC v tenkém střevě je přesun škrobu do slepého a tlustého střeva a jeho následná rozsáhlá fermentace, která způsobí nahromadění D-kyseliny mléčné v tlustém střevě (Bryden, 1995; Frappe, 1998; Gustaffson, 2004; Hintz a Cymbaluk, 1994; Rowe et al., 2001). Nestrávený škrob z obilovin a fruktany z píce jsou nejčastějšími složkami, přispívajícími k laktátové acidóze v kaudálním úseku tlustého střeva (Andrews, 2008). Nadměrná produkce laktátu vede ke snížení pH v tlustém střevě, následně dojde ke snížení populace žádoucích fibrolytických bakterií a k přerůstání streptokoků a laktobacilů. Nepříznivé změny v mikrobiální populaci tlustého střeva mohou způsobit nejen výskyt poruch ve funkci gastrointestinálního systému (koliky, průjmy, endotoxemie), ale také nemoci, jako je například laminitida nebo jiná onemocnění pohybového ústrojí (Milinovich et al., 2007; Costa et al., 2012). Škroby, nestrávené v tenkém střevě a jejich nežádoucí fermentace v tlustém střevě, patří mezi hlavní dietetickou příčinu kolik (Durham, 2009). Při správném krmení je mikrobiální populace v rovnováze se svým hostitelem a udržuje jednotnost ekosystému, čímž přispívá k prevenci poruch a tvoří bariéru proti patogenům (Jullian et al., 1999).

## 2.2. Stanovení stravitelnosti živin

Stravitelnost krmiva (živiny) je jedním ze základních ukazatelů výživné hodnoty krmiv. Dle Van Soesta (1994) stravitelnost krmiva znamená rozdíl mezi obsahem živiny přijaté v krmivu a vyloučené výkaly zvířetem. Za stravitelnou považujeme např. i živinu, přeměněnou při mikrobiálním trávení v předžaludku přežvýkavců v energeticky bohatý plyn, který se z organismu vyloučí krkáním (Kacerošský et al., 1990). Zvíře využívá živiny pro svoji záchovu, produkci a reprodukci (Mudřík et al., 2006; Zelenka 2006).

Běžně je zjišťováno množství bilančně stravitelné živiny. Od obsahu živin v krmivu odečítáme obsah živiny ve výkalech. (Mudřík et al., 2006; Zelenka, 2006).

**Bilančně stravitelná živina** = živina v krmivu – živina ve výkalech [g]

Hodnota se také označuje jako zdánlivě stravitelná živina, protože ve výkalech se nachází

i živiny, které nepochází přímo z krmiva, ale z organismu zvířete, například z trávicích šťáv či odloupaných epitelů (Zelenka, 2006). Procentuální podíl bilančně stravitelné živiny z jejího celkového obsahu v krmivu nazýváme koeficientem bilanční (zdánlivé) stravitelnosti, méně přesně

$$\text{Koeficient bilanční stravitelnosti} = \frac{\text{bilančně stravitelná živina}}{\text{živina krmiva}} * 100 \quad [\%]$$

jen koeficient stravitelnosti (Jeroch et al., 2006).

Při zjišťování bilanční stravitelnosti zanedbáváme skutečnost, že výkaly obsahují také živiny metabolického původu. Přesnější je však stanovovat skutečně stravitelné živiny, kdy nejprve stanovíme obsah živin metabolického původu a pak od živiny krmiva odečteme jen nestrávenou živinu krmiva (Zelenka, 2006).

$$\text{Skutečně stravitelná živina} = \text{živina v krmivu} - (\text{celkový obsah živiny ve výkalech} - \text{živina metabolického původu ve výkalech}) \quad [\text{g}]$$

Procentuální podíl skutečně stravitelné živiny z celkového obsahu v krmivu nazýváme koeficientem skutečné stravitelnosti (Jeroch et al., 2006).

$$\text{Koeficient skutečné stravitelnosti} = \frac{\text{skutečně stravitelné živiny v krmivu}}{\text{přijaté živiny}} * 100 \quad [\%]$$

### 2.3. Metody stanovení stravitelnosti krmiv u koní

Stanovení stravitelnosti je důležité při výrobě krmných směsí a formulaci krmných dávek pro koně (Lowman et al., 1999). Producenti mohou díky hodnotám stravitelnosti vyrobit konkrétní krmivo pro danou kategorii koní. Pro spotřebitele je informace o stravitelnosti krmiva důležitá také z ekonomického hlediska, bude-li se držet pokynů přesného dávkování, vyhne se tak překrmování a plýtvání krmivem. Stravitelnost krmiv může být stanovena pomocí *in vivo* (v živém těle) experimentů nebo alternativními *in vitro* (ve zkumavce) technikami.

### 2.3.1. *In vivo* stanovení stravitelnosti krmiv u koní

Od roku 1800 je standardně využívána ke stanovení stravitelnosti krmiv metoda *in vivo* (Coles et al., 2005). Kvantitativně stanovit množství přijatého krmiva a vyloučených výkalů je považováno za nejpřesnější stanovení stravitelnosti krmiv u koní (Bergero et al., 2009). Nevýhody této metody jsou vysoké finanční náklady, časová náročnost a nízký počet zvířat, zařazených do experimentu (Ellis a Hill, 2005). Metody *in vivo* stanovení stravitelnosti krmiv a hodnocení krmiv pro koně nedosahují takové přesnosti ve srovnání s přežvýkavci a ostatními monogastry (Ellis a Hill, 2005; Stern et al., 1997).

#### **Přímé metody zjišťování koeficientů stravitelnosti živin v krmivech:**

Nejpřesnější metoda stanovení stravitelnosti je biologická metoda, tzv. bilanční pokus na zvířatech (Bergero et al. 2009). Zjišťuje se u několika zvířat; čím větší počet zvířat, tím jsou výsledky přesnější a jejich spolehlivost je vyšší. Do pokusu se zařazují zvířata zdravá, nezamořená parazity (Kacerovský et al., 1990).

Pokus se dělí na přípravné a bilanční období:

*Přípravné období* – v tomto období se musí z trávicího traktu vyloučit zbytky dříve zkrmovaných krmiv, a zároveň se zvířata navykají na zkoušenou krmnou dávku, na pobyt na bilančním stání a zjišťuje se také množství krmiv, která jsou ochotně (beze zbytků) přijímána. Délka přípravného období je určena různou dobou průchodu krmiva u jednotlivých živočišných druhů (Kacerovský et al., 1990; Jeroch et al., 2006).

*Hlavní perioda* – vlastní pokusné období trvá, v závislosti na druhu zvířete, od 5 do 10 dní. Můžeme použít klasickou nebo indikátorovou metodu.

Byly provedeny četné pokusy na zkrácení doby pokusného období, bez ovlivnění řádného hodnocení koeficientů stravitelnosti. Podle Goachet et al. (2009) zkrácení doby pokusného období z 5 - 6 dnů na 3 - 4 dny lze považovat za optimální. Přesto, dokonce i 3-denní pobyt v boxu, je pro sportovního koně omezením pohybu a může vyvíjet negativní vliv na jeho chování, a v důsledku toho ovlivňuje harmonický průběh trávicích procesů.

V roce 1960 byl vypracován unikátní postroj se speciálním vakem. Postroj umožňuje sběr nekontaminovaných tuhých a tekutých výkalů, ale pouze u valachů (Friend a Nicholson, 1965). Dnešní podobu patentovaného postroje (Equisan Marketing, Ltd., South Melbourne, Victoria, Austrálie) zachycuje obrázek 4. Použití postrojů snižuje časovou náročnost pokusů, ale neřeší omezený pohyb koně a tudíž může negativně ovlivňovat trávicí procesy (Sales, 2012).

### 2.3.1.1. Klasická metoda

V bilančním období se zaznamenává množství předkládaných krmiv, evidují se případné nedožerky, popř. krmivo vyházené ze žlabu, kvantitativně se shromažďují výkaly a odebírají se vzorky pro analýzy. U všech krmiv, tedy i u suché objemné píče a krmiv jadrných, se stanovuje při navažování dávek pro jednotlivá krmení sušina. Během pokusu je dodržován pravidelný režim dne. Denně se odebírané vzorky výkalů zmrazují. Při dalším zpracování vzorků dáváme přednost lyofilizaci před předsušováním, u kterého dochází ke ztrátě živin (Kacerovský et al., 1990).

### 2.3.1.2. Indikátorová metoda

Chceme-li se vyhnout nutnosti přesného zjišťování spotřeby krmiva a množství vyloučených výkalů, můžeme koeficienty stravitelnosti stanovit indikátorovou metodou. U této metody se vypočte stravitelnost ze změny koncentrace etalonové látky (marker, indikátor) u krmiv a výkalech následovně:

**Koeficient bilanční stravitelnosti (%) = 100 - [(% indikátoru v krmivu: % indikátoru ve výkalech) \* (% živin ve výkalech: % živin v krmivu) \* 100]**

Využívají se dvě formy indikátorů, přirozené indikátory, které představují přirozené složky krmiva, jako např. lignin (ADL), popel nerozpustný ve 4 M kyselině chlorovodíkové (AIA) a methoxylové skupiny. Druhou formu představují látky ke krmné dávce záměrně přidávané, jako oxid chromitý ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ), chromitý komplex etylendiamintetraoctové kyseliny (Cr - EDTA) a polyetylen glykol. Látky, přidávané ke krmivu jako indikátor, musí být nestravitelné, nesmějí ovlivňovat trávení, nesmí se zapojovat do metabolických procesů a nijak je omezovat, nesmějí být produkovány v trávicím ústrojí, nesmí být rozkládány mikroorganismy a/nebo ovlivňovat jejich aktivitu. Zároveň se musí jednat o látky neškodné pro zvíře, které musí být nezaměnitelné se všemi látkami z krmiva a musí být snadno a přesně identifikovatelné (Zeman et al., 2006; Kacerovský et al., 1990).

Z pohledu historie byl lignin prvním použitým indikátorem. Studie stravitelnosti s využitím ligninu byly provedeny již v 19. století (Kotb a Luckey, 1972). S postupem času se však ukázalo, že získané výsledky jsou nespolehlivé. Důvodem je skutečnost, že lignin je částečně degradován houbami, osidlujícími tlusté střevo koní (Nagpal a kol., 2009). Další pokusy byly provedeny na Arabských koních, zařazených do tréninku. Jako indikátory byly použity lignin a AIA. Také zde se potvrdilo, že koeficienty stravitelnosti byly přeceňované, ve srovnání s klasickou metodou (Goachet

et al., 2009). V jiném experimentu aplikace AIA přinesla o několik procent vyšší spolehlivost výsledků, v porovnání s ligninem (Martin et al., 1989). V dalších pokusech s AIA a ligninem bylo znovu prokázáno, že lignin je nespolehlivá metoda, tentokrát však z důvodů jeho špatného vymývání z výkalů. Naproti tomu se výsledky u AIA shodovaly s bilanční metodou (Miraglia et al., 1999). Na základě hodnocení, v nichž byla stanovena stravitelnost "středomořských trav" pro koně bylo rozhodnuto, že AIA lze použít pouze pro rychlé hodnocení koeficientů stravitelnosti. Z těchto důvodů někteří výzkumníci doporučují použití bilanční metody, především v pokusech, které slouží k poskytnutí spolehlivých údajů, využívaných pro modely v široce dostupných tabulkách nutričních hodnot a norem krmení (Bergero et al., 2004).

### **Nepřímé metody zjišťování koeficientů stravitelnosti živin v krmivech:**

Některá krmiva nemůžeme zkrmovat jako jedinou komponentu krmné dávky (Zelenka, 2006), protože by nebyly splněny požadavky na sestavení krmné dávky. V tomto případě je nutno použít ke zjištění stravitelnosti živin v krmivu diferenční nebo substituční metodu (Jeroch et al., 2006).

#### *2.3.1.3. Diferenční metoda*

Metoda je rozdělena do dvou dílčích pokusů. V prvním dílčím pokuse se podává základní krmná dávka, kterou lze samostatně zkrmovat, ve druhém dílčím pokuse se přidá druhé testované krmivo, které nelze zkrmovat samostatně. Nakonec jsou vypočítány rozdíly ve stravitelnosti živin mezi první a druhou částí pokusu (Jeroch et al., 2006).

#### *2.3.1.4. Substituční metoda*

Princip spočívá v nahrazení jednoho dílu základní krmné dávky ve druhé části pokusu testovaným krmivem. Množství krmiva je tak u obou dílčích pokusů stejné (Jeroch et al., 2006).

### **2.3.2. *In vitro* stanovení stravitelnosti krmiv u koní**

#### *2.3.2.1. Daisy<sup>II</sup> Incubator*

Vzhledem k tomu, že bilanční pokusy na zvířatech jsou velmi časově náročné, pracné, neumožňují stanovit stravitelnost velkého počtu vzorků a často jsou spojené s omezením pohybu zvířat, byly vyvinuty pro stanovení stravitelnosti i další analytické metody, jednou z nich je metoda *in vitro* pomocí přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator. *In vitro* zařízení představuje umělý trávicí systém (Goldman et al., 1987; Stern et al., 1997).

Pro přežvýkavce jsou *in vitro* metody trávení široce používány a propracovány, jejich vývoj započal roku 1963, kdy Tilley a Terry (TT) (Tilley a Terry; 1963) navrhli první *in vitro*

dvoustupňovou metodu. Z tohoto výchozího systému byly postupem času vyvinuty zdokonalené metody (Grant a Mertens, 1992). Principem této metody je dvoustupňová inkubace, kdy je v 1. stupni použito jako inokulum bachorová tekutina a ve 2. stupni pepsin s naředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Po inkubaci se stanoví nestrávená organická hmota (Jeroch et al., 2006).

Mnohem efektivnější alternativa Tilley a Terry (1963) s menší pracností, je metoda založená na použití přístroje Ankom Daisy<sup>II</sup> Incubator (Ankom Technology Corp., Fairport, NY). Připravené a zvážené vzorky krmiv se umísťují do inkubačních nádob s přídavkem pufrčního roztoku a bachorové tekutiny (Mudřík et al., 2006). Během inkubace je udržována konstantní teplota 39 °C a nádoby se otáčejí tak, aby simulovaly podmínky v bachoru. Vzorky krmiv jsou mikrobiálně tráveny mikroorganismy, obsaženými v bachorové tekutině. Na konci inkubace zůstává pouze nestravitelný podíl vlákniny. Na základě rozdílu hmotnosti vzorku a obsahu živin před a po inkubaci a analýze NDF se počítá *in vitro* skutečná stravitelnost (IVTD) a stravitelná NDF. Obě tyto hodnoty se využívají pro hodnocení kvality objemných krmiv (*In vitro* true digestibility, 2009).

Mabjeesh et al. (2000) a Holden (1999) popisují ve své práci využití přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator pro predikci trávení krmiv a nahrazení starších *in vitro* metod. Data získaná touto metodou jsou srovnatelná s daty, získanými pomocí tradičních *in vitro* metod. Holden (1999) konstatuje, že tento efektivní systém je vhodný pro měření IVDMD (*in vitro* stravitelnosti sušiny). Přesto Wilman a Adesogan (2000) nachází u výsledků z pokusů na Daisy<sup>II</sup> Incubatoru menší nepřesnosti v predikci stravitelnosti pro přežvýkavce, v porovnání s výsledky z *in vivo* pokusů. Micek et al. (2001) porovnávali *in vivo* stravitelnost s metodami *in situ* (v místě), *in vitro* technikou s použitím Daisy<sup>II</sup> Incubatoru a technikou plynové produkce a zjistili mezi výsledky, stanovenými pomocí těchto metod, vysoké (statisticky průkazné) korelace.

V digesčních nádobách je možné inkubovat zároveň vzorky jadrného a objemného krmiva. Příklad přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator přispívá ke zvýšení efektivnosti práce a představuje významnou výhodu pro analýzu objemného, jadrného nebo směsného krmiva (Holden, 1999).

Použití bachorové nebo cekální tekutiny z kanylovaných zvířat je jednou z hlavních nevýhod této techniky. Z toho důvodu je velmi omezené její použití ve výzkumu u koní, protože kanylování koně jsou velmi těžko dostupní. Proto se vědci začali zabývat testováním výkalů jako potencionálního zdroje očkovací látky (Nsahlai a Umunna, 1996; Akhter et al., 1999). Lowman et al. (1999) dokázali, že koňské výkaly mohou být využívány jako zdroj mikrobiální očkovací látky, a že mikroflóra výkalů je životaschopná ještě po několika hodinách po kálení. Lattimer (2007) uvádí, že Daisy<sup>II</sup> může být využívána pro predikování správných odhadů stravitelnosti sušiny s použitím očkovací látky, získané z koňských výkalů za předpokladu, že jsou koně krmeni vysoce kvalitní krmnou dávkou.

Nejnovější studie potvrdily možnost použití koňských výkalů jako zdroje inokula k *in vitro* metodám. Macheboeuf a Jestin (1997) dokázali, že jadrná a objemná krmiva, inkubovaná koňskými výkaly, produkovala podobné plyny ve stejných koncentracích, jaké jsou známé z tradičních metod.

Ringler et al. (2005a, b) zjistili, že kombinace použití koňského inokula z výkalů s uzavřeným systémem fermentace v přístroji Daisy<sup>II</sup> Incubator poskytují platné *in vitro* odhady stravitelnosti sušiny (suš.), neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a acido detergentní vlákniny (ADF).

#### 2.3.2.2. Metoda *in sacco*

Metoda *in sacco* (technika nylonových sáčků) umožňuje stanovení stravitelnosti v jednotlivých úsecích trávicího traktu a určení rychlosti a místa trávení v trávicím traktu. Tato metoda je hojně využívána u přežvýkavců s bachorovou (případně i střevní) kanylou. Přes kanylu se do bachoru pokusných zvířat zavedou porézní sáčky se vzorky krmiv a po určité době se v něm inkubují (2 až 96 h), po vyjmutí sáčku následují chemické analýzy, jejichž cílem je zjistit obsah živin v nestráveném zbytku. Velikost pórů sáčků je doporučována 30 - 60  $\mu\text{m}$  (Vanzant et al., 1998). Tuto metodu lze také dobře využívat pro stanovení degradace živin v různých časových intervalech (Lindberg, 1985; Nocek, 1988; Michalet-Doreau a Ould-Bah, 1992). Díky této metodě bylo možné studovat trávicí procesy u koní, které probíhají před vyústěním do slepého střeva (Macheboeuf 1995, 1997). Vzhledem k tomu, že je to velmi invazivní metoda, která vyžaduje použití kanyly, nemůže být prováděna u zvířat, používaných ve sportu. Kanylace umožňuje umístění několika sáčků, naplněných krmivem, do trávicího traktu koně. Je možné testovat současně několik krmiv (de Fombelle et al., 2004). Tuto metodu využívají u koní de Fombelle et al. (2001, 2003a, 2004) ke studiu precekální degradace škrobu, podávaného v různých koncentracích. Po skončení degradace krmiva v tenkém střevě jsou sáčky izolovány ze slepého střeva za pomoci magnetu a zbytky jsou analyzovány. Broderick a Cochran (2000) shrnují přednosti a nedostatky této metody; třebaže *in sacco* technika je nedokonalá a není schopná plně nahradit *in vivo* metody, je rychlá, opakovatelná a nevyžaduje složitou technologii. Je však třeba počítat na začátku s chirurgickým zákrokem při zavedení bachorové kanyly a následně i s péčí o operované zvíře. To vše metodu prodražuje a dělá ji náročnou.

## 2.4. Způsoby hodnocení obsahu energie v krmivech pro koně

Pro výpočet potřeby energie pro koně je k dispozici více zdrojů dat. V našich podmínkách je výhodné vycházet z dat, která publikuje GEH (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere) v Německu. Další systém hodnocení vyvinula francouzská společnost INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) v roce 1984. Tento systém byl aktualizován v roce 1990.



Dalším důležitým zdrojem dat, který je využíván především v USA, je NRC (National Research Council); poslední revidované vydání je z roku 2007.

Energie je nejdůležitějším kritériem v krmné dávce sportovního koně. Potřeba energie rapidně vzrůstá s přibývajícím zátěží. Organismus ji získává prostřednictvím chemických procesů, při kterých dochází k přeměně živin na energii ze sacharidů (rozpuštěných a nerozpuštěných), včetně vlákniny, tuků a v menším rozsahu, u zdravých koní, z aminokyselin. Konec potřebují energii pro zajištění životních pochodů; tato energie je označována termínem energie na záchovu (Davies, 2009). Ta je vyšší než u jiných hospodářských zvířat. Důvodem je pravděpodobně vyšší požadavek na spontánní aktivitu než u jiných druhů zvířat (Zeman et al., 2005). V momentě, kdy koně začínají trénovat, narůstá potřeba energie pro práci. Konec v těžké zátěži, např. dostihová v plném tréninku, mají tak vysoké požadavky na energii, že je často obtížné je naplnit a následně se u nich potýkáme se ztrátou hmotnosti.

Důležité je také specifikovat typ práce jednotlivých sportovních koní, protože dostihová koně, kteří běhají krátké distance (musí vyvinout za nejkratší čas co nejrychlejší tempo), využívají energii odlišným způsobem, než koně, pracující pomaleji na delších tratích, např. distanční koně. Další kategorií koní s vysokým požadavkem na energii jsou laktující klisny, které v prvním trimestru březosti potřebují přibližně stejně energie (132,6 MJ/den/500 kg ž.hm.) jako dostihová kůň v tréninku (144,4 MJ/den/500 kg ž.hm.) (NRC, 2007).

Nejnovější přezkoumání krmných dávek přichází od německých vědců, kteří navrhuji změny v doporučení dávkování proteinu a energie. Práce se zaměřuje na nový systém stanovení krmné dávky s ohledem na preceálně strávený protein a metabolizovanou energii. Hlavní oblastí změn je stanovení energie a potřeby živin pro klisny a sportovní koně (Coenen et al., 2011).

#### **2.4.1. Stanovení energie v krmivech**

Energii krmiv lze zjistit spálením v bombě kalorimetru (procedura, která stanovuje spalné teplo, uvolněné dokonalým spálením vzorku v kyslíkové atmosféře za předepsaných podmínek); takto zjištěná energie se nazývá brutto energie (BE) a je uváděna v megajoulech (MJ). Tato energie ovšem není pro koně dostupná v plné výši, protože nevyužitá část energie odchází ve výkalech. Proto se vypočítává stravitelná energie (SE), což je energie obsažená v krmivu, snížená o hodnotu energie, obsažené ve výkalech. Nicméně ani tento způsob není považován za nejpřesnější, a proto se dnes můžeme setkat s výpočtem tzv. metabolizovatelné energie (ME), což je energie přijatého krmiva, která se nevyloučila výkaly, močí a plynnými zplodinami trávení. Dalším stupněm je netto energie (NE), která bere v úvahu i energii tepelných ztrát (fermentační teplo, teplo vytvářené při metabolismu živin) (Obrázek č. 5).

Jednotka, která se využívá v České republice je:

**SE<sub>k</sub> = stravitelná energie pro koně (MJ)** (konkrétně zdánlivě stravitelná energie SE)

Metody stanovení jsou:

- Přesné bilanční pokusy
- Chemické analýzy a predikční rovnice
- Tabulkové hodnoty (literatura)

Nejpřesnější metodou stanovení stravitelné energie krmiv jsou bilanční pokusy, jsou však ekonomicky velmi náročné.

Dříve byly hodnoty SE odhadovány na základě výsledků, které pocházely z pokusů na jiných hospodářských zvířatech, jako jsou prasata nebo ovce. Toto však nebylo ideální.

#### **2.4.2. Výpočty stravitelné energie dle různých autorů a zdrojů**

##### **NRC 1989**

1) Výpočet SE pro suchá objemná krmiva a zelenou píci.

$$SE_k \text{ (Mcal/kg)} = 4,22 - 0,11 \times (\% \text{ ADV}) + 0,0332 \times (\% \text{ NL}) + 0,00112 \times 0,00112 \times (\% \text{ ADV}^2)$$

2) Výpočet SE pro koncentrovaná krmiva a bílkovinné doplňky

$$SE_k \text{ (Mcal/kg)} = 4,07 - 0,055 \times (\% \text{ ADV})$$

*ADV – acido detergetní vlákna*

*NL – dusíkaté látky*

*pozn.: Mcal – megakalorie – jednotka energie používaná v USA*

*MJ – megajoul – jednotka (SI) energie používaná v UK*

*1 Mcal = 4,184 MJ*

Ve skutečnosti je rovnice NRC (1989) vhodná spíše pro počítání SE u obilovin a vedlejších produktů, vzniklých při jejich zpracování, a také produktů z potravinářského průmyslu, jako jsou cukrovarské řízky.

### **Pagan 1998**

$$SE_k = (\text{Kcal/kg}) = 2118 + 12,18 \times (\% \text{ NL}) - 9,37 \times (\% \text{ ADV}) - 3,83 \times (\% \text{ hemicelulózy}) + (\% \text{ tuku}) \\ + 20,35 \times (\text{NFC}) - 26,3 (\% \text{ popele})$$

*Hemicelulóza – vypočtena jako rozdíl stanovených NDV a ADV*

*NFC (nestrukturní sacharidy): výpočet NFC = 100 % - (NL % + NDV % + tuk % + popel %)*

Bohužel žádná z těchto rovnic není považována za dostatečně přesnou pro krmiva, obsahující vysoké procento tuku či vlákniny.

Autoři Zeyner a Kienzle (2002) navrhli další rovnice.

### **Zeyner a Kienzle 2002**

$$SE_k (\text{MJ/kg sušiny}) = -3.60 + 0.211 \times \text{NL} + 0.421 \times \text{Tuk} + 0.015 \times \text{Vlák.} + 0.189 \times \text{BNLV} (\text{g/kg sušiny})$$

Rovnici není vhodné používat pro dávky, obsahující více než 35 % NL a 8 % hrubého tuku v 1 kg sušiny.

V České republice používáme doporučení podle Zemana a kol. (2005), kteří propočítávali dle rovnice DLG (1984)

### **DLG 1984**

$$SE_k (\text{MJ/kg sušiny}) = 0,0230 \times ks \times \text{SNL}_k \\ + 0,0381 \times ks \times T_k \\ + 0,0172 \times ks \times \text{Vlák.}_k \\ + 0,0172 \times ks \times \text{BNVL}_k$$

*ks – koeficient stravitelnosti vyjádřený v %/100*

*Index k – vyjadřuje, že se jedná o koně*

## 2.5. Výpočet krmné dávky pro koně

Obecně se požadavky na živiny a energii rozdělují podle následující klasifikace:

- Záchova
- Práce
- Růst
- Březost
- Laktace

Např.: záchovná krmná dávka je vytvořena pro dospělého, nepracujícího koně s průměrnou hmotností těla a kondicí v podmínkách normálního klimatu. Nepracující dospělí koně a poníci mohou být udržováni na vysoce kvalitních objemných krmivech bez přídavku jádra, ačkoliv pastvu a píci je obvykle nutné doplnit o chybějící minerální prvky.

Před formulací KD je důležité položit několik zásadních otázek:

- Jaké je plemeno koně?
- Jaká je hmotnost koně?
- Jaká je kondice koně?
- Jakou práci kůň vykonává?
- Jedná se o rostoucího koně?
- Jedná se o březí nebo laktující klisnu?
- Jaký je obsah živin v krmivech?
- Jaká krmiva jsou vhodná pro sestavení KD?

### 2.5.1. Výpočet potřeby příjmu sušiny

Příjem sušiny úzce souvisí s využitím a kondicí koně (NRC, 2007). Obecné pravidlo stanovuje 1,5 % až 2,5 % živé hmotnosti koně na den. Závisí na individuálním využití koně. Těžce pracující koně nebo laktující klisny budou vyžadovat horní hranici (2,5 %), kdežto obézní koně a poníci mohou dostávat minimum (1,5 %). Meyer et al. (1995) odhaduje toto rozpětí na 1,4 - 3,9 %.

## 2.5.2. Výpočet příjmu vody

Spotřeba vody závisí na typu přijímaného objemného krmiva. Např. kůň, pokud přijme 14 kg pastevního porostu (pastva obsahuje přibližně 80 % vody), přijme  $14 \times 0,80 = 11,2$  kg vody. Pokud sežere 7 kg sena (cca 15 % vody), přijme  $7 \times 0,15 = 1,05$  kg vody (Davies, 2009). Obecně lze říci, že na 1 kg sušiny KD je průměrný příjem vody 2 až 4 l. Vyšší příjem vody (cca 5 l na 1 kg sušiny) souvisí s nadměrným pocením a vysokými teplotami (Jeroch et al., 2006). Pocení vyvolané fyzickou zátěží nebo laktace může zvýšit příjem vody o 50 až 120 %. Důležitý je neomezený přístup ke zdroji čerstvé, čisté vody. Jedinou výjimkou může být doba bezprostředně po intenzivní zátěži (NRC, 2007).

## 2.5.3. Výpočet potřeby energie

### 2.5.3.1 Energie pro záchovu

GEH (1994) uvádí denní potřebu stravitelné energie za normálních klimatických podmínek zhruba 0,6 MJ (0,55 – 0,63) na kg ž. hm.<sup>0,75</sup> (Tabulka č. 1). Ve výpočtu je zohledněna metabolická velikost těla koně.

$$\text{ZP SE v MJ/den} = 0,6 \times H^{0,75}$$

NRC (2007) záchovná energie dle NRC zohledňuje temperament koní, pohyb venku, atd. Podle toho vznikly tři typy požadavku na SE:

- Minimální – nepracující koně, boxově ustájení, odpočinek ve stáji
- Průměrný – denně venku, průměrně temperamentní
- Zvýšený – denně venku pracující, laktující, rostoucí, nervózní typy.

$$\begin{aligned} \text{ZP SE v MJ/den} &= \text{ž. hm. (kg)} \times 0,1268 \text{ (minimální)} \\ &\quad \times 0,1393 \text{ (průměrný)} \\ &\quad \times 0,1519 \text{ (zvýšený)} \end{aligned}$$

Jestliže kůň vykonává další práci, je potřeba spočítat vedle energie na záchovu i energii potřebnou pro práci.

### 2.5.3.2 Energie pro svalovou práci koní

**NRC (2007)** výpočet energie se odvíjí od potřeby na práci podle srdečního tepu, jak vyplývá z Tabulky č. 2.

### 2.5.3.3. Energie v období březosti a laktace klisen

Klisy nemají zpočátku březosti zvýšenou potřebu energie. Zhruba po 200. dni březosti začíná plod růst rychleji a v tuto chvíli je třeba počítat s mírným přidavkem energie a živin. Např. při živé hmotnosti klisny 600 kg je denní zvýšená potřeba 18 MJ SE.

Během laktace přísun energie ovlivňuje množství mléka a jeho složení. Tudíž potřeba klisny s živou hmotností 600 kg v 1., 3. a 5. měsíci laktace je cca 62, 69 a 47 MJ SE (Jeroch et al., 2006).

### 2.5.3.4. Energie pro rostoucí koně

Mladí rostoucí koně by neměli být překrmováni, a zároveň by neměli strádat nedostatkem živin a energie. Veškeré výkyvy mohou poznamenat tělesný vývoj zvířete a později i jeho výkonnost. Ideální je lineární růstová křivka, charakterizující plynulý vývoj kostí a svalstva.

Ze součtu záchovné potřeby, včetně potřeby na pohybovou aktivitu ve výběhu nebo na pastvě a potřeby pro růst, vyplývají údaje v Tabulce č. 3 k celkové potřebě v různých věkových obdobích, v závislosti na živé hmotnosti dospělých zvířat.

## 2.5.4. Výpočet potřeby dusíkatých látek (NL) pro koně

### **GEH (1994)**

Jednotkou jsou stravitelné dusíkaté látky pro koně  $SNL_k$ .

Z dosavadních poznatků vyplývá, že potřeba pro záchovu na den činí přibližně 3 g hrubé bílkoviny na 1 kg ž. hm.<sup>0,75</sup> nebo 5 g stravitelné hrubé bílkoviny na 1 MJ stravitelné energie. Tato dávka udržuje rovnováhu v hospodaření s dusíkem s mírným přebytkem.

Vysokobřezí a laktující klisy potřebují bílkoviny pro tvorbu plodu a následně pro tvorbu mléka. Na 1 kg mléka potřebují asi 30 g  $SNL_k$ .

Rostoucí koně ve věku 3 – 6 měsíců mají zvýšenou potřebu stravitelných dusíkatých látek pro záchovu, a to 4,4 – 5,3 g na 1 kg ž. hm.<sup>0,75</sup> a den. S postupně přibývajícím věkem tato hodnota klesá a přibližuje se potřebě dospělých koní. Produkční potřeba stravitelných záchovných dusíkatých látek vyplývá na jedné straně z denního přírůstku bílkovin v přírůstku tělesné hmotnosti a ze zhodnocení dusíkatých látek na tento přírůstek.

## **NRC (2007)**

pro záchovnou krmnou dávku v kg se počítá s následujícími koeficienty:

- minimální – ž. hm. × 1,08 g NL/kus/den
- průměrný – ž. hm. × 1,26 g NL/kus/den
- zvýšený – ž. hm. × 1,44 g NL/kus/den

extra přídavek, zohledňující druh práce:

- lehká práce – ž. hm. × 0,266 g NL/kus/den
- střední práce – ž. hm. × 0,266 g NL/kus/den
- těžká práce – ž. hm. × 0,266 g NL/kus/den

### **2.5.5. Potřeba lyzinu**

NRC (2007) uvádí možnost výpočtu potřeby lyzinu z denní potřeby dusíkatých látek (NL):

Lyzin g/den = 4,3 % z NL

### **2.5.6. Potřeba vápníku (Ca) a fosforu (P)**

#### **GEH (1994)**

Výpočty podle faktorové metody (Tabulka č. 4), která zohledňuje následující faktory např., množství a složení potu, embryonální vývoj po 8. měsíci březosti, produkci mléka, usazování minerálních látek v kostech.

**NRC (2007)** doporučuje:

- Lehká práce – 0,04 g **Ca** /kg ž. hm.
- Střední práce – 0,06 g **Ca** /kg ž. hm.
- Těžká práce – 0,07 g **Ca** /kg ž. hm.
  
- Lehká práce – 0,04 g **P** /kg ž. hm.
- Střední práce – 0,036 g **P** /kg ž. hm.
- Těžká práce – 0,058 g **P** /kg ž. hm.

### 3 CÍL PRÁCE

1. Stanovení stravitelnosti živin na základě metody *in vivo* u tradičních a netradičních krmiv pro koně.
2. Stanovení stravitelnosti živin na základě metody *in vitro* pomocí přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator s využitím koňských výkalů jako zdroje inokula.
3. Porovnání *in vivo* stravitelnosti a *in vitro* stravitelnosti vybraných živin.

Smyslem biologických pokusů bylo potvrdit či vyvrátit hypotézu, že Daisy<sup>II</sup> Incubator je vhodným *in vitro* systémem pro stanovení stravitelnosti krmiv pro koně.



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Členění disertační práce

Ke stanovení stravitelnosti krmiv bylo využito dvou metod:

*In vivo* stanovení stravitelnosti krmiv – bilanční pokusy

*In vitro* stanovení stravitelnosti krmiv – přístroj Daisy<sup>II</sup> Incubator

### 4.2. *In vivo* stanovení stravitelnosti krmiv

#### 4.2.1. Bilanční pokusy

Pokusy byly provedeny klasickou metodou. Každý pokus byl rozdělen na přípravné a bilanční období. Během přípravného období si zvířata navykala na pokusnou krmnou dávku, na pobyt v bilančním stání (boxech) a bylo zjišťováno množství krmiv, která jsou zvířata ochotná beze zbytků přijímat. Délka přípravného období byla přizpůsobována tak, aby koně bez problému přijímali zkoumanou krmnou dávku a mikroflóra trávicího traktu koní měla dostatek času se přizpůsobit nové krmné dávce.

Bilanční pokusné období bylo pro všechny čtyři pokusy stejně dlouhé, a to 6 dní (2 × 3 dny). V bilančním období bylo zaznamenáváno množství krmiv, množství zbytků (nedožerků), kvantitativně byly shromažďovány výkaly a odebíraly se vzorky pro analýzy. Při navažování krmných dávek byla pro všechny krmiva stanovena sušina. Krmiva, zbytky a výkaly byly zváženy s přesností 0,01 kg. Výkaly byly průběžně sbírány do uzavíratelných plastových vaků a jednou denně homogenizovány. Dále bylo odebráno a zamrazeno 1,0 % vzorku. Během pokusů byl dodržován pravidelný režim dne.

#### 4.2.2. Experimentální stáje

Bilanční pokusy probíhaly v akreditované stáji v Netlukách v majetku VÚŽV v.v.i., Praha – Uhřetěves. Koně byli po dobu pokusu ustájeni v individuálních boxech s volným přístupem k vodě prostřednictvím automatických napáječek.

### 4.2.3. Pokusná zvířata

Na začátku pokusů č. 1, 2, 3, 4 (viz. Harmonogram pokusů) bylo zařazeno vždy 8 dospělých koní (valaši a klisny) plemene Český teplokrevník o hmotnosti 500 - 585 kg. V případě pokusů č. 1 a č. 2 došlo během přípravného období ke snížení stavu pokusných zvířat na pět koní v pokusu. Příčinou byly provozně technické důvody. Věk koní byl v rozmezí 7 - 17 let. Před začátkem experimentu byla koním provedena korektura kopyt, odčervení a byla zaznamenána jejich živá hmotnost na začátku a na konci pokusu. Během bilančního pokusu vykonávali koně lehkou práci (krok, klus) po dobu jedné hodiny každý den.

### 4.2.4. Testovaná krmiva

Ve dvou bilančních pokusech byla sledována stravitelnost živin netradičních krmiv pro koně, a to kukuřičné siláže (KS) a travní siláže (TS). V dalších dvou bilancích byly zkoumány stravitelnosti živin tradičních krmiv, a to samotného lučního sena (LS) a lučního sena s ovsem (LSO). Krmiva KS, SO, LS byla vyrobena na farmě VÚŽV v.v.i., Praha - Uhřetěves. Travní siláž pocházela z rodinné farmy Ing. Václava Kubáta z Dobříčkova (okres Benešov, nadm.v. 470 m). Chemické složení jednotlivých krmných dávek je shrnuto v Tabulkách č. 5 a 6.

Harmonogram pokusů:

- pokus 1 (kukuřičná siláž)
- pokus 2 (luční seno s ovsem)
- pokus 3 (travní siláž)
- pokus 4 (luční seno)

#### 4.2.4.1. Pokus 1 (kukuřičná siláž)

Krmná dávka - 20 kg kukuřičné siláže /koně/den (Tabulka č. 5)

Přípravné období - 18 dní

Pokusné období - 6 dní (2 × 3 dny)

Rozdělení krmné dávky v průběhu dne:

	07:00	13:00	19:00
Kukuřičná siláž (kg)	7	5	8

#### 4.2.4.2. Pokus 2 (luční seno s ovsem)

Krmná dávka - 9 kg sena a 3 kg ovsa /koně/den (tabulka č. 5 a 6)

Přípravné období - 18 dní

Pokusné období - 6 dní (2 × 3 dny)

Rozdělení krmné dávky v průběhu dne:

	07:00	13:00	19:00
Oves (kg)	1	1	1
Luční seno (kg)	3	2	4

#### 4.2.4.3. Pokus 3 (travní siláž)

Krmná dávka - 22 kg travní siláže /koně/den (tabulka č. 5)

Přípravné období - 18 dní

Pokusné období - 6 dní (2 × 3 dny)

Rozdělení krmné dávky v průběhu dne:

	07:00	13:00	19:00
Travní siláž (kg)	8	5	9

#### 4.2.4.4. pokus 4 (luční seno)

Krmná dávka - 12 kg lučního sena /koně/den (tabulka č. 5)

Přípravné období - 18 dní

Pokusné období - 6 dní (2 × 3 dny)

Rozdělení krmné dávky v průběhu dne:

	07:00	13:00	19:00
Luční seno (kg)	4	2	6

### 4.3. Chemické analýzy

U vzorků krmiv, zbytků a výkalů byla stanovena předsušina, laboratorní sušina (suš.) a dále byl stanoven obsah popelovin (popel), dusíkatých látek (NL), tuku, hrubé vlákniny (vlák.), neutrálně detergentní vlákniny (NDV), acido detergentní vlákniny (ADV) a ligninu (ADL). U kukuřičné a travní siláže byly dále stanoveny hodnoty KVV a pH (Tabulka č. 5). Veškeré chemické analýzy (AOAC, 1990) byly provedeny a stanoveny v laboratořích VÚŽV v.v.i. Uhřetěves.

#### Předsušina

##### Analytický postup

Stanovení předsušiny krmiv a zbytků bylo provedeno v sušárnách po dobu 48 hodin při 50 °C. Ke stanovení předsušiny výkalů byla použita metoda lyofilizace na přístroji CHRIST ALPHA 2-4 LSC. Princip lyofilizace je založen na odstranění vody vakuovou sublimací ledu.

##### Výpočet

$$\text{předsušina} = [(m3 - m1) / (m2 - m1)] * 100$$

*m1 – hmotnost prázdného plata (g)*

*m2 – hmotnost plata s navázkou před vysušením, lyofilizací (g)*

*m3 – hmotnost plata s navázkou po vysušení, lyofilizaci v (g)*

- **Laboratorní sušina**

##### Analytický postup

Předsušené (48 hodin při 50 °C) nebo lyofilizované testované vzorky byly namlety na velikost částic 1 mm pomocí mlýnku CYCLOTEC 1093 Sample Mill a navažovány ve dvojím opakování (5 g; s přesností navážky 10<sup>-4</sup> g) do předem označených a po vysušení zvažovaných vysoušecích misek. Vysoušecí misky s navázkou byly sušeny po dobu 6 hodin při teplotě 103 ± 2 °C. Po

vysušení a vychladnutí misek v exsikátoru byla zjištěna jejich hmotnost.

### Výpočet

$$\text{sušina} = [(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] * 100$$

*m<sub>1</sub> – hmotnost prázdné misky po vysušení (g)*

*m<sub>2</sub> – hmotnost misky s navážkou před vysušením (g)*

*m<sub>3</sub> – hmotnost misky s navážkou po vysušení v (g)*

- **Popeloviny**

### Analytický postup

Namletý materiál byl navažován (5 g; s přesností navážky 10<sup>-4</sup> g) do vysušených zvážených keramických kelímků. Kelímky s materiálem byly spalovány po dobu 4,5 hodiny při teplotě 550 °C v muflové peci LAC. Po vyjmutí vzorků z pece a jejich vychladnutí v exsikátoru byly kelímky s popelem zváženy.

### Výpočet

$$\text{popeloviny} = [(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] * 100$$

*m<sub>1</sub> – hmotnost prázdné misky po vysušení (g)*

*m<sub>2</sub> – hmotnost misky s navážkou před vysušením v (g)*

*m<sub>3</sub> – hmotnost misky s navážkou po vysušení v (g)*

- **Dusíkaté látky (NL)**

Dusík (N) byl stanoven metodou dle Kjeldahla (metoda 976.05; AOAC, 1990) na přístroji FOSS Kjeltex (AUTO 1030 ANALYZER). Dusíkaté látky byly vypočteny jako N × 6,25. Předem byl stanoven obsah sušiny a popelovin.

### Analytický postup

Upravené vzorky byly naváženy v množství 1 g (s přesností navážky 10<sup>-4</sup> g) do mineralizačních tub, do kterých bylo přidáno 5 g katalyzátoru, 2 – 10 ml peroxidu vodíku (30 %), 25 – 30 ml kyseliny sírové a byly dány do mineralizačního zařízení, kde byly zahřívány min. 30 minut při 360 – 380 °C. Poté byly zchlazeny, doplněny destilovanou vodou do 100 ml a destilovány, přičemž amoniak byl jímán do předlohy (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) po dobu 5 minut. Titrace předlohy byla provedena do 30

minut po destilaci hydroxidem sodným.

### Výpočet

$$NL = [(V_o - V) * T / (W * \text{sušina})]$$

*V<sub>o</sub>* – přesné množství odměrného roztoku kyseliny sírové přidané do předlohy kyseliny sírové (ml)

*V* – přesné spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného (ml)

*T* – titr dusíku \* 100 (pro přesný 0,25 mol.l<sup>-1</sup> roztok = 0,35)

*W* – hmotnost navážky vzorku nebo její alikvotní část v případě, že pro destilace byl pipetován alikvotní podíl mineralizátu (g)

#### • **Tuk**

Stanovení obsahu tuku bylo provedeno na přístroji SOXTEC (SOXTEC SYSTEM HT 1043) dle Soxhleta (metoda 2003.05, AOAC, 1990).

### Analytický postup

Upravené vzorky byly naváženy v množství 3 g (s přesností navážky 10<sup>-4</sup> g) do extrakčních tub a dány do přístroje SOXTEC, kde probíhala extrakce tuku petroléterem do extrakčních baněk (70 minut); zbytky petroléteru z extrahovaného tuku byly odstraněny acetonem. Poté byly baňky vysušeny při 105 °C (min. 2 – 3 hodiny). Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byly baňky zváženy.

### Výpočet:

$$\text{tuk} = (m_3 - m_1) * 100 / (m_2 * \text{sušina})$$

*m<sub>1</sub>* – hmotnost extrakční baňky (g)

*m<sub>2</sub>* – navážka (g)

*m<sub>3</sub>* – hmotnost extrakční baňky s vyextrahovaným tukem

*sušina* – obsah sušiny původního vzorku/100

#### • **Vláknina**

Metoda spočívá ve dvoustupňové hydrolyze kyselinou a zásadou. Analýza byla prováděna na přístroji ANKOM<sup>220</sup> FIBER ANALYZER.

### Analytický postup

Upravené vzorky byly naváženy v množství 0,5 g (s přesností navážky  $10^{-4}$  g) do speciálních filtračních sáčků (F57 Filter bags). V první fázi probíhala kyselá hydrolýza v  $0,255 \pm 0,0005$  N roztoku kyseliny sírové (připraveném z 13,36 ml 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , doplněné do 2 l destilovanou vodou), po dobu 30 minut a teplotě 100 °C. Poté byly filtrační sáčky promývány horkou destilovanou vodou  $3 \times$  po dobu 5 minut.

V druhé fázi probíhala zásaditá hydrolýza v  $0,313 \pm 0,005$  N roztoku hydroxidu sodného (připraveném z 25,04 g 33 % NaOH, rozpuštěném ve 2 l destilované vody) po dobu 30 minut a teplotě 100 °C. Poté byly sáčky opět promyty horkou destilovanou vodou 3krát po dobu 5 minut. Po hydrolýze byly filtrační sáčky promývány v acetonu ( $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ) po dobu  $3 \times 3$  minuty, vysušeny při teplotě 105 °C po dobu 3 hodin a po zchladnutí v exsikátoru zváženy. Po zvážení byly filtrační sáčky umístěny do keramických kelímků a spáleny při teplotě 550 °C po dobu 4,5 hodiny. Po spálení a vychladnutí kelímků v exsikátoru byl zjištěn obsah popelovin.

### Výpočet:

$$\text{vláknina} = [((m_3 - m_1) - m_4) / (m_2 * \text{sušina})] * 100$$

$m_1$  – hmotnost sáčku (g)

$m_2$  – navážkou (g)

$m_3$  – hmotnost sáčku po hydrolýze a vysušení (g)

$m_4$  – hmotnost popelovin po extrakci (g)

sušina – obsah sušiny původního vzorku/100

#### • **Neutrálně detergetní vláknina (NDV)**

Tato metoda spočívá v hydrolýze rostlinného vzorku v neutrálním prostředí (pH 7) roztoku činidla laurylsulfátu sodného (Van Soest et al., 1991). Nezhydrolyzovanými zbytky zůstávají celulóza, hemicelulóza a lignin. Analýza byla prováděna na přístroji ANKOM<sup>220</sup> FIBER ANALYZER.

### Analytický postup

Upravené vzorky byly naváženy v množství 0,5 g (s přesností navážky  $10^{-4}$  g) do filtračních sáčků a byla provedena hydrolýza neutrálním roztokem (připraveným rozpuštěním za horka: laurylsulfátu sodného (60 g), EDTA (37,22 g), tetraboritanu sodného (13,62 g), hydrogenfosforečnanu sodného (23,14 g), etylenglykolu (10 ml) a doplněném do 2 l destilovanou

vodou) po dobu 60 minut při teplotě 100 °C. Ke každé hydrolýze byly přidány 4 ml roztoku Alpha Amylasy. Poté byly sáčky opět promyty horkou destilovanou vodou 3krát po dobu 5 minut (2 × s přidáním 4 ml Alpha Amylasy a 1 × s čistou destilovanou vodou).

Po hydrolýze byly filtrační sáčky promývány v acetonu ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) po dobu 3 x 3 minuty, vysušeny při teplotě 105 °C po dobu 3 hodin a po zchladnutí v exsikátoru zváženy. Po zvážení byly filtrační sáčky umístěny do keramických kelímků a spáleny při teplotě 550 °C po dobu 4,5 hodiny. Po spálení a vychladnutí kelímků v exsikátoru byl zjištěn obsah popelovin.

### Výpočet

$$\text{NDV} = [((m_3 - m_1) - m_4) / (m_2 * \text{sušina})] * 100$$

*m<sub>1</sub> – hmotnost sáčku (g)*

*m<sub>2</sub> – navážka (g)*

*m<sub>3</sub> – hmotnost sáčku po hydrolýze a vysušení (g)*

*m<sub>4</sub> – hmotnost popelovin po extrakci (g)*

*sušina – obsah sušiny původního vzorku/100*

- **Acido detergetní vlákna (ADV)**

Vzorek je v kyselém prostředí kyseliny sírové hydrolyzován činidlem cetyl-trimetylamonium bromid (metoda 973.18; AOAC, 1990), kdy zbytkem po kyselé hydrolýze je ligninocelulózový komplex. Analýza byla prováděna na přístroji ANKOM<sup>220</sup> FIBER ANALYZER.

### Analytický postu

Upravené vzorky byly naváženy v množství 0,5 g (s přesností navážky 10<sup>-4</sup> g) do filtračních sáčků a byla provedena hydrolýza kyselým roztokem (přípraveném z 54 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doplněném do 2 l destilovanou vodou) s přidáním detergentním činidlem cetyl-trimetylamonium bromid (40 g rozpuštěným za horka), po dobu 60 minut při teplotě 100 °C. Poté byly sáčky promyty horkou destilovanou vodou 3krát po dobu 5 minut.

Po hydrolýze byly filtrační sáčky promývány v acetonu ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) po dobu 3 × 3 minuty, vysušeny při teplotě 105 °C po dobu 3 hodin a po zchladnutí v exsikátoru zváženy. Po zvážení byly filtrační sáčky umístěny do keramických kelímků a spáleny při teplotě 550°C po dobu 4,5 hodiny. Po spálení a vychladnutí kelímků v exsikátoru byl zjištěn obsah popelovin.



## Výpočet

$$ADV = [((m_3 - m_1) - m_4) / (m_2 * \text{sušina})] * 100$$

$m_1$  – hmotnost sáčku (g)

$m_2$  – navážka (g)

$m_3$  – hmotnost sáčku po hydrolyze a vysušení (g)

$m_4$  – hmotnost popelovin po extrakci (g)

sušina – obsah sušiny původního vzorku/100

- **Acido detergentní lignin (ADL)**

Lignin se stanovuje jako zbytek z ligninocelulózového komplexu po oxidaci kyselinou sírovou za studena. Takto stanovený lignin označujeme jako *S-lignin* (metoda 973.18; AOAC, 1990).

### Analytický postup

Upravené vzorky byly naváženy v množství 0,5 g (s přesností navážky  $10^{-4}$  g) do filtračních sáčků a byla provedena hydrolyza kyselým roztokem (připraveném z 54 ml  $H_2SO_4$  doplněném do 2 l destilovanou vodou). Dále byly po kyselé hydrolyze a usušení (3 hodiny při teplotě 105 °C) dány do 72% roztoku kyseliny sírové a při pokojové teplotě 20 °C extrahovány po dobu 3 hodin, přičemž na počátku extrakce a potom v intervalu 30 minut s nimi bylo min. 30 krát zamícháno. Po extrakci byly sáčky propláchnuty horkou destilovanou vodou do hodnoty min. pH 5,5 a vysušeny při teplotě 105 °C po dobu 3 hodin a po zchladnutí v exsikátoru zváženy. Po zvážení byly filtrační sáčky umístěny do keramických kelímků a spáleny při teplotě 550 °C po dobu 4,5 hodiny. Po spálení a vychladnutí kelímků v exsikátoru byl zjištěn obsah popelovin.

## Výpočet

$$ADL = [((m_3 - m_1) - m_4) / (m_2 * \text{sušina})] * 100$$

$m_1$  – hmotnost sáčku (g)

$m_2$  – navážka (g)

$m_3$  – hmotnost sáčku po hydrolyze a vysušení (g)

$m_4$  – hmotnost popelovin po extrakci (g)

sušina – obsah sušiny původního vzorku/100

- **Stanovení kyselého vodního výluhu (KVV) siláží a pH**

KVV je stanoveno jako množství spotřebovaného 0,1 N KOH při titraci vodného výluhu siláže do pH 8,5.

Analytický postup

K 100 g vzorku čerstvé siláže byly přidány 2 ml toluenu a poté byl vzorek doplněn do 1 L destilovanou vodou; vzorky byly louhovány při laboratorní teplotě po dobu 20 hodin. Po extrakci byly vzorky zfiltrány přes kvalitativní filtry. Hodnoty pH filtrátu byly stanoveny na pH metru (VTV Inolab Level 1). Z filtrátu bylo odebráno 50 ml výluhu a titrováno 0,1 N KOH do pH 8,5. Z množství spotřebovaného KOH a jeho molekulové hmotnosti byla stanovena hodnota kyselého výluhu siláže.

#### **4.4. *In vitro* stanovení stravitelnosti krmiv**

Stravitelnost vybraných vzorků krmiv byla stanovena *in vitro* pomocí přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator (Ankom Technology Corp.). Jako zdroje očkovací látky pro přípravu inokula byly využity koňské výkaly (Lattimer, 2007; Earing et al., 2010). Byla stanovena stravitelnost sušiny, organické hmoty, vlákniny, neutrálně detergentní vlákniny a acido detergentní vlákniny.

##### **4.4.1. Vzorky krmiv**

Do pokusů *in vitro* byly zařazeny krmné dávky z *in vivo* pokusů. Vzorky krmiv byly namleté pomocí mlýnku (CYCLOTEC 1093 Sample Mill) na velikost částic 1 mm (Holden, 1999; King a Plaizier, 2006; Brons a Plaizier, 2005).

##### **4.4.2. Příprava vzorků**

Filtrační sáčky Ankom Technology (F57) byly nejprve proprány v acetonu (3 – 5 minut) a poté řádně vysušeny. Před navažováním bylo nutné sáčky označit (pouze obyčejnou tužkou), dále byl každý sáček zvážen a hmotnost zaznamenána ( $w_1$ ). Přímo do filtračních sáčků bylo naváženo 0,25 g vzorku ( $w_2$ ) (poznámka: současné studie prokázaly větší přesnost při použití vzorku o hmotnosti 0,25 g než 0,5 g; Lattimer, 2007). Každý sáček byl zataven pomocí tepelné pulsní svářečky a umístěn do digesční nádoby přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator. Byly využity dvě digesční nádoby. Do každé bylo umístěno 2 × 17 sáčků. Od každého krmiva (4 druhy krmiv) byly naváženy 4 sáčky, tzn. 16 sáčků + 1 sáček prázdný pro korekci.

#### 4.4.3. Příprava pufrů

Na každou láhev bylo použito 1500 ml roztoku A a 300 ml roztoku B. Konečné pH roztoku bylo upravováno na pH metru (VTV Inolab Level 1) na hodnotu 7 doplňováním roztoku B do roztoku A (Earing et al., 2010).

Pufr - roztok A:	g/l	Pufr - roztok B:	g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
NaCl	0,5		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1		
Močovina	0,5		

#### 4.4.4. Příprava očkovací látky a inkubace

Veškerý materiál, použitý k přípravě očkovací látky, byl udržován při teplotě 39 °C, včetně 17 filtračních sáčků. Připravené pufrы byly ohřívány na 39 °C v digesčních nádobách. Výkaly byly odebrány od klisny, která byla zařazena do *in vivo* pokusů. V době odběru se krmná dávka pro tuto klisnu skládala ze sena a ovsa. Odebrané výkaly z rekta klisny byly ihned umístěny do termosky. K přípravě inokula bylo použito 40 g výkalů (Lattimer, 2007) a 200 g výkalů (Earing et al, 2010). Vzorky byly umístěny do míchadla se 400 ml předehřátého pufrovacího roztoku a za stálého sycení  $\text{CO}_2$  se látky při vysokých otáčkách smíchaly (cca 30 s). Následně došlo k přefiltrování inokula přes dvě vrstvy filtrační tkaniny (Hayes et al., 2003). Roztok byl přelit do digesční nádoby. Nádoba byla před uzavřením vymyta po dobu 30 sekund  $\text{CO}_2$ . Postup se opakoval pro všechny digesční nádoby.

V obou případech následovala inkubace po dobu 72 hodin (Earing et al., 2010) za konstantní teploty 39 °C a za stálého míchání (otáčení).

Po dokončení inkubace byly nádoby vyjmuty, tekutina odčerpána a sáčky vypláchnuty proudem studené vody, dokud nebyla voda čirá. Během proplachování bylo použito minimálního mechanického míchání.

Vymyté sáčky se umístily do přístroje Ankom<sup>220</sup> Fiber Analyzer ke stanovení vlákniny, NDV a ADV po inkubaci.

Část sáčků byla usušena při 105 °C a následně spálena pro stanovení stravitelnosti sušiny a organické hmoty.

#### 4.4.5. Výpočty byly provedeny dle metodik firmy ANKOM (2005)

##### *Stravitelnost frakcí vlákniny*

$$\% \text{ IVTD}_{\text{v sušině}} = \frac{100 - ((W_3 - (W_1 * C_1)) * 100}{W_2 * DM}$$

Kde:

$W_1$  – hmotnost sáčku

$W_2$  – hmotnost vzorku

$W_3$  – konečná hmotnost sáčku po stanovení *in vitro* a následně CF (NDF, ADF)

$C_1$  – korekce na hmotnost prázdného sáčku (konečná hmotnost vysušeného sáčku/původní hmotnost prázdného sáčku)

DM – % sušiny

$\text{IVTD}_{\text{v sušině}}$  – *in vitro* skutečná stravitelnost v sušině krmiva

##### *Stravitelnost sušiny*

$$\text{DMR} = m_3 - m_1 * c_1$$

$$\text{DMD} = 100 - \frac{100 * \text{DMR}}{m_2 * \text{DM}}$$

##### *Stravitelnost organické hmoty*

$$\text{AR} = m_4 - m_1 * c_2$$

$$\text{OMD} = 100 - \frac{100 * (\text{DMR} - \text{AR})}{m_2 * \text{DM} * \text{OM}}$$

Kde:

DMR	hmotnost vzorku po inkubaci a vysušení (bez sáčku) (g)
DMD	stravitelnost sušiny (%)
AR	hmotnost vzorku po inkubaci, vysušení a spálení (bez sáčku) (g)
OMD	stravitelnost organické hmoty (%)
DM	obsah sušiny ve vzorku (% / 100)
OM	obsah organické hmoty v sušině vzorku (% / 100)
m <sub>1</sub>	hmotnost prázdného sáčku (g)
m <sub>2</sub>	navážka vzorku (g)
m <sub>3</sub>	hmotnost sáčku se vzorkem po inkubaci a vysušení (g)
m <sub>4</sub>	hmotnost sáčku se vzorkem po inkubaci a spálení (g)
c <sub>1</sub>	korekce-sušina (hmotnost sáčku po inkubaci/hmotnost prázdného sáčku)
c <sub>2</sub>	korekce-popel (hmotnost sáčku po mineralizaci/hmotnost prázdného sáčku)

#### 4.5. Statistické analýzy

Výsledky byly vyhodnoceny metodou GLM programu SAS. Jako pevné vlivy byly použity krmivo a bilanční perioda. Koně byli do modelu vloženi jako vliv náhodný. Pokud byly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ), byl použit Scheffeho test pro porovnání průměrů mezi testovanými skupinami. Normalita hodnot byla zkontrolována Shapiro-Wilkovým testem (SAS Institute, 2000). Výsledky v tabulkách byly prezentovány jako průměry hodnot a střední chyby (se).

Pomocí MIXED procedury programu SAS byly posouzeny rozdíly ve stravitelnostech sledovaných krmiv stanovených metodou *in vivo* a výše uvedenými *in vitro* metodami. Porovnáním byly zjištěny rozdíly mezi krmivy, metodami a interakcemi mezi krmivy a metodami.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1. Stanovení stravitelnosti živin na základě metody *in vivo* u tradičních a netradičních krmiv pro koně

Výsledky *in vivo* stravitelnosti živin jednotlivých krmiv jsou přehledně znázorněny v Tabulce č. 8). *In vivo* stravitelnost sušiny a organické hmoty byla nejvyšší pro siláže a nejnižší pro KD, obsahující seno ( $p < 0,05$ ). Lowman et al. (1999) zjistili výrazně nižší stravitelnost sušiny TS 54,1 %, než je tomu v této studii, což může být způsobeno vyšší sušinou TS (68,1 % vs. 51,2 %). Podobných výsledků dosáhl také Bergero et al. (2002), u nichž byla stanovena stravitelnost sušiny TS 57,7 %. Ragnarsson a Lindberg (2008) testovali podle chemického složení velmi podobnou TS a stravitelnost sušiny (62,6 %), SE (63,3 %) a OH (64,7 %) dosahovala podobných hodnot, jako zjištěných v této práci. Peiretti et al. (2006) zjistili rozdíl mezi stravitelností sušiny u sena s jádrem (75 : 25) a samotným senem ve výši 1,1 %, ve prospěch sena s jádrem. V našem případě byla také zjištěna vyšší stravitelnost sušiny u LSO oproti LS, a to ve výši 0,66 %. Studie Earing et al. (2010) shledává výrazně vyšší stravitelnost sušiny u sena s ovsem (55,1 %), v porovnání se senem samotným (46,3 %). Hodnota stravitelnosti sušiny LS byla srovnatelná s výsledky této studie. Vyšší stravitelnost u sena s ovsem, ve studii Earing et al. (2010) v porovnání s našimi výsledky, může být způsobena vyšším obsahem jádra v KD (70 : 30). Stravitelnost dusíkatých látek byla průkazně vyšší u TS oproti LSO a LS ( $p < 0,05$ ). Kukuřičná siláž měla vyšší stravitelnost NL v porovnání s LS. V souladu s těmito zjištěními, také Peiretti et al. (2006) uvedli stravitelnost NL ve výši 55,3 % pro KD, obsahující seno a jádro. V porovnání s Bergero et al. (2002) jsme zjistili vyšší hodnoty stravitelnosti NL u TS (57,3 vs. 63,6 %). Nejvyšší hodnota stravitelnosti vlákniny byla zjištěna u TS (59,37 %), dále pro LSO a LS a nejnižší u KS (36,88 %). Také stravitelnost NDF byla nejvyšší u TS oproti ostatním krmivům. Stravitelnost NDV sena podle Crozier et al. (1997) dosahovala podobných hodnot (44 % vs. 46,3 %). Bylo obtížné vyhledat další studie, v kterých by byla stanovena *in vivo* stravitelnost živin KS. Jedním z důvodů je netradičnost KS jako krmiva pro koně. Výjimkou byla studie Gálik et al. (2013), který stanovil stravitelnost vlákn. u KS na 42,4 % a NDV 46,4 %, což jsou hodnoty nepatrně vyšší. Hodnoty SE byly vyšší u KS a TS v porovnání s LSO a LS. V porovnání s našimi zjištěními stanovili Peiretti et al. (2006) vyšší SE, jak u sena s jádrem (54,2 %), tak u sena samotného (54,5 %).

## 5.2. Hodnocení stravitelností krmiv – bilanční stravitelnost

Pokusné období a s ním související sběr dat trval 6 dní. Toto období bylo rozloženo na 2 x 3 dny. Z výsledků vyplývá (Tabulka č. 9), že při porovnání všech pokusných KD, předložených koním, lze pozorovat statisticky významné rozdíly mezi pokusnými periodami. Stanovení příjmu krmiva a celodenní sběr výkalů je metoda, pomocí které je stanovena celková stravitelnost krmiv, podávaných koním (Schurg, 1981; Bergero et al., 2002). Tato metoda je časově náročná, pracná a tím i omezuje počet zvířat, která mohou být využita v pokusu (Schurg, 1981). Dále jsou zvířata uzavřena v metabolických klecích nebo v boxech. Nevýhodou dlouhodobého ustájení koní v boxech může být negativní vliv této restriktce na metabolismus, což bylo potvrzeno u ovcí (Bowers et al., 1993); další metabolické poruchy mohou nastat při dlouhodobějším zkrmování vysokoenergetických KD (Frape et al., 1982). Dlouhodobé porušování životní pohody zvířat (welfare) tedy negativně ovlivňuje výsledky pokusů (Schurg, 1981), což byl důvod pro hledání optimální délky přípravného a pokusného období. Martin-Rosset et al. (1984) doporučují 6-denní pokusné období, jemuž předchází 14-denní adaptace, zatímco Kentucky Equine Research Center (USA) doporučují 3-týdenní přípravné období, následované 5-denním pokusným obdobím se sběrem dat (Pagan, 1998). Hintz a Loy (1966) nezjistili rozdíly v koeficientech stravitelnosti sušiny a dusíkatých látek, i když zkrátily pokusné období ze 7 na 3 dny. Také Gouachet et al. (2009) stanovili obdobné stravitelnosti sušiny, organické hmoty a frakcí vlákniny, přestože pokusné období trvalo 3 dny. Nicméně rozdíly v koeficientech stravitelnosti tuku v pokuse Hintz a Loy (1966) přestaly být signifikantní až po 4 dnech sbírání dat. Výše popisované zkracování periody sběru výkalů kontrastuje s experimentem Araújo et al. (2000), kteří, na základě 2 - 7 denního sběru dat, doporučují 5-denní pokusné období, zvláště pokud KD obsahují výhradně objem, a/nebo se krmí objem společně s jádrem. Příklady studií, využívajících bilanční metodu stanovení stravitelnosti krmiv, jsou přehledně shrnuty v Tabulce č. 7.

## 5.3. Hodnocení stravitelností krmiv – *in vitro* metody

*In vitro* stravitelnosti sušiny, zjištěné Earingem et al. (2010) pro krmiva LS a LSO (42,9 %) a (52,7 %), byly v obou případech nižší než v této studii (Tabulka č. 10). Jedním z důvodů může být rozdílná velikost částic a navážka namletých vzorků krmiv. V případě Earing et al. (2010) byla velikost částic 2 mm a navážka 0,5 g; kdežto v této studii bylo použito velikosti částic 1 mm (Holden, 1999; King a Plaizier, 2006; Brons a Plaizier, 2005) a navážka činila 0,25 g (Lattimer et al., 2007). Pokud se týká *in vitro* stravitelnosti, NDV u LS a LSO byla opět vyšší, než stanovili

Earing et al. (2010), a to 30 % a 28,1 %. Pro siláže dosud nejsou známé podobné studie.

Na přípravu inokula bylo použito 40 g výkalů (Lattimer et al., 2007) a 200 g výkalů (Earing et al., 2010). Byly zjištěny statistické významné rozdíly ( $p < 0,001$ ) mezi metodami, a to pro všechny zjišťované parametry (Tabulka č. 11). Na základě dosavadních studií nebylo dosud stanoveno přesné ani přibližné množství výkalů, které by mělo být používáno. Rozsáhlejší studii na množství výkalů provedl Denek et al. (2008), ovšem pro *in vitro* pepsin-HCl metodu. Testováno bylo 9 různých navážek v rozmezí 100 g - 1000 g. Autoři, na základě výsledků, doporučují pro predikci *in vivo* stravitelnosti sušiny objemných krmiv 250 g výkalů a dobu inkubace 48 hodin nebo 660 g výkalů a dobu inkubace 72 hodin.

#### **5.4. Porovnání *in vivo* stravitelnosti a *in vitro* stravitelnosti vybraných živin.**

Průměrné hodnoty stravitelností jednotlivých živin u sledovaných krmiv pro jednotlivé metody, včetně zobrazení statistické průkaznosti, jsou uvedeny v Tabulce č. 12. Nejvyšší hodnoty stravitelnosti u všech živin byly stanoveny metodou *IVT* 200. Naopak nejnižší hodnoty stravitelnosti sušiny (suš.), OH a vlákniny (vlák.) byly zjištěny metodou *in vivo*. Stravitelnosti suš., OH a vlák., stanovené metodou *IVT* 40, byly průkazně vyšší oproti metodě *in vivo* a nižší oproti metodě *IVT* 200. Hodnoty stravitelnosti NDV byly srovnatelné mezi *in vivo* a *IVT* 40. Hodnoty stravitelnosti suš. a OH, stanovené metodami *in vitro*, byly vyšší ve srovnání s *in vivo* metodou u téměř všech krmiv (KS, LS, LSO). Výjimku tvořila travní siláž, kde byly hodnoty ze všech metod srovnatelné. U hodnot stravitelnosti vlákniny byly průkazně nižší hodnoty zjištěné metodou *in vivo*, oproti *in vitro* stanovením u LSO a LS naopak výše stravitelnosti vlák., stanovená metodou *IVT* 40, byla plně srovnatelná s hodnotami, stanovenými metodou *in vivo* u KS a TS.

Porovnání rozdílů ve stravitelnosti krmiv, stanovených různými metodami, je přehledně znázorněno v Tabulce č. 13. Hodnoty stravitelnosti NDV, stanovené metodou *IVT* 40, odpovídaly *in vivo* stanovení u KS, LS. U travní siláže nebyl zjištěn rozdíl mezi *IVT* 200 a *in vivo* metodami. Pro krmnou dávku, obsahující seno a oves, bylo *in vitro* metodami dosaženo průkazně vyšších hodnot stravitelnosti NDV, oproti *in vivo* pokusu (15,75 - 19,36 %). Boisen a Fernandez (1991) a Daniel et al. (1997) ve svých studiích konstatují, že pro *in vitro* metody je typické, že vytváří ideální podmínky pro fermentaci, a tudíž jsou určeny k měření maximální stravitelnosti. Očekává se, že hodnoty *in vitro* stravitelnosti budou dosahovat vyšších hodnot než hodnoty *in vivo* stravitelnosti.

Vzhledem k doporučení některých autorů na zkrácení pokusného období při *in vivo* metodě, bylo provedeno porovnání výsledků *in vitro* analýz s první periodou (3 dny) *in vivo* stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 14 a 15. Jak již bylo uvedeno výše, hodnoty *in vivo*



stravitelnosti živin u sledovaných krmiv, zjištěných v první periodě, byly průkazně vyšší oproti periodě druhé.

Tabulka č. 14 znázorňuje porovnání výsledků s první periody *in vivo* metody s metodami *in vitro*. Zvýšení hodnot stravitelnosti živin u metody *in vivo* nevedlo k dostatečnému navýšení hodnot do takové výše, aby byly průkazně srovnatelné s výsledky *in vitro* metod. Hodnoty stravitelnosti živin, zjištěné v první periodě *in vivo* metody, byly také porovnány s *in vitro* výsledky pro jednotlivá krmiva (Tabulka č. 15). Také u jednotlivých krmiv došlo k navýšení hodnot stravitelnosti u všech živin, ale statistické rozdíly mezi *in vivo* a *in vitro* metodami zůstaly převážně nezměněny.

## 6 ZÁVĚR

Cílem pokusu bylo ověřit hypotézu, že Daisy<sup>II</sup> Incubator je vhodným *in vitro* systémem pro stanovení stravitelnosti krmiv pro koně. Ověřování bylo provedeno způsobem srovnání hodnot získaných z pokusů *in vivo* vs. hodnot, stanovených *in vitro* v Daisy<sup>II</sup> Incubator. Zkoumanými krmivy a krmnými dávkami byly netradiční krmiva pro koně, kukuřičná siláž a travní siláž, a jako tradiční krmiva byly zařazeny luční seno a luční seno s ovsem. Hodnocenými živinami byly sušina, org. hmota, NDV a vláknina. V první fázi byly provedeny *in vivo* bilanční pokusy. Následovala druhá fáze, a to metoda *in vitro* s použitím přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator.

Výsledky z *in vivo* pokusů se shodovaly s výsledky autorů, zabývajících se podobnými krmivy a krmnými dávkami. Pouze u kukuřičné siláže není možnost úplného srovnání. Důvodem je netradičnost používání kukuřičné siláže u koní. Autoři se však stále více zaměřují na netradiční krmiva, která se v posledních letech využívají. To je příslib toho, že vznikne více studií, zařazujících kukuřičnou siláž.

Dalším zjištěním z *in vivo* pokusů byl statisticky průkazný rozdíl mezi stravitelností živin v prvních třech dnech bilance vs. závěrečné tři dny bilance. Přesto, že je metoda *in vivo* propracovanější, není stále zcela zřejmé, kolik dní pokusného období použít tak, aby výsledky byly ustálené. To potvrzuje i četnost a rozdílnost volby délky pokusného období u dalších autorů.

Téměř ve všech případech hodnoty *in vitro* převyšovaly statisticky průkazně hodnoty stanovené v pokusech *in vivo*. Hodnoty stravitelností sušiny a org. Hmoty, stanovené metodami *in vitro*, byly vyšší ve srovnání s *in vivo* metodou u téměř všech krmiv (KS, LS, LSO). Stravitelnosti sušiny, org. hmoty a vlákniny, stanovené metodou *in vitro* s množstvím výkalů 40 g, byly průkazně vyšší oproti metodě *in vivo* a nižší oproti metodě *in vitro*, kdy bylo použito 200 g výkalů. Hodnoty stravitelností NDV byly srovnatelné mezi *in vivo* a *in vitro* metodami se 40 g výkalů. Výjimku tvořila travní siláž, kde byly hodnoty ze všech metod srovnatelné.

Z těchto výsledků vyplývá, že koňské výkaly jsou vhodným zdrojem očkovací látky pro přípravu inokula k inkubaci vzorků krmiv v přístroji Daisy<sup>II</sup> Incubator.

Z výsledků dále vyplývá jako perspektivnější použití 40 g koňských výkalů k přípravě inokula.

Vzhledem k tomu, že u obou *in vitro* metod (40 g a 200 g výkalů) byl nastaven čas inkubace na 72 hodin, je možné usuzovat na jeho zkrácení s ohledem na průměrnou dobu pasáže jednotlivých krmiv v trávicím traktu koně.

Dosažené *in vitro* stravitelnosti mohly být ovlivněny velikostí namletých částic krmiv na 1 mm. V některých studiích je využíváno velikosti 2 mm. Dalším vlivem mohla být navážka vzorku 0,25 g. V některých studiích je použito množství 0,50 g.

Výše uvedená zjištění naznačují, že Daisy<sup>II</sup> Incubator je možné využívat s použitím výkalů koní za účelem stanovení stravitelnosti krmiv u vybraných živin. Je však zásadní více zpřesnit *in vitro* metodiku a vyzkoušet její nové modifikace (zejména jemnost mletí vzorků, množství použitého inokula a délku inkubace), jelikož ani autoři, celosvětově pojednávající o tomto tématu, nejsou v těchto otázkách jednotní.

## 7a SOUHRN

Tato práce byla rozdělena na tři fáze. V první fázi bylo úkolem stanovení stravitelnosti krmiv pomocí metody *in vivo* bilanční pokusy. Ve fázi druhé byla stejná krmiva použita pro metodu *in vitro* s použitím přístroje Daisy<sup>II</sup> Incubator. Posledním úkolem bylo statistické vyhodnocení výsledků obou metod a jejich porovnání.

V pokusech byla sledována stravitelnost živin netradičních krmiv pro koně, a to kukuřičné siláže (KS) a travní siláže (TS). Dále byly zkoumány stravitelnosti živin tradičních krmiv, a to samotného lučního sena (LS) a lučního sena s ovsem (SO).

Hodnocenými živinami byly sušina, org. hmota, NDV a vláknina.

### ***In vivo* stanovení stravitelnosti krmiv – bilanční pokusy**

Pokusy byly provedeny klasickou bilanční metodou. Každý pokus byl rozdělen na přípravné (18 dní) a pokusné období (6 dní). V bilančním období bylo zaznamenáváno množství krmiv, množství zbytků, kvantitativně byly shromažďovány výkaly a odebíraly se vzorky pro analýzy.

*In vivo* stravitelnost sušiny a organické hmoty byla nejvyšší pro siláže a nejnižší pro KD, obsahující seno ( $p < 0,05$ ). V našem případě byla také zjištěna vyšší stravitelnost sušiny u LSO oproti LS, a to ve výši 0,66 %. Kukuřičná siláž (59,26 %) měla nižší stravitelnost NL v porovnání s LS (63,56 %). Nejvyšší hodnota stravitelnosti vlákniny byla zjištěna u TS (59,37 %), dále pro LSO a LS a nejnižší u KS (36,88 %). Také stravitelnost NDV byla nejvyšší u TS (59,02 %), oproti ostatním krmivům. Hodnoty SE byly vyšší u KS (64,88 %) a TS (63,92 %), v porovnání s LSO (48,16 %) a LS (46,84 %).

Výsledky z *in vivo* pokusů se shodovaly s výsledky autorů, zabývajících se podobnými krmivy a krmnými dávkami. Pouze u kukuřičné siláže není možnost úplného srovnání. Důvodem je netradičnost používání kukuřičné siláže u koní.

### ***In vitro* stanovení stravitelnosti krmiv – přístroj Daisy<sup>II</sup> Incubator**

Ke stanovení stravitelnosti *in vitro* byly použity vzorky krmiv z *in vivo* pokusů, namleté na velikost 1 mm. Do filtračních sáčků bylo naváženo 0,25 g vzorku. Byly využity dvě digesční nádoby. Do každé bylo umístěno 2 × 17 sáčků. Od každého krmiva (4 druhy krmiv) byly naváženy 4 sáčky, tzn. 16 sáčků + 1 sáček prázdný pro korekci. Očkovací látka byla připravena ze 40 g a 200 g výkalů. V obou případech následovala inkubace po dobu 72 hodin.

Byly zjištěny statistické významné rozdíly ( $p < 0,001$ ) mezi metodami, a to pro všechny zjišťované parametry.

### **Porovnání *in vivo* stravitelnosti a *in vitro* stravitelnosti vybraných živin**

Statistická analýza byla provedena pomocí GLM procedury (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Druh testovaného krmiva, opakování bilance a pokusné zvíře byly do statistického modelu vloženy jako pevné efekty. Dále bylo provedeno porovnání výsledků mezi *in vitro* a *in vivo* hodnotami stravitelnosti sledovaných krmiv, kde byly v modelu sledovány metody a jejich interakce s krmivy.

Hodnoty stravitelností sušiny a org. hmoty, stanovené metodami *in vitro*, byly vyšší ve srovnání s *in vivo* metodou u téměř všech krmiv (KS, LS, LSO). Stravitelnosti sušiny, org. hmoty a vlákniny, stanovené metodou *in vitro* s množstvím výkalů 40 g, byly průkazně vyšší oproti metodě *in vivo* a nižší oproti metodě *in vitro*, kdy bylo použito 200 g výkalů. Hodnoty stravitelností NDV byly srovnatelné mezi *in vivo* a *in vitro* metodou se 40 g výkalů. Výjimku tvořila travní siláž, kde byly hodnoty ze všech metod srovnatelné.

## 7b SUMMARY

This work was divided into three phases. In the first phase, the task was to determine the digestibility of feed using the *in vivo* method by total collection of faeces. In the second stage, the same feed was used for the *in vitro* method using the DaisyII Incubator. The values of the nutrient digestibility were compared and statistically analysed. The experiment observed the nutrient digestibility of unusual feeds for horses: the corn silage (KS) and the grass silage (TS). Item, the digestibility of nutrients was studied at the traditional feeds, the meadow hay (LS) and the meadow hay with oats (LSO). The evaluated nutrients were dry matter, org. matter, NDF and crude fiber.

### **Determination of *in vivo* digestibility - total faecal collection**

Experiments were performed by method of total collection of faeces. Each experiment was divided to the acclimation phase (18 days) and the collection phase (6 days). During the collection phase, samples of feed, feces and refusals were taken and stored for proximate analysis.

*In vivo* digestibility of dry matter and organic matter was highest for the silages and lowest for diets containing hay ( $p < 0.05$ ). In our case, the higher dry matter digestibility of the LSO than the LS was found, amounting to 0.66 %. The corn silage (59.26 %) had a lower digestibility of NL, compared with the LS (63.56 %). The highest value of crude fiber digestibility was found in the TS (59.37 %), followed by the LSO and the LS and the lowest in the KS (36.88 %), also the NDF digestibility was highest in the TS (59.02 %), compared with the other feeds. Values of SE are higher for the KS (64.88 %) and the TS (63.92 %) compared to the LSO (48.16 %) and the LS (46.84 %).

Results of *in vivo* experiments agreed with authors, dealing with very similar feed and feed rations. Only for corn silage is not possibility of a full comparison. The reason is the unconventional use of the corn silage in horses.

### **Determination of *in vitro* digestibility - Daisy II Incubator**

To determine the *in vitro* digestibility, samples of feed from the *in vivo* experiments milled to a size of 1 mm. The 0.25 g of sample was weighed into the filter bag. They were used in two digestion vessels. It was placed into each of  $2 \times 17$  bags. Since each feed (4 types of feed) were weighed, ie. 16 + 1 blank bag for correction. The inoculum was prepared from 40 g to 200 g feces. In both cases, the incubation for 72 hours was followed. There were statistically significant differences ( $p < 0.001$ ) between the methods and for all surveyed parameters.

### **Comparison of in vivo and in vitro digestibility of selected nutrients**

Statistical analysis was performed using the GLM procedure (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Kind of test feed, repetition and balance test animal were inserted into the statistical model as fixed effects. Furthermore, comparison was made between the results of in vitro and in vivo values. The values of dry matter and organic matter digestibility, determined by in vitro methods, were higher, compared to the in vivo method for almost all feed (KS, LS, LSO). The digestibility of dry matter, organic matter and crude fiber, determined by the method in vitro with 40 g feces, was significantly higher compared to the in vivo method, and lower than an in vitro method, which was used 200 g feces. The NDF digestibility values were comparable between the in vivo and in vitro with 40 g of feces. The only exception was grass silage, where the value of all the methods are comparable.

## 8 SEZNAM LITERATURY

Akhter, S., Owen E., Theodorou M. K., Butler E. A., Minson D. J., 1999: Bovine faeces as source of microorganisms for the in vitro digestibility assay of forages. *Grass Forage Sci.* 54:219–226.

Alexander, F. and J. C. D. Hickson., 1969: The salivary and pancreatic secretions of the horse. In *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, Proceedings of the Third International Symposium*. Oriel Press, Cambridge, England.

Andrews F.M., 2008: Pathology of metabolic-related conditions. In: *Proc. Kentucky Equine Research Nutr. Conf.* 95-108.

AOAC. 1990: *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Washington, USA.

Argenzio R. A., 1990: Physiology of Digestive, Secretary, and Absorptive Processes. Page 434 In *The Equine acute abdomen*. N. A. White, ed. Lea & Febiger, Malvern, PA.

Argenzio R. A., 1993: Geneal function of the gastrointestinal tract and their control and integration. In M.J. Swenson, and Reece, W.O. (Ed.), *Dukes Physiology of Domesticated Animals* (11th ed., pp. 325 - 335). Ithaca: Comstock Publishing.

Araújo K.V., Lima J. A. de F., Fialho, E. T., Miyagi, E. S., 2000: Comparison among the internal markers and the total collection method in the determination of the forage nutrients digestibilities in equine. *Rev Bras Zootec.*, 29: 745–751.

Bergero D., Miraglia N., Abba C., Polidori M., 2004: Apparent digestibility of Mediterranean forages determined by total collection of faeces and acid-insoluble ash as internal marker. *Livest. Prod. Sci.*, 85: 235–238.

Bergero D., Préfontaine C., Miraglia N., Peiretti P.G., 2009: A comparison between the 2N and 4N HCL acid-insoluble ash methods for digestibility trials in horses. *Animal*, 3: 1728-1732.



Boisen, S. and J. A. Fernandez, 1991: In vitro digestibility of energy and amino acids in pig feeds. Page 231 In Digestive Physiology in Pigs. Proceedings of the Vth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. M. W. A. Verstegen, J. Huisman and L. A. Hartog, eds. European Federation of Animal Science, Wageningen, Netherlands.

Bowers C. L., Friend T. H., Grisson K. K., Lay D. C., 1993: Confinement of lambs (*Ovis aries*) in metabolism stalls increased adrenal function, thyroxine and motivation for movement. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 36 (2-3): 149-158.

Broderick G.A., Cochran R.C., 2000: In vitro and in situ methods for estimation digestibility with reference to protein degradability. In Theodorou, M. K., France, J. Feeding systems and feed evaluation models. 1. vyd. New York : CABI Publishing, 53-85.

Brons, E., and J. C. Plazier. 2005. Comparison of methods for in vitro dry matter digestibility of ruminant feeds. *Can. J. Anim. Sci.* 85:243–245.

Bryden W. L., 1995: Nutrition of performance horses. Paper presented at the Proceedings of Equine Nutrition and Pastures for Horses Workshop, Richmond NSW, Australia.

Budiansky S., 1997: *The Nature of Horses - Their Evolution, Intelligence and Behaviour*. London: Phoenix Illustrated Orion Publishing Group. ISBN: 0-684-82768-9.

Budras K. D., Rock S. and Sack W.O., 2003: *Anatomy of the Horse. An Illustrated Text*. 4th ed. Hannover:Schlütersche, 135 s. ISBN 3-89993-003-7.

Choct M., Kocher A., 2000: Non-starch carbohydrates: digestion and its secondary effects in monogastrics. *Proc. Nutr. Soc. Aust.*, 24: 31–38.

Clauss M., Schiele K., Ortmann S., Fritz J., Codron D., Hummel J., Kienzle E., 2013: The effect of very low food intake on digestive physiology and forage digestibility in horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 98: 107–118.

Coenen M., Kienzle E., Vervuert I., Zeyner A., 2011: Recent German Developments in the Formulation of Energy and Nutrient Requirements in Horses and the Resulting Feeding Recommendations. *Journal of Equine Veterinary Science* - May 2011 (Vol. 31, Issue 5, Pages 219-

229, DOI: 10.1016/j.jevs.2011.03.204).

Coles, L. T., Moughan P. J., Darragh A. J., 2005: In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simplestomached animals. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123: 421-444.

Costa M.C., Arroyo L.G., Allen - Vercoe E., Stampfli H.R., Kim R.T., Sturgeon A. , Scott Weese J., 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: e41484. Doi:10.1371/journal.pone.0041484.

Crozier, J.A., Allen V.G., Jack N.E., Fontenot J.P., Cochran M.A., 1997. Digestibility, apparent mineral absorption and voluntary intake by horses fed alfalfa, tall fescue and Caucasian bluestern. *J. Anim. Sci.*, 75: 1651–1658.

Cuddeford D., 2000: Starch digestion in the horse. *Advances in Equine Nutrition Vol. II 1998–2000.* Kentucky Equine Research, pp. 95–104.

Cuddeford D., 2001: Starch digestion in the horse. In J. D. Pagan, and Geor, R. J. (Ed.), *Advances in Equine Nutrition II* (pp. 95-104). Versailles, kentucky, USA: Kentucky Equine Research Inc.

Cuddeford, D., R. A. Pearson, R. F. Archibald, and R. H. Muirhead, 1995: Digestibility and gastrointestinal transit time of diets containing different proportions of alfalfa and oat straw given to Thoroughbreds, Shetland ponies, Highland ponies and donkeys. *Brit. Soc. Anim. Nutr.* 61:407-417.

Cymbaluk, N. F., 1990: Comparison of forage digestion by cattle and horses. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 601-610.

Daniel M. E. W., Rave G., Feldheim W., 1997: Fermentation in human subjects of nonstarch polysaccharides in mixed diets, but not in a barley fiber concentrate, could be predicted by in vitro fermentation using human fecal inocula. *J. Nutr.* 127 (10): 1981-8.

Davies Z., 2009: *Introduction to horse nutrition.* Vyd. 1. Wiley: West Sussex (UK), 240 s. ISBN 978-1-4051-6998-1.

de Fombelle A., Frumholtz P., Poillion D., Drogoul C., Phillippeau C., Jacotot E., and Julliand V., 2001: Effect of the botanical origin of starch on its prececal digestibility measured with the mobile bag technique. Pages 153–155 in Proc. 17th Equine Nutr. Physiol. Symp., ENPS, Lexington, KY.

de Fombelle A., Goachet A.G., Varloud M., Boisot P., and Julliand V., 2003a: Effect of the diet on prececal digestion of different starches in the horse measured with the mobile bag technique. Pages 115–116 in Proc. 18th Equine Nutr. Physiol. Symp., ENPS, Lansing, MI.

de Fombelle A., Varloud M., Goachet A.G., Jacotot E., Phillippeau C., Drogoul C., Julliand V., 2003b: Characterisation of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses fed two distinct diets. *Anim. Sci.* 77:293-304.

de Fombelle A., Veiga L., Drogoul C., and Julliand V., 2004: Effect of the diet composition and feeding pattern on the prececal digestibility of starches from diverse botanical origins measured with the mobile nylon bag technique in horses. *Anim. Sci.*, 82:3625-3634.

Denek N., Polat E., Koncagul S., Can A., 2008: The determination of incubation time and amount of faecal content of horse faeces as an inoculum source for digestibility determination of forages with in vitro procedure. *J. Anim. Vet. Adv.*, 7 (6): 698-702.

DLG, 1984: Futterwerttabellen für Pferde. Vyd. Drepper, K. Universitaät Hohenheim, Frankfurt am Main, 45 s.

Durham A.E., 2009: The Role of Nutrition in Colic. In: Geor RJ (ed): *Clinical Nutrition. Veterinary Clinics of North America, Equine Practise*, Vol 25, Number 1. Philadelphia: WB Saunders, April 2009; 67-78.

Earing J. E., Cassill B. D., Hayes S. H., Vanzant E. S., Lawrence L. M., 2010: Comparison of in vitro digestibility estimates using the Daisy<sup>II</sup> Incubator with in vivo digestibility estimates in horses. *J. Anim. Sci.*, 88: 3954-3963.

Eckert, J. V., R. O. Myer, L. K. Warren, and J. H. Brendemuhl, 2010: Digestibility and nutrient retention of perennial peanut and bermudagrass hays for mature horses. *J. Anim. Sci.* 88:2055-2061.

Ellis A. D. and J. Hill., 2005: Nutritional Physiology of the Horse. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Faubladier C., Chaucheyras - Durand F., da Veiga L., Julliand V., 2013: Effect of transportation on fecal bacterial communities and fermentative activities in horses: Impact of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation. *J. Anim Sci.*, 91: 1736–1744.

Frape D. L., 1998: Equine Nutrition and Feeding (2nd Edition ed.). Cornwall, Great Britain: Blackwell Science Ltd. MPG Books Ltd Bodium.

Frape D. L., 2004: Equine Nutrition and Feeding (Third ed.) Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Frape D. L., 2010: Equine Nutrition and Feeding, 4th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, WestSussex, UK.

Frape D. L., Tuck M. G., Sutcliffe N. H., Jones D. B., 1982: The use of inert markers in the measurement of the digestibility of cubed concentrates and of hay given in several portions to the pony, horse and white rhinoceros (*Diceros simus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72: 77-83.

Friend D.W., Nicholson J.W.G., 1965: A harness and feces collection bag for digestibility trials with horses. *Can. J. Anim. Sci.*, 45: 54–57.

Gálik, B., Selická, A., Bíro, D., Rolinec, M., Juráček, M., Šimko, M., Rajčáková, L., 2013: Corn silage as a potential feed in young horses nutrition. In *15th International Conference, Forage Conservation, High Tatras, Slovakia, 24-26 September 2013*. (pp. 153-154). Animal Production Research Centre Nitra.

GEH, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere, 1994: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung des Pferdes. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

Goachet A.G., Philippeau C., Varloud M., Julliand V., 2009: Adaptations to standard approaches for measuring total tract apparent digestibility and gastro-intestinal retention time in horses in training. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 152: 141–151.

Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagent, procedures and some applications). Agric. Handbook, No. 379, ARS-USDA, Washington, DC.

Gold, J. J., Heath, I. B., Bauchop, T., 1988: Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov. , assigned to the Neocallimasticaceae. *Mol Microbiol* 6, 403-415.

Goldman A., Genizi A, Yuzari A., and Seligman N.G., 1987: Improving the reliability of the two-stage in vitro assay for ruminant feed digestibility by calibration against the in vivo data from a wide range of sources. *Anim. Feed Sci. Technol.*18:233–245.

Grant R.J., and Mertens D.R., 1992: Impact of in vitro fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 75: 1263-1272.

Green, A. R., R. S. Gates, and L. M. Lawrence. 2005. Measurement of horse core body temperature. *J. Therm. Biol.* 30: 370-377.

Greet T. R. C., 2000: Functional Anatomy and Physiology of the Gastrointestinal Tract. Paper presented at the Proceedings of the Annual Seminar of the Equine Branch of the New Zealand Veterinary Association.

Gustaffson A., 2004: Doctoral Dissertation in Antibiotic Associated Diarrhea in Horses- with special reference to *Clostridium difficile*. Swedish University of Agriculture Science, Uppsala, Sweden.

Hayes S. H., Werner H., Lawrence L., 2003: In vitro assessment of fiber digestio capacity for foals. In: *Proc. 18<sup>th</sup> Equine Nutr. Phys. Symp.*, East Lansing, MI: 273-274.

Hintz H. F. 1990: Digestive Physiology. *The Horse*. W.H. Freeman and Company, NY.

Hintz H. F., Cymbaluk N. F., 1994: Nutrition of the Horse. *Annu. Rev. Nutr.*, 14: 243–267.

Hintz H. F., Loy R. G., 1966: Effect of pelleting on the nutritive value of horse rations. *J. Anim. Sci.*, 25: 1059-1062.

Hoffman R. M., 2003: Carbohydrate metabolism in horses. Ithaca, New York, USA.: Department of Animal & Poultry Sciences.

Holden L. A., 1999: Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility of ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82:1791-1794.

Hume, I. D., 1997: Fermentation in the hindgut of mammals. Page 84 In *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1. R. L. Mackie and B. A. White, eds. Chapman & Hall, NY.

In vitro true digestibility (IVTD) fact sheet [online]. Dairy One [cit. 5. prosince 2011]. Dostupné na:<http://www.dairyone.com/Forage/FactSheet/Ivtd%20Fact%20Sheet.htm>

Jackson S. G., 1997: The digestive tract of horse – practical considerations. *Advances in Equine Nutrition*, Vol. I, 1992–1997. Kentucky Equine Research, pp. 1–12.

Jansson A., Lindberg J.E., 2012: A forage-only diet alters the metabolic response of horses in training. *Animal*, 6: 1939–1946.

Jelínek P., Koudela K. 2003: *Fyziologie hospodářských zvířat*. MZLU Brno, 401 s. ISBN 80-7157-644-1.

Jeroch H., Čermák B., Kroupová V., 2006: *Základy výživy a krmení hospodářských zvířat*. Vědecká monografie. Dtp, České Budějovice, 290 s. ISBN 80-7040-873-1.

Józefiak D., Kierończyk B., Rawski M., Hejdysz M., Rutkowski A., Engberg R.M., Højberg O., 2014: Clostridium perfringens challenge and dietary fat type affect broiler chicken performance and fermentation in the gastrointestinal tract. *Animal*, Doi:10.1017/S1751731114000536.

Julliand V., de Fombelle A., Drogoul C. and Jacotot E., 2001. Feeding and microbial disorders in horses: part 3 – effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science* 21, 543–546.

Julliand V., de Vaux A., Millet L. and Fonty G., 1999: Identification of Ruminococcus flavefaciens as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3738–3741.

Kacerovský O., Babička L., Bíro D., Heger J., Jedlička Z., Lohniský J., Mudřík Z., Roubal, P., Svobodová M., Vencel B., Vrátný P., Zelenka J., 1990: Zkoušení a posuzování krmiv. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, s. 216 ISBN 80-209-0098-5.

Kern D.L., Slyter L.L., Leffel E.C., Weaver J.M. and Oltjen R.R., 1974. Ponies vs. steers.

Kern D.L., Slyter L.L., Weaver J.M., Leffel E.C. and Samuelsons G., 1973. Pony cecum vs. steer rumen: the effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *Journal of Animal Science* 37, 463–469.

King J., Plaizier J. C., 2006: Effects of source of rumen fluid on in vitro dry matter digestibility of feeds determined using the Daisy<sup>II</sup> incubator. *Can. J. Anim. Sci.* 86: 439-441.

König H. E., Liebich H. G., 2006: *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals : textbook and colour atlas*. 3. vyd. Stuttgart: Schattauer, 768 s. ISBN 3-7945-2485-3.

Kotb A.R., Luckey T.D., 1972: Markers in nutrition. *Nutr. Abs. Rev.*, 42: 813–845.

Lattimer, J.M., 2007: Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. *J. Anim. Sci.*, 85, 2484-2491.

Li, J., Heath, I. B., Bauchop, T., 1990: *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycets fungi from the hind-gut of the horse and elephant. *Can J Bot* 68, 1021-1033.

Lindberg J.E., 1985: Estimation of rumen degradability of feed proteins with the in sacco technique and various in vitro methods: A review. *Acta Agric. Scand. Suppl.* 25:64-97.

Lorenzo-Figueras, M., S. M. Morisset, J. Morisset, J. Laine, and A. M. Merritt., 2007: Digestive enzyme concentrations and activities in healthy pancreatic tissue of horses. *A. J. Vet. Res.* 68(10): 1070-1072.

Lowman, R. S., Theodorou M. K., Hyslop J.J., Dhanoa M.S., Cuddeford D., 1999: Evaluation of an in vitro batch culture technique for estimating the in vitro digestibility and digestible energy content

of equine feeds using equine faeces as the source of microbial inoculum. *Anim. Feed Sci. Tech.* 80: 11-27.

Mabjeesh, S. J., M. Cohen, and A. Arieli. 2000. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. *J. Dairy Sci.* 83:2289–2294.

Mackenthun E., Coenen M., Vervuert I., 2013: Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent total tract digestibility of nutrients and fermentation profile in healthy horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97: 115–120.

Mackie R.I. and Wilkins C.A., 1988. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2155–2160.

Macheboeuf D., and Jestin M., 1997: Utilization of the gas Method using horse faeces as a source of inoculum. Page 36 in *Proc. Br. Soc. Anim. Sci. Symp.*, Penicuik, Midlothian, UK.

Macheboeuf D., Marangi M., Poncet C., and Martin-Rosset W., 1995: Study of nitrogen digestion from different hays by the mobile nylon bag technique in horses. *Ann. Zootech.* 44(Suppl.):219.

Martin R.G., Mc Meniman N.P., Dowsett K.F., 1989: Pasture intakes of pregnant and lactation mares in south-east Queensland. *Proc. ENPS.*, 11: 176–178.

Martin-Rosset W., Andrieu J., Vermorel M., Dulphy J. P., 1984: Valeur nutritive des aliments pour le cheval. In: Jarrige R., Martin-Rosset W. (Eds.): *Le cheval reproduction-selection-alimentation-exploitation*. INRA Publications, Versailles, France: 208-238.

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., & Morgan, C. A., 2002: *Animal Nutrition* (Six ed.). Essex, UK: Pearson Education Limited.

Medina B., Girard I.D., Jacotot E. and Julliand V., 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *Journal of Animal Science* 80, 2600–2609.



Meyer H., Coenen M., 2003: *Krmení koní*. Euromedia Group, k.s. – Ikar, Praha, 256 s. ISBN 80-249-0264-8.

Meyer, H., Radicke, S., Kienzle, E., Wilke, S., Kleffken, D., & Illenseer, M., 1995: Investigations on preileal digestion of starch from grain, potato and manioc in horses. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 42, 371-2381.

Micek P., Kowalski Z. M., Borowiec F. and Shelford J. A., 2001: Digestibility of whole grain crop silages determined by different methods. *Journal of Animal and Feed Science* 10, 695-706.

Michalet-Doreau B., and Ould-Bah M.Y., 1992: In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen. A review. *Anim. Feed sci. Technol.* 40:57-86.

Milinovich G.J., Trott D.J., Burrell P.C., Croser E.L., Al Jassim R.A.M., Morton J.M., van Eps A.W., Pollitt C.C., 2007: Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ. Microb.*, 9:2090–2100.

Miraglia N., Bergero D., Bassano B., Tarantola M., Ladetto G., 1999: Studies of apparent digestibility in horses and the use of internal markers. *Livest. Prod. Sci.*, 60: 21–25.

Miraglia, N., D. Bergero, M. Polidori, P. G. Peiretti, and G. Ladetto. 2006. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. *Livest. Sci.* 100:10-13.

Miyaji, M., K. Ueda, Y. Kobayashi, H. Hata, and S. Kondo. 2008. Fiber digestion in various segments of the hindgut of horses fed grass hay or silage. *Anim. Sci. J.* 79:339-346.

Moeller B. A., Mc Call C. A., Silverman S.J., 2008: Estimation of saliva production in cribbiting and normal horses. *JEVS*, 28: 85–90.

Moore B.E., Dehority B.A., 1993: Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. *J. Anim. Sci.*, 71: 3350–3358.

Moore J.N., Melton T., Carter W.C., Wright A.L., Smith M.L., 2001: A new look at equine gastrointestinal anatomy, function, and selected intestinal displacements. *AAEP Proc.*, 47: 53–60.

Mrázek, J., 2000: Charakterizace anaerobních hub pomocí klasických a molekulárně genetických metod: Diplomová práce FPBT VŠCHT, ústav biochemie a mikrobiologie, 3-30.

Mudřík Z., Doležal P., Koukal P. (eds.), 2006: Základy moderní výživy skotu. Praha, 276 s. ISBN 80-213-1559-8.

Murray M. J. and G. F. Schusser, 1993: Measurement of 24-h gastric pH using an indwelling pH electrode in horses unfed, fed and treated with ranitidine. *Equine Vet. J.* 25: 417-421.

Murray, J. M. D., A. C. Longland, M. J. S. Moore-Coyler, and C. Dunnett. 2003: The effect of diet and donor animal on the fermentative capacity of equine faecal inocula for use in in vitro digestibility determinations. Pages 121–123 in *Proc. 18th Equine Nutr. Phys. Symp.*, East Lansing, MI.

Nagpal R., Puniya A.K., Griffith G.W., Gujnan G., Punija M., Sehgal J.P., Singh K., 2000: Anaerobic rumen fungi: potential and applications. *NBAIM*, 2: 375–393.

National Research Council (NRC) 1989. Nutrient requirements of horses, 5th revised edition. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.

National Research Council (NRC) 2007. Nutrient requirements of horses, 6th revised edition. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.

Nocek J. E., 1988: In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.

Nomina Anatomica Veterinaria, 2002: PWRiL, Warsaw, pp. 357.

Nsahlai I. V., and N. N. Umunna, 1996: Comparison between reconstituted sheep feces and rumen fluid inoculum and between in vitro and in sacco digestibility methods as predictors of intake and in vivo digestibility. *J. Agric. Sci. Camb.* 126:235–248.

O' Neill H.M., Smith J., Bedford M., 2014: Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 27: 290–301.

Ordakowski-Burk, A. L., R. W. Quinn, T. A. Shellem, and L. R. Vough. 2006. Voluntary intake and digestibility of reed canarygrass and timothy hay fed to horses. *J. Anim. Sci.* 84:3104-3109.

Pagan J. D., 1998: *Advances in Equine Nutrition*. Kentucky Equine Research Inc., Versailles, Kentucky, USA, 564 s. ISBN 80-249-0264-8.

Pagan J. D., 2008: Nutrient requirements: applying the science. *Advances in Equine Nutrition, IV. 2004–2008*. Kentucky Equine Research, pp. 1–6.

Peiretti P. G., Meineri G., Miraglia N., Muciarelli M., Bergero D., 2006: Intake and apparent digestibility of hay or hay plus concentrate diets determined in horses by the total collection of feces and n-alkanes as internal markers. *Livestock Sci.*, 100: 189-194.

Pearson, R. A., R. F. Archibald, and R. H. Muirhead. 2001. The effect of forage quality and level of feeding on digestibility and gastrointestinal transit time of oat straw and alfalfa given to ponies and donkeys. *Brit. J. Nutr.* 85:599-606.

Pond, W. G., D. C. Church, K.R. Pond, and P.A. Schoknecht., 2005: *Basic Animal Nutrition and Feeding*. Wiley, Hoboken, NJ.

Ragnarsson S., Lindberg J. E., 2010: Nutritional value of mixed grass haylage in Icelandic horses. *Livestock Sci.*, 131: 83-84.

Ringler J., Cassill B., Hayes S., and Lawrence L., 2005a: Comparison of in vitro digestibility estimates using the Daisy II incubator to in vivo digestibility estimates. s. 43–44 in *Proc. 19th Equine Sci. Soc.*, Tuscon, AZ.

Ringler J., Cassill B., Hayes S., and Lawrence L., 2005b: Effect of incubation time on in vitro estimates of DM, NDV and ADV digestibility obtained using equine faeces as inoculum. s. 307–308 in *Proc. 19th Equine Sci. Soc.*, Tuscon, AZ.

Rowe J., Brown W., and Bird S., 2001: *Safe and Effective Grain Feeding for Horses* (No. RIRDC Publication No. 01/148). Barton, Canberra, New South Wales Australia: Rural Industries Research and Development Corporation.

Sales J., 2012: A review on the use of indigestible dietary markers to determine total tract apparent digestibility of nutrients in horses. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 174: 119–130.

SAS Institute, Inc., 2000. Version 8.1 Edition. Cary, NC.

Schurg W. A., 1981: Compilation of data evaluating various techniques for determining digestion of equine rations. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Equine Nutrition and Physiology Society Symposium*. Warrenton, VA: 1-2.

Sneddon J. C., Argenzio R.A., 1998: Feeding strategy and water homeostasis in equids: the role of the hind gut. *J. Arid Environ*, 38: 493–509.

St. Pierre B., dela Fuente G., O' Neill S., Wright A. G., Al Jassim R., 2012: Analysis of stomach bacterial communities in Australian feral horses. *Mol. Biol. Rep.*, 40: 369–376.

Staniar, W. B., J. R. Bussard, N. M. Repard, M H. Hall, and A. O. Burk. 2010. Voluntary intake and digestibility of teff hay fed to horses. *J. Anim. Sci.* 88:3296-3303.

Stern M.D., Bach A., and Calsamiglia S., 1997: Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.

Stevens E., Hume I., 1995: *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York, NY.

Sturgeon, L. S., L. A. Baker, J. L. Pipkin, J. C. Haliburton, and N. K. Chirase. 2000. The digestibility and mineral availability of matua, bermudagrass, and alfalfa hay in mature horses. *J. Equine Vet. Sci.* 20:45-48.

Swinney D. L., Potter G.D., Greene L.W., Schumacher J., Murray - Gerzik M., Goldy G., 1995: Digestion of fat in the equine small and large intestine. *Proc. 14th Equine Nutr. Physiol. Soc.*, pp. 30–35.

The Merck Veterinary Manual, 2010: <<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp>> Accessed May 3.

Tilley J. M. A., Terry R. A., 1963: A 2-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grass. Soc.* 18:104-111.

Van Soest P. J., 1994: *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Cornell University, Ithaca, New York, 476 s.

Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A., 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74, 3583-3597.

Van Weyenberg S., Sales J. and Janssens G. P. J., 2006: Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: a review. *Livestock Science* 99, 3–12.

Vanzant E. S., Cochran R. C., Titgemeyer E. C., 1998: Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76, 2717-2729.

Wilman D., Adesogan A., 2000: A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84:33-47.

Zelenka J., 2006: Stanovení stravitelnosti živin. s. 55-60. In Zeman a kol. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Profi Press s.r.o., Praha, 360 s., ISBN 80-86726-17-7.

Zeman L., Šajdler P., Homolka P., Kudrna V., 2005: Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro koně. *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*, s. 7-18, 116 s., ISBN 80-7157-836-3.

Zeman, L., Veselý, P., Ryant, P., Skládanka, J., Zelenka, J., 2006: Živiny. s. 11-31. In Zeman a kol. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 360 s., ISBN 80-86726-17-7.

Zeyner A., Kienzle E., 2002: A Method to Estimate Digestible Energy in Horse Feed. *J. Nutr.* 132: 6 1771S-1773S.

## 9 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### Recenzované publikace

Čermáková J., Kudrna V., Illek J., Blažková K., Haman J., 2012: Effects of a rumenprotected form of methionine and a methionine analogue on the lactation performance of dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 57, (9): 410–419.

Maršálek M., Blažková K., Sedláčková M., Kašná E., 2010. Evaluation of improvement in jumping ability of young horses. *J.Livest. Sci.* 1(1), 1–8.

### Sborníky z konferencí

Kubelková, P., Blažková, K., Jančík, F. & Homolka, P., 2013: Comparison of in vivo organic matter digestibility of feed estimates in horses. In *Forage Conservation*. Nitra: Animal Production Research Centre, s. 155-156.

Blažková K., Čermáková J., Doležal P., Kudrna V., 2012: The effect of dry period management and nutrition on milk production, s. 198. In *Book of Abstracts of the 63rd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*. Wageningen Academic Publishers, NL.

Kudrna V., Illek J., Blažková K., Výborná A., Čermáková, J., Tyrolová Y., 2012: Strategie chovu dojníc v době stání na sucho, s. 66-69. In Nad' P., Maskalová I. *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky X*. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice.

Blažková K., Jančík F., Homolka P., Kudrna V., Maršálek M., Čermáková J., 2012: Porovnání in vivo a in vitro stravitelnosti kukuřičné siláže u koní, s. 308--311. In Nad' P., Maskalová I. *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky X*. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice.

Blažková K., Jančík F., Homolka P., Kudrna V., Maršálek M., Čermáková J., 2012: Comparison of in vivo and in vitro digestibility in horses. *Koně 2012, Sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*, České Budějovice.

Čermáková J., Kudrna V., Blažková K., 2012: Strategie výživy dojnic v období stání na sucho a uplatnění netradičních krmiv, s. 19-21. In: *Sborník přednášek Lektorský den VÚŽV Uhřetěves, v.v.i., ÚZEI, Praha-Uhřetěves.*

Kudrna V., Čermáková J., Blažková K., 2011: Netradiční krmiva ve výživě dojnic, s. 23. – 25. In: *Sborník abstraktů Chovatelské fórum, VFU Brno + VEDUCA s.r.o., Brno.*

Blažková K., Čermáková J.: Vliv zkrmování lupiny bílé na mléčnou užitkovost dojnic. In *Sborník z mezinárodní vědecké konference Výživa zvířat 2011*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2011, s. 112--118. ISBN 978-80-87415-10-8.

Čermáková J., Kudrna V., Blažková K., 2011: Uplatnění sušených kukuřičných výpalků ve výživě dojnic. In STRAKOVÁ, E. -- SUCHÝ, P. *Sborník konference IX. Kábrtovy dietetické dny*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, s. 18--23. ISBN 978-80-7399-125-8.

Poláková K., Kudrna V., Čermáková J., Blažková K.: Feeding of non-structural carbohydrates prepartum and its effect on milk production performance. *XIth Middle European Buiatrics Congress, 17-19th June 2010 in Brno.*

Kudrna, V., Čermáková, J., Blažková, K.: Uplatnění semene lupiny bílé ve výživě dojnic. *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky IX*, 2010. ISBN 978-80-8077-194-2.

Kudrna, V., Koucký, M., Čermáková, J., Blažková, K.: Náhrada sójového extrahovaného šrotu lupinou bílou ve výkrmu prasat. *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky IX*, 2010. ISBN 978-80-8077-194-2.

Maršálek M., Blažková K., Zedníková J.: Judging of young horses jumping ability. Olsztyńskie Koło PTZ ma zaszczyt zaprosić do udziału w *LXXV Zjeździe Naukowym Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, który odbędzie się w Uniwersytecie Warmińsko Mazurskim w Olsztynie w dniach 7 – 9. 09. 2010r.

Blažková K., Homolka P., Maršálek M.: The corn silage digestibility by horses. MendelNet'09 Agro – Proceedings of International Ph.D. Students Conference. ISBN: 978-80-7375-352-8 Brno, November 25th, 2009.

## **Certifikovaná metodika**

Kudrna, V., Čermáková, J., Blažková, K.: Uplatnění sušených kukuřičných výpalků (DDGS) ve výživě dojnic. Certifikovaná metodika. 2011, Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves. ISBN 978-80-7403-089-5.

## **Odborná sdělení**

Blažková, K.; Čermáková, J.; Kudrna, V. Použití netradičních krmiv ve výživě vysokoužitkových dojnic. Veterinářství. 2011, 61, 11, s. 659-663. ISSN 05068231.

Blažková K.: Co všechno dokáže ovlivnit správná výživa. Jezdectví. 2010,č.11, roč. 58, s. 72-73. ISSN 1210-5406.

## **Ostatní**

Blažková K.: Doplnková krmiva ve výživě koní, Informační magazín VVS info 2011

Blažková K.: Zásady odchovu hříbat z pohledu výživy. Koně ve formě – odborný seminář o koních, 2010. ISBN 978-80-7394-228-1 (přednáška a sborník)

Blažková K.: Problematika výživy rostoucích koní, Informační magazín VVS info 2010



## 10 PŘÍLOHY

### Obrázky

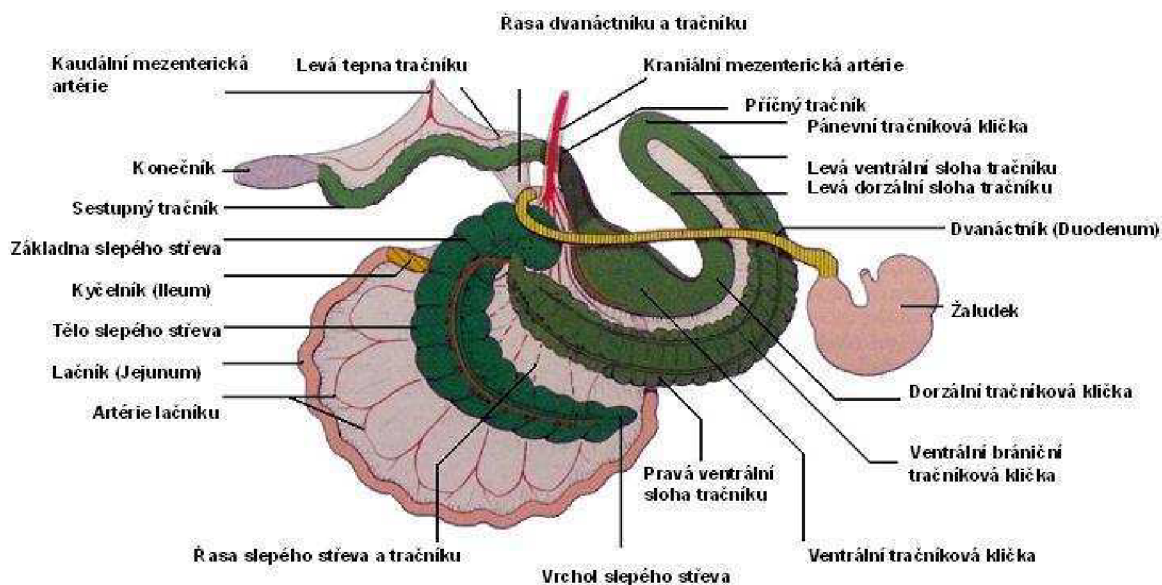
- Obrázek č. 1: *Popis trávicího traktu koní (König a Liebich, 2006)*
- Obrázek č. 2: *Průběh mikrobiologické fermentace v trávicím traktu koní upraven podle Cummings a Macfarlane (1991)*
- Obrázek č. 3: *Žaludek a kraniální část dvanáctníku (Budras et al., 2003)*
- Obrázek č. 4: *Patentovaný postroj (Horse Diaper) sloužící k zachycování tuhých i tekutých výkalů v průběhu bilančních pokusů.*
- Obrázek č. 5: *Schéma rozdělení energie (Davies, 2009)*

### Tabulky

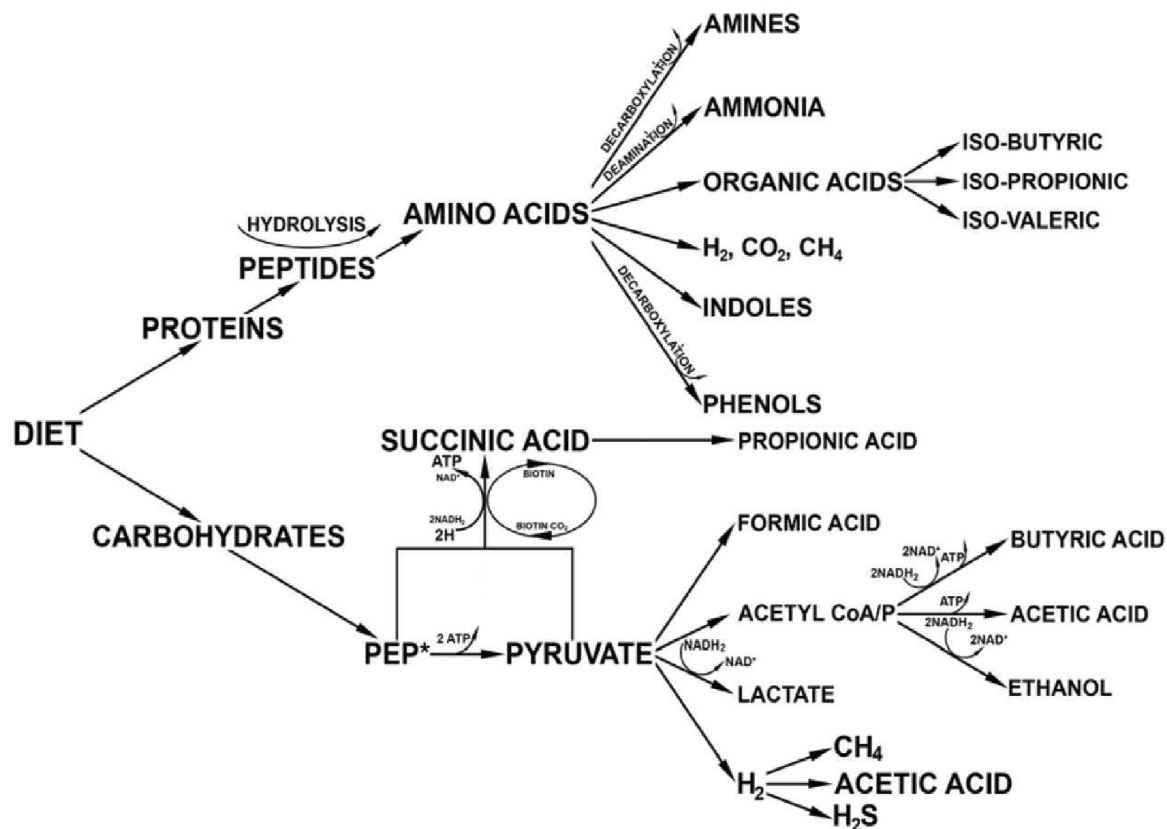
- Tabulka č. 1: *Potřeba stravitelné energie pro dospělé koně na udržení látkové výměny podle norem NRC (1989, 2007), GEH (1994)*
- Tabulka č. 2: *Potřeba energie na pohyb*
- Tabulka č. 3: *Potřeba stravitelné energie pro rostoucí koně (MJ/ks/den)*
- Tabulka č. 4: *Potřeba Ca a P pro koně (g/ks/den)*
- Tabulka č. 5: *Chemické složení experimentálních krmných dávek ve 100% sušině (%)*
- Tabulka č. 6: *Složení KD luční seno s ovsem*
- Tabulka č. 7: *Příklady studií využívající in vivo bilanční metodu stanovení stravitelnosti krmiv*
- Tabulka č. 8: *Posouzení in vivo stravitelnosti živin mezi testovanými krmivy*

- Tabulka č. 9: Vliv bilanční periody na výši stravitelnosti živin u sledovaných krmiv*
- Tabulka č. 10: Posouzení stravitelnosti živin mezi testovanými krmivy stanovenými metodou in vitro*
- Tabulka č. 11: Posouzení rozdílů ve stravitelnosti krmiv stanovenými různými in vitro metodami*
- Tabulka č. 12: Vliv metody stanovení na stravitelnost živin jednotlivých krmiv*
- Tabulka č. 13: Posouzení rozdílů ve stravitelnosti krmiv stanovenými různými metodami*
- Tabulka č. 14: Posouzení stravitelnosti živin mezi testovanými krmivy stanovenými metodami in vivo (1. perioda) a in vitro*
- Tabulka č. 15: Vliv metody stanovení na stravitelnost živin jednotlivých krmiv*

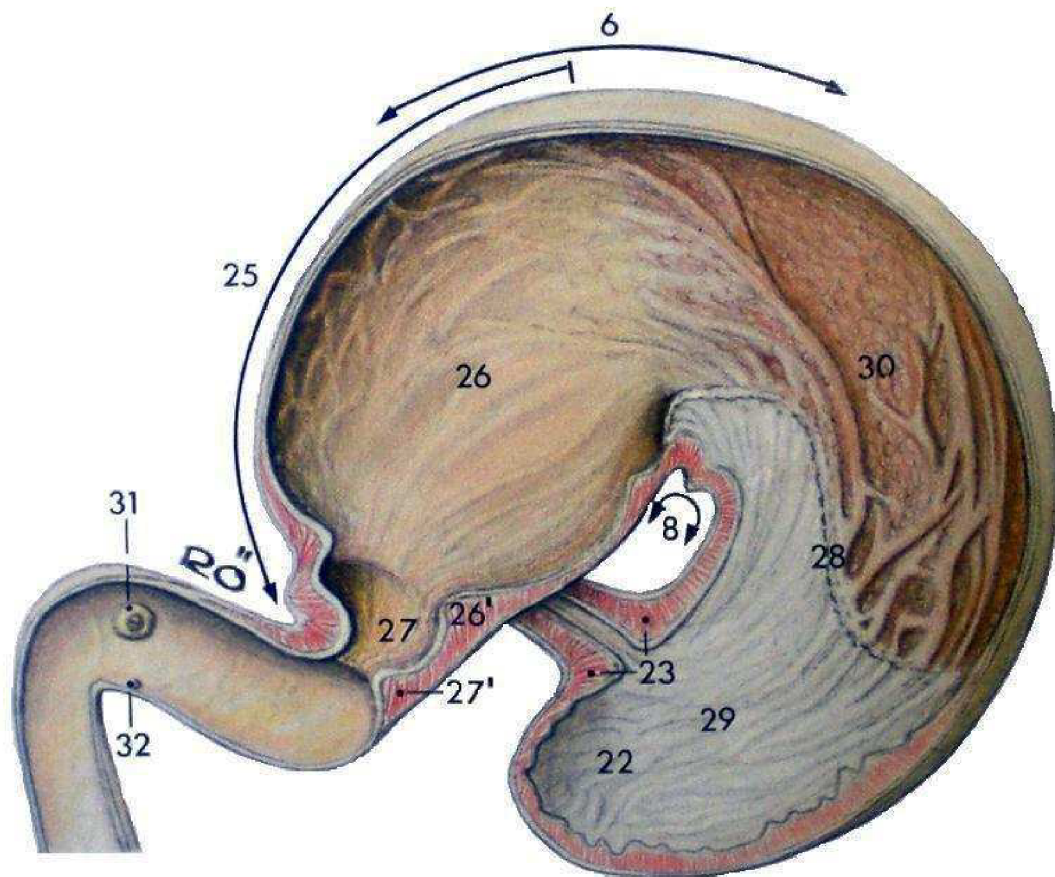
Obrázek č. 1: Popis trávicího traktu koní (König a Liebich, 2006)



Obrázek č. 2: Průběh mikrobiologické fermentace v trávicím traktu koní upraven podle Cummings a Macfarlane (1991)

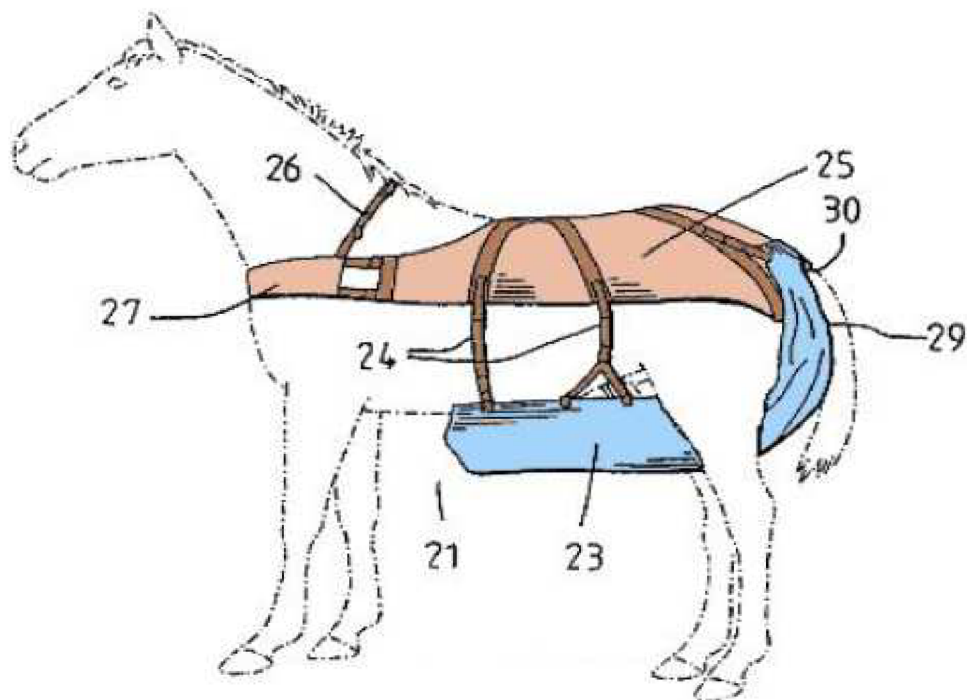


Obrázek č. 3: Žaludek a kraniální část dvanáctníku (Budras et al., 2003)

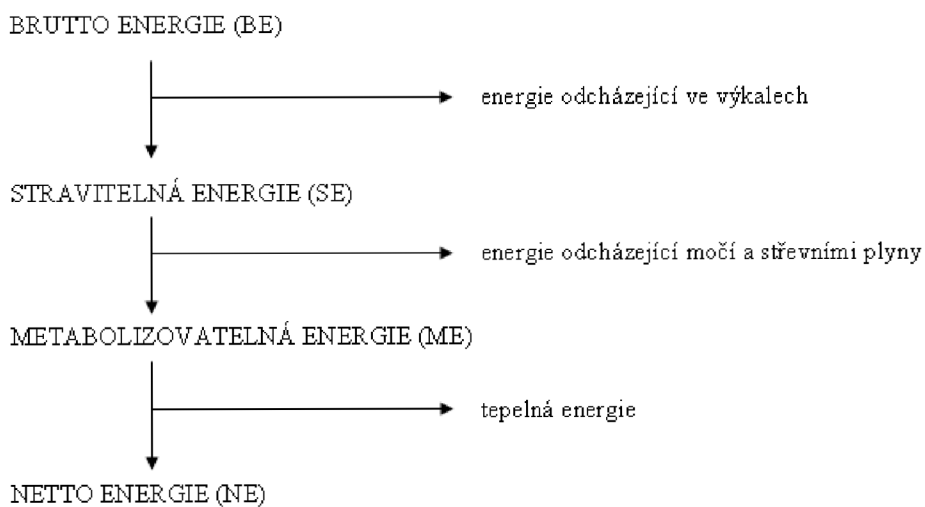


- |    |                 |     |                        |    |   |
|----|-----------------|-----|------------------------|----|---|
| 6  | velké zakřivení | 26  | pylorické žlázy        | 29 | bezžláznatá sliznice                              |
| 8  | malé zakřivení  | 26' | svěrač vrátníku        | 30 | žláznatá sliznice                                 |
| 22 | slepý vak       | 27  | vrátníkový kanál       | 31 | velká dvanáctníková bradavka - vyústění žlučovodu |
| 23 | svěrač česla    | 27' | svěrač vrátníku        | 32 | malá dvanáctníková bradavka - slinivkový vývod    |
| 25 | vrátníková část | 28  | zřasený okraj sliznice |    |   |

Obrázek č. 4: Patentovaný postroj (Horse Diaper) sloužící k zachycování tuhých i tekutých výkalů v průběhu bilančních pokusů.



Obrázek č. 5: Schéma rozdělení energie (Davies, 2009)



Tabulka č. 1: *Potřeba stravitelné energie pro dospělé koně na udržení látkové výměny podle norem NRC (1989, 2007), GEH (1994)*

ž. hm. (kg)	SE (MJ/ks/den)				
	GEH 1994	NRC 2007			NRC 1989
		Minimální	Průměrný	Zvýšený	
<b>200</b>	31,9	25,5	28,0	30,5	31,0
<b>500</b>	63,6	63,6	69,9	76,1	68,6
<b>600</b>	72,6	76,2	83,7	91,2	81,2

Tabulka č. 2: *Potřeba energie na pohyb*

Stupeň práce	Srdeční tep	Typ práce (příklad)	SE MJ/den minimální záchovná dávka	SE MJ/den průměrná záchovná dávka	SE MJ/den zvýšená záchovná dávka
<b>Lehká</b>	<b>80 tepů/min</b>	začátek tréninku, rekreační ježdění	(0,1268 ž. hm.) × 1,2	(0,1393 ž. hm.) × 1,2	(0,1519 ž. hm.) × 1,2
<b>Střední</b>	<b>90 tepů/min</b>	střední trénink, závody – nízký stupeň	(0,1268 ž. hm.) × 1,4	(0,1393 ž. hm.) × 1,4	(0,1519 ž. hm.) × 1,4
<b>Těžká</b>	<b>110 tepů/min</b>	cval, trysk, těžce trénující koně	(0,1268 ž. hm.) × 1,6	(0,1393 ž. hm.) × 1,6	(0,1519 ž. hm.) × 1,6

Tabulka č. 3: *Potřeba stravitelné energie pro rostoucí koně (MJ/ks/den)*

Věk	Živá hmotnost dospělého koně (kg)							
	100	200	300	400	500	600	700	800
<b>3 – 6</b>	19	32	44	54	63	73	80	87
<b>7 – 12</b>	20	34	46	57	66	74	80	86
<b>13 – 18</b>	21	36	48	59	68	77	85	91
<b>19 – 24</b>	22	36	48	59	70	79	88	96
<b>25 – 36</b>	23	38	51	63	74	84	94	103

(GEH, 1994)

Tabulka č. 4: *Potřeba Ca a P pro koně (g/ks/den)*

Použití	200 kg ž.hm.		400 kg ž.hm.		600 kg ž.hm.		800 kg ž.hm.	
	Ca	P	Ca	P	Ca	P	Ca	P
<b>Záchova</b>	10	6	20	12	30	18	40	24
<b>Práce:</b> lehká	10	6	21	12	31	18	41	24
střední	11	6	21	12	32	18	42	24
těžká	11	6	23	12	34	19	46	25
<b>Vysokobřeží</b> (9 – 11. měs.)	17	11	31	21	45	30	59	39
<b>Laktující</b> (3. měsíc)	25	18	43	33	61	46	78	59
<b>Rostoucí:</b> 3. – 6. měs.	14	10	27	19	40	28	52	37
7. – 12. měs.	13	8	24	16	32	21	38	25
13. – 18. měs.	11	7	21	14	31	21	38	26
19. – 24. měs.	11	7	21	13	31	20	41	26
25. – 36. měs.	11	7	21	13	31	20	41	26

Tabulka č. 5: Chemické složení experimentálních krmných dávek ve 100% sušině (%)

<b>Chemické složení (ve 100 % sušině)</b>	<b>Kukuřičná siláž (pokus 1)</b>	<b>Seno + oves (pokus 2)</b>	<b>Travní siláž (pokus 3)</b>	<b>Luční seno (pokus 4)</b>
<b>Sušina</b>	34,6	92,4	51,2	84,4
<b>BE (MJ/kg)</b>	18,9	17,8	18,8	17,8
<b>OH</b>	94,7	91,7	89,9	90,5
<b>Tuk</b>	4,2	1,6	1,7	1,5
<b>NL</b>	9,4	9,6	10,5	9,8
<b>Vláknina</b>	18,5	32,3	28,2	32,9
<b>NDV</b>	39,5	53,0	57,0	69,4
<b>ADV</b>	22,3	29,0	35,5	42,8
<b>ADL</b>	3,2	5,3	5,4	8,2
<b>popel</b>	4,5	8,3	10,1	9,5
<b>pH</b>	3,6		4,5	
<b>KVV (mgKOH/100g siláže)</b>	1568,2	-	1537,4	-
<b>kys. mléčná (% v původní hmotě)</b>	2,7	-	2,5	-
<b>kys.octová (% v původní hmotě)</b>	0,6	-	0,4	-
<b>kys.propionová (% v původní hmotě)</b>	0,1	-	0,1	-



Tabulka č. 6: Chemické složení KD luční seno s ovsem

<b>Chemické složení (ve 100% sušině)</b>	<b>Luční seno (pokus 2)</b>	<b>Oves setý (pokus 2)</b>
<b>Sušina</b>	86,4	87,8
<b>BE (MJ/kg)</b>	17,8	19,1
<b>OH</b>	90,1	96,9
<b>Tuk</b>	0,9	3,9
<b>NL</b>	8,7	12,5
<b>Vláknina</b>	39,3	9,6
<b>NDV</b>	59,4	32,8
<b>ADV</b>	35,7	7,6
<b>ADL</b>	6,5	1,4
<b>popel</b>	9,9	3,1

Tabulka č. 7: Příklady studií využívající in vivo bilanční metodu stanovení stravitelnosti krmiv

Studie	Pohlaví	Plemeno	Počet koní	Přípravné období	Pokusné období	Krmivo
Cymbaluk, 1990	valaši	pony	6	25	4	vojtěškové seno
Crozier et al., 1997	valaši	arabský plnokrevník	6	15	5	vojtěškové seno
Cuddeford et al., 1995	valaši	anglický plnokrevník	4	14	7	melasované vojtěškové seno
Eckert et al., 2010	valaši	mix	6	10	4	seno z porostu troskutu prstnatého
Miraglia et al., 2006	valaši	-	4	14	6	luční seno
Miyaji et al., 2008	mix	anglický plnokrevník	3	7	4	seno z porostu bojínku lučního
Ordakowski-Burk et al., 2006	valaši	anglický plnokrevník	6	5	4	seno z porostu bojínku lučního
Pearson et al., 2001	-	welsh pony	4	14	7	melasovaná ovesná sláma
Staniar et al., 2010	klisny	anglický plnokrevník	6	9	3	seno z porostu miličky habešské
Sturgeon et al., 1999	valaši	-	4	7	5	seno z porostu víceletého sveřepu

Tabulka č. 8: Posouzení in vivo stravitelnosti živin mezi testovanými krmivý

Stravitelnost (%)	Krmivo				se
	KS	LSO	TS	LS	
<b>Sušina</b>	63,29 <sup>a</sup>	48,64 <sup>b</sup>	65,47 <sup>a</sup>	47,98 <sup>b</sup>	0,91
<b>OH</b>	66,18 <sup>a</sup>	52,09 <sup>b</sup>	65,07 <sup>a</sup>	52,19 <sup>b</sup>	0,93
<b>NL</b>	59,26 <sup>ab</sup>	55,16 <sup>bc</sup>	63,56 <sup>a</sup>	50,90 <sup>c</sup>	1,43
<b>NDV</b>	40,14 <sup>c</sup>	36,18 <sup>c</sup>	59,02 <sup>a</sup>	46,28 <sup>b</sup>	1,52
<b>Vláknina</b>	36,88 <sup>c</sup>	45,32 <sup>b</sup>	59,37 <sup>a</sup>	44,90 <sup>b</sup>	1,92
<b>Energie</b>	64,88 <sup>a</sup>	48,16 <sup>b</sup>	63,92 <sup>a</sup>	46,84 <sup>b</sup>	0,91

<sup>abc</sup>Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší (p < 0,05).

KS (kukuřičná siláž), LSO (luční seno s ovsem), TS (travní siláž), LS (luční seno)

Tabulka č. 9: Vliv bilanční periody na výši stravitelnosti živin u sledovaných krmiv

Stravitelnost (%)	Periody		se	p
	1	2		
<b>Sušina</b>	57,96	54,91	0,56	0,0002
<b>OH</b>	60,80	56,85	0,57	<0,0001
<b>NL</b>	58,75	55,70	0,87	0,0115
<b>NDV</b>	49,91	44,25	0,93	<0,0001
<b>Vláknina</b>	49,93	45,85	1,17	0,0117
<b>Energie</b>	57,44	54,19	0,56	<0,0001

Tabulka č. 10: Posouzení stravitelnosti živin mezi testovanými krmivy stanovenými metodou *in vitro*

Stravitelnost (%)	Krmivo				se	p
	KS	LSO	TS	LS		
<b>Sušina</b>	74,77 <sup>a</sup>	62,56 <sup>b</sup>	62,49 <sup>b</sup>	59,27 <sup>b</sup>	0,814	<0,0001
<b>OH</b>	75,27 <sup>a</sup>	63,68 <sup>bc</sup>	65,44 <sup>b</sup>	60,72 <sup>c</sup>	0,781	<0,0001
<b>NDV</b>	46,66 <sup>b</sup>	53,73 <sup>a</sup>	49,07 <sup>ab</sup>	50,65 <sup>ab</sup>	1,352	0,0118
<b>Vláknina</b>	52,98 <sup>b</sup>	67,53 <sup>a</sup>	57,25 <sup>b</sup>	68,52 <sup>a</sup>	2,318	0,0002

<sup>abc</sup> Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší ( $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 11: Posouzení rozdílů ve stravitelnosti krmiv stanovenými různými in vitro metodami

Stravitelnost (%)	Metody <i>in vitro</i> (IVT)		se	p
	IVT 40	IVT 200		
<b>Sušina</b>	62,19	67,35	0,576	<0,0001
<b>OH</b>	62,89	69,66	0,552	<0,0001
<b>NDV</b>	44,65	55,40	0,956	<0,0001
<b>Vláknina</b>	57,17	65,97	1,639	0,0012

IVT - *in vitro*

IVT 40 - na přípravu očkovací látky bylo použito 40 g vzorku výkalů koní

IVT 200 - na přípravu očkovací látky bylo použito 200 g vzorku výkalů koní

Tabulka č. 12: Vliv metody stanovení na stravitelnost živin jednotlivých krmiv

Strav. (%)	KS			LSO			TS			LS			se	K	p	
	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200			M	K*M
<b>Suš.</b>	63,29 <sup>c</sup>	71,99 <sup>ab</sup>	77,55 <sup>a</sup>	48,64 <sup>e</sup>	61,69 <sup>cd</sup>	63,44 <sup>c</sup>	65,47 <sup>c</sup>	61,17 <sup>cd</sup>	63,81 <sup>bc</sup>	47,98 <sup>e</sup>	53,94 <sup>de</sup>	64,61 <sup>bc</sup>	1,743	***	***	***
<b>OH</b>	66,18 <sup>c</sup>	72,43 <sup>ab</sup>	78,11 <sup>a</sup>	52,09 <sup>e</sup>	62,54 <sup>cd</sup>	64,83 <sup>b</sup>	65,07 <sup>c</sup>	61,64 <sup>cd</sup>	69,24 <sup>bc</sup>	52,20 <sup>e</sup>	54,96 <sup>de</sup>	66,48 <sup>bc</sup>	1,829	***	***	***
<b>NDV</b>	40,14 <sup>cd</sup>	38,90 <sup>cd</sup>	54,43 <sup>ab</sup>	36,18 <sup>d</sup>	51,93 <sup>abc</sup>	55,54 <sup>ab</sup>	59,02 <sup>a</sup>	45,85 <sup>bcd</sup>	52,29 <sup>ab</sup>	46,28 <sup>bc</sup>	41,93 <sup>bcd</sup>	59,37 <sup>a</sup>	2,781	***	***	***
<b>Vlák.</b>	36,88 <sup>e</sup>	40,53 <sup>de</sup>	65,44 <sup>ab</sup>	45,32 <sup>cd</sup>	63,50 <sup>ab</sup>	71,57 <sup>a</sup>	59,37 <sup>b</sup>	58,57 <sup>ab</sup>	55,94 <sup>bc</sup>	44,90 <sup>cd</sup>	66,11 <sup>ab</sup>	70,93 <sup>a</sup>	3,037	**	***	**

<sup>abcde</sup> Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší ( $p < 0,01$ ).

\*\* Průkazné při  $p < 0,01$ .

\*\*\* Průkazné při  $p < 0,001$ .

Tabulka č. 13: Posouzení rozdílů ve stravitelnosti krmiv stanovenými různými metodami

Stravitelnost (%)	Metoda			se	p
	<i>IV</i>	<i>IVT 40</i>	<i>IVT 200</i>		
<b>Sušina</b>	56,34 <sup>c</sup>	62,19 <sup>b</sup>	67,35 <sup>a</sup>	0,871	<0,0001
<b>OH</b>	58,88 <sup>c</sup>	62,89 <sup>b</sup>	69,66 <sup>a</sup>	0,915	<0,0001
<b>NDV</b>	46,61 <sup>c</sup>	57,17 <sup>b</sup>	65,97 <sup>a</sup>	1,519	<0,0001
<b>Vláknina</b>	45,41 <sup>b</sup>	44,65 <sup>b</sup>	55,40 <sup>a</sup>	1,391	<0,0001

<sup>abc</sup>Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší ( $p < 0,0001$ ).

*IV* - *in vivo*

*IVT 40* - na přípravu očkovací látky bylo použito 40 g vzorku výkalů koní

*IVT 200* - na přípravu očkovací látky bylo použito 200 g vzorku výkalů koní

Tabulka č. 14: Posouzení stravitelnosti živin mezi testovanými krmivy stanovenými metodami *in vivo* (1. perioda) a *in vitro*

Stravitelnost (%)	Metoda			se
	<i>In vivo</i> 1.p.	<i>In vitro</i> 40	<i>In vitro</i> 200	
<b>Sušina</b>	57,75 <sup>c</sup>	62,19 <sup>b</sup>	67,35 <sup>a</sup>	0,653
<b>OH</b>	60,69 <sup>c</sup>	62,89 <sup>b</sup>	69,66 <sup>a</sup>	0,627
<b>NDV</b>	47,96 <sup>b</sup>	44,65 <sup>c</sup>	55,40 <sup>a</sup>	0,974
<b>Vláknina</b>	48,24 <sup>c</sup>	57,17 <sup>b</sup>	65,97 <sup>a</sup>	1,281

<sup>abc</sup>Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší ( $p < 0,0001$ ).

Tabulka č. 15: Vliv metody stanovení na stravitelnost živin jednotlivých krmiv

Strav. (%)	KS			LSO			TS			LS			p		
	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200	IV	IVT 40	IVT 200	se	K	M
<b>Suš.</b>	63,83 <sup>cd</sup>	71,99 <sup>ab</sup>	77,55 <sup>a</sup>	49,90 <sup>e</sup>	61,69 <sup>cd</sup>	63,44 <sup>c</sup>	66,84 <sup>bc</sup>	61,17 <sup>cd</sup>	63,81 <sup>bc</sup>	50,45 <sup>e</sup>	53,94 <sup>de</sup>	64,61 <sup>bc</sup>	1,307	***	***
<b>OH</b>	66,73 <sup>bcd</sup>	72,43 <sup>ab</sup>	78,11 <sup>a</sup>	53,61 <sup>e</sup>	62,54 <sup>cd</sup>	64,83 <sup>b</sup>	68,34 <sup>bc</sup>	61,64 <sup>cd</sup>	69,24 <sup>bc</sup>	54,07 <sup>e</sup>	54,96 <sup>de</sup>	66,48 <sup>bc</sup>	1,254	***	***
<b>NDV</b>	41,88 <sup>fg</sup>	38,90 <sup>cd</sup>	54,43 <sup>ab</sup>	37,19 <sup>g</sup>	51,93 <sup>abc</sup>	55,54 <sup>ab</sup>	63,85 <sup>a</sup>	45,85 <sup>bcd</sup>	52,29 <sup>ab</sup>	48,93 <sup>cde</sup>	41,93 <sup>bcd</sup>	59,37 <sup>a</sup>	1,948	***	***
<b>Vlák.</b>	36,06 <sup>f</sup>	40,53 <sup>de</sup>	65,44 <sup>ab</sup>	45,84 <sup>de</sup>	63,50 <sup>ab</sup>	71,57 <sup>a</sup>	64,20 <sup>abc</sup>	58,57 <sup>ab</sup>	55,94 <sup>bc</sup>	46,88 <sup>de</sup>	66,11 <sup>ab</sup>	70,93 <sup>a</sup>	2,563	***	***

<sup>abcdefg</sup> Hodnoty v řádku označené různými písmennými indexy se liší ( $p < 0,0001$ ).

\*\*\* Průkazné při  $p < 0,0001$ .