**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**ÚSTAV BIOCHEMIE**

# Bakalářská práce

**Brno 2014** **Jitka Hutařová**

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE

# POROVNÁNÍ IN VITRO A IN SITU METOD PRO HODNOCENÍ STRAVITELNOSTI VLÁKNINY KUKUŘIČNÉ SILÁŽE U DOJNIC

Bakalářská práce

**Jitka Hutařová**

**Vedoucí práce: Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D.** **Brno 2014**

# Bibliografický záznam

| | |
|---|---|
| **Autor:** | Jitka Hutařová<br>Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita<br>Ústav biochemie |
| **Název práce:** | Porovnání in vitro a in situ metod pro hodnocení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže u dojnic |
| **Studijní program:** | Biochemie |
| **Studijní obor:** | Biochemie |
| **Vedoucí práce:** | Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D. |
| **Akademický rok:** | 2013/2014 |
| **Počet stran:** | 43 |
| **Klíčová slova:** | in vitro, in situ, kukuřičná siláž, stravitelnost, vláknina, NDF |

# Bibliographic Entry

| | |
|---|---|
| **Author:** | Jitka Hutařová<br>Faculty of Science, Masaryk University<br>Department of Biochemistry |
| **Title of Thesis:** | Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of maize silage fibre digestibility in dairy cows |
| **Degree programme:** | Biochemistry |
| **Field of Study:** | Biochemistry |
| **Supervisor:** | Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D. |
| **Academic Year:** | 2013/2014 |
| **Number of Pages:** | 43 |
| **Keywords:** | in vitro, in situ, maize silage, digestibility, fiber, NDF |

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet

evropský sociální fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit stravitelnost vlákniny kukuřičné siláže dvěma různými metodami. Kukuřičná siláž je nejvýznamnějším objemným krmivem ve výživě laktujících dojnic. Stravitelnost vlákniny je pak jedním z faktorů, který významně ovlivňuje jejich užitkovost. Vláknina ve výživě dojnic je velmi důležitou živinou tvořenou mnoha sacharidovými složkami. Neutrálně-detergentní vláknina (NDF) zahrnuje všechny složky buněčné stěny, tedy hemicelulózu, celulózu a lignin. Stanovení NDF a její stravitelnosti je základní charakteristikou vlákniny v krmivu. Stravitelnost NDF byla měřena dvěma metodami: metodou in vitro (v inkubačních intervalech 0, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin) a metodou in situ (měřeno v inkubačních intervalech 0, 2, 4, 8, 12, 24 a 48 hodin), kdy byly vzorky inkubovány v bachoru dojnice. Pro tyto účely byla použita zaprahlá dojnice holštýnského plemene opatřená ruminální kanylou. U metody in vitro dosahovala stravitelnost NDF 40,16 % po 48 hodinách inkubace. Po vyloučení inkubačních intervalů 2 a 4 hodiny rostla stravitelnost lineárně. Metodou in situ byla zjištěna stravitelnost NDF po 48 hodinové inkubaci 48,94 %. Vztah obou metod je dán polynomickou regresí $y = 0{,}0184x^2 - 0{,}1496x - 2{,}3676$ ($R = 0{,}9606$, $R^2 = 0{,}9227$, $P < 0{,}05$).

# Abstract

The objective of this bachelor's thesis was to determine digestibility of maize silage fiber by two different methods. Maize silage is the most important roughage in the diet of lactating dairy cows. The digestibility of the fiber is one of the factors which significantly affect their performance. Fiber in the diet of dairy cows is a very important nutriment, formed by carbohydrates, comprising of many components. Neutral detergent fiber (NDF) includes all components of the cell wall, such as hemicellulose, cellulose and lignin. The determination of NDF and its digestibility is an essential characteristic of fiber in the diet. The NDF digestibility was measured by two methods: the in vitro method (incubation times 0, 2, 4, 8, 24 and 48 hours) and the in situ method (incubation times 0, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hours ), where the samples were incubated in the rumen of dairy cows. For these purposes dry Holstein cow fitted with ruminal cannula was used. The NDF digestibility determined by the in vitro method reached 40.16 % after 48 hours

of incubation. After exclusion of incubation times of 2 and 4 hours, the digestibility was increasing linearly. The NDF digestibility, determined by the in situ method, reached 48,94 % after 48 hours of incubation. The relationship between these two methods is described by a polynomial regression $y = 0.0184\ x^2 - 0.1496\ x - 2.3676$ ($R = 0{,}9606$, $R^2 = 0{,}9227$, $P < 0.05$).

**Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta**
**Ústav biochemie**
*Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ*

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Student(ka): Jitka Hutařová

Název tématu: Porovnání in vitro a in situ metod pro hodnocení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže u dojnic

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ing. Ludmila Křížová, Ph.D.

Odborný konzultant:

Datum zadání bakalářské práce: září 2013

Datum odevzdání bakalářské práce: 19. 5. 2014

*Zpracovatel i vedoucí bakalářské práce berou na vědomí, že práce musí obsahovat i experimentální část.*

| | | |
|---|---|---|
| Hutařová | | |
| zpracovatel bakalářské práce | vedoucí bakalářské práce | ředitel Ústavu biochemie |

V Brně, dne 19. března 2014

**Zásady pro vypracování:**
Cílem práce je provést stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodami in vitro a in situ a porovnat výsledky dosažené těmito metodami mezi sebou. Při metodě in situ budou vzorky kukuřičné siláže v nylonových sáčcích inkubovány v bachoru ruminálně kanylovaných dojnic po dobu 0, 2, 4, 8, 12, 24 a 48 hodin. Při metodě in vitro budou vzorky inkubovány v laboratorních podmínkách v tubách s pufrovanou bachorovou tekutinou ve stejných časových intervalech. Po inkubaci bude ve vzorcích stanoven obsah vlákniny (NDF) na přístroji Fibertec.

**Struktura práce:**

1. Úvod (cca 10 stran):
    a. stručný popis fyziologie trávení u dojnic
    b. vláknina a její význam ve výživě dojnic
    c. metody používané pro stanovení stravitelnosti vlákniny v objemných krmivech pro dojnice a jejich zhodnocení
    d. kukuřičná siláž jako základní složka krmné dávky dojnic – charakteristika, obsah živin, hodnocení fermentačního procesu
2. Materiál a metody (cca 6 stran):
    a. popis stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in situ
    b. popis stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in vitro
    c. popis stanovení obsahu vlákniny ve vzorcích krmiv na přístroji Fibertec
    d. statistické vyhodnocení naměřených dat
3. Výsledky a diskuse (cca 15 stran):
    a. základní charakteristika vzorku kukuřičné siláže použitého pro stanovení stravitelnosti vlákniny metodami in situ a in vitro (obsah živin, charakteristika fermentace)
    b. stanovení stravitelnosti sušiny a vlákniny metodou in situ – průměrné hodnoty v jednotlivých inkubačních časech, grafické vyjádření
    c. stanovení stravitelnosti vlákniny metodou in vitro – průměrné hodnoty v jednotlivých časech korigované na hodnoty z 0 h, grafické vyjádření
    d. výpočet regresního vztahu mezi hodnotami stravitelnosti vlákniny zjištěnými metodou in situ a in vitro, grafické vyjádření včetně uvedení regresní rovnice
4. Závěr (cca 1 strana)
5. Seznam použité literatury

**Seznam odborné literatury:**

Di Marco O.N., Aello M.S., Nomdedeu M., Van Houtte S. (2002): Effect of maize crop maturity on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). Anim. Feed Sci. Technol. 99, 37–43.

Gosselink J.M.J., Dulphy J.P., Poncet C., Jailler M., Tamminga S., Cone J.W. 2004. Prediction of forage digestibility in ruminants using in situ and in vitro techniques Anim Feed Sci Technol, 115, 227-246.

Gosselink J.M.J., Dulphy J.P., Poncet C., Tamminga S., Cone J.W. 2004 A comparison of in situ and in vitro methods to estimate in vivo fermentable organic matter of forages in ruminants. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences, 52, 29–45

Jambor V., Vosynková B. Vláknina jako zdroj energie v kukuřici. Dostupné na http://www.nutrivet.cz/nutrivet/clanky/2.pdf

Jančík F., Rinne M., Homolka P., Čermák B., Huhtanen P. (2011): Comparison of methods for forage digestibility determination. Anim Feed Sci Technol. 169: 11– 23

Jelínek P., Koudela K., Doskočil J., Illek J., Kotrbáček V., Kovářů F., Kroupová V., Kučera M., Kudláč E., Trávníček J., Valent M. (2003). Fyziologie hospodářských zvířat. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 414 p.

Jensen C., Weisbjerg M.R., Nørgaard P., Hvelplund T. (2005): Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 118, 279–294

Koukolová V., Homolka P. (2008). Hodnocení stravitelnosti neutrálně-detergentní vlákniny ve výživě skotu. Metodika. 29 p.

Koukolová V., Homolka P., Kudrna V. (2010): Vliv strukturních sacharidů na bachorovou fermentaci, zdraví zvířat a kvalitu mléka. Vědecký výbor výživy zvířat, Praha, květen 2010, 41 str.

Koukolová V., Weisbjerg M. R., Hvelplund T., Lund P., Čermák B. (2004). Prediction of NDF degradation characteristics of grass/clover forages based on laboratory methods. J. Anim. Feed Sci. 13, 691-708

Richter, M., Třináctý, J., Křížová, L. (2013): Kapitola 5. Systém hodnocení krmiv dle INRA (2007) a analýzy krmiv. s. 64-78. In: Třináctý J. *et al*. (Eds) *Hodnocení krmiv pro dojnice*. AgroDigest s.r.o., Pohořelice, 592 s.

Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two stages technique for the in vitro digestion of forage crops. Br. J. Grassland Soc. 18, 104–111.

Třináctý, J., Richter, M., Křížová, L. (2013): Kapitola 4. Systém hodnocení krmiv dle NRC (2001) a analýzy krmiv. s. 28-62. In: Třináctý J. *et al*. (Eds) *Hodnocení krmiv pro dojnice*. AgroDigest s.r.o., Pohořelice, 592 s. ISBN 978-80-260-2514-6

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Zeman L., Doležal P., Kopřiva A., Mrkvicová E., Procházková J., Ryant P., Skládanka J., Straková E., Suchý P., Veselý P., Zelenka J. (2006). Výživa a krmení hospodářských zvířat, 360 p.

# Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Ing. Ludmile Křížové, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Richterovi za pomoc při zpracování výsledků. Poděkování patří i rodině za podporu při studiu.


# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 14. května 2014 ……

Jméno Příjmení

# Obsah

Seznam zkratek ..... 13
1 Úvod ..... 14
1.1 Fyziologie trávení u skotu ..... 14
1.1.1 Charakteristika žaludku přežvýkavců: ..... 16
1.1.2 Mikrobiální osídlení předžaludku: ..... 17
1.2 Vláknina a její význam ve výživě dojnic ..... 18
1. 3 Metody používané pro stanovení stravitelnosti vlákniny v objemných krmivech pro dojnice a jejich zhodnocení ..... 22
1.3.1 Metoda in vivo ..... 23
1.3.2 Metoda in situ ..... 23
1.3.3 Metoda in vitro ..... 24
1.4 Kukuřičná siláž jako základní složka krmné dávky dojnic – charakteristika, obsah živin, hodnocení fermentačního procesu ..... 24
2 Cíl práce ..... 27
3 Materiál a metody ..... 28
3.1 Analytická část ..... 28
3.1.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie a vzorky ..... 28
3.1.1.1 Používané přístroje ..... 28
3.1.1.2 Používané pomůcky ..... 28
3.1.1.3 Používané chemikálie ..... 28
3.1.1.4 Používané vzorky ..... 29
3.2 Experimentální část ..... 29
3.2.1 Stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in situ ..... 29
3.2.2 Stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in vitro ..... 30
3.3 Statistické vyhodnocení dat ..... 31
4. Výsledky a diskuze ..... 32
4. 1 Charakteristika sledovaného krmiva ..... 32
4.2 Stanovení degradovatelnosti sušiny a NDF kukuřičné siláže metodou in situ ..... 32
4.3 Stanovení degradovatelnosti NDF kukuřičné siláže metodou in vitro ..... 34

4.4 Porovnání in vitro a in situ metod pro stanovení degradovatelnosti NDF kukuřičné siláže ..... 36
4. 5 Vyhodnocení regrese ..... 37
5 Závěr ..... 39
6 Seznam použité literatury ..... 40

## Seznam zkratek

ADF – acido-detergentní vláknina

ADL – acido-detergentní lignin

BNVL – bezdusíkaté látky výtažkové

BT – bachorová tekutina

CF – hrubá vláknina

KD – krmná dávka

ME – metabolizovatelná energie

NDF – neutrálně detergentní vláknina

NDFD – stravitelnost neutrálně detergentní vláknina

NEL – netto energie laktace

NL – dusíkaté látky

TMK – těkavé mastné kyseliny

# 1 Úvod

## 1.1 Fyziologie trávení u skotu

Výživa přežvýkavců významně ovlivňuje produkci bakteriální biomasy v bachoru, kvalitu bachorové fermentace, zdravotní stav a užitkovost zvířat (Koukolová a Homolka, 2008). Příjem krmiva u skotu probíhá hlavně pomocí drsného jazyka, pysky jsou málo pohyblivé a skot je při příjmu krmiva prakticky nevyužívá. Příjem tekutin probíhá za pomocí pysků, jazyka a poklesem dolní čelisti. V dutině ústní dochází k mechanickému a chemickému zpracování potravy. Mechanické zpracování (žvýkání) zajišťují zuby, čelisti, žvýkací svaly a jazyk. Potrava je zpracována povrchně a nedokonale. Při tomto procesu se potrava rozmělňuje, obohacuje slinami a vzniká sousto, to je pak připraveno k polknutí. Sliny zvlhčují potravu, usnadňují její žvýkání, podílejí se na vytváření sousta a usnadňují jeho polykání. Obsažená alfa-amyláza zajišťuje štěpení škrobu. Sliny se významně podílejí na hospodaření s dusíkem, část močoviny z ornitinového cyklu se vylučuje slinami a slouží bachorovým mikroorganismům jako zdroj dusíku pro syntézu aminokyselin; obsahují také parotin, ten se podílí na regulaci vápníku v těle (Jelínek a kol., 2003). Sliny mají antibakteriální a antivirový účinek.

Při polykání je sousto dopraveno z dutiny ústní hltanem a jícnem většinou do čepce. Čepec se pak smršti a dopraví tak krmivo do bachoru. Posun jícnem je zajištěn peristaltickými pohyby. V průběhu fylogenetického vývoje se trávicí trakt přežvýkavců dokonale přizpůsobil k využívání rostlinného krmiva bohatého na celulózu, došlo k vyvinutí předžaludku, v němž probíhá trávení celulózy a ostatních živin prostřednictvím enzymů mikrobiálního původu (Jelínek a kol., 2003).

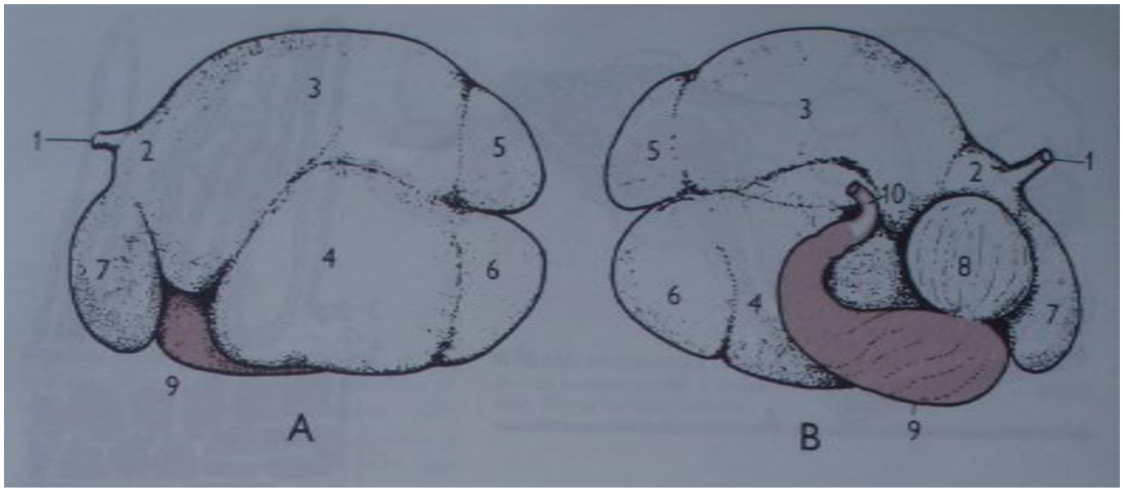
Přežvýkavci mají žaludek složený. Vlastnímu žaludku – slezu (abomasus) předchází předžaludek, který se skládá z bachoru (rumen), čepce (reticulum) a knihy (omasus) (viz. obr. č. 1). Bachor vyplňuje celou levou polovinu břišní dutiny a z celkového objemu žaludku zaujímá 80 %. Po přijetí krmiva do předžaludku nastává údobí klidu (u skotu 20 – 70 minut), poté se potrava vrací zpět do dutiny ústní k důkladnému zpracování. Tento proces se nazývá přežvykování (ruminace) a zahrnuje: 1. rejekci (vyvrhování sousta do dutiny ústní), 2. přežvykování rejekovaných soust a jejich proslinění, 3. polykání (Jelínek a kol., 2003).

Při přežvykování vzniká velké množství plynů, které je odváděno procesem zvaným krkání. Podle Jelínka a kol., (2003) se za normálních okolností předžaludek přežvýkavců nikdy zcela nevyprazdňuje a v jeho ventrálním bachorovém vaku vždy zbývá část obsahu z předchozího krmení a nově přijímané krmivo se na něj vrství. Lehčí objemné krmivo se nachází v dorzálním bachorovém vaku. Část tekutého obsahu se přelévá do dorzálního vaku a do čepce, z něhož trávenina prochází dále trávicím ústrojím.

Ze slezu přechází trávenina do tenkého střeva, kde se mísí s pankreatickou šťávou, střevní šťávou a žlučí. Pankreatická šťáva neutralizuje kyselý chymus a vytváří alkalické prostředí pro činnost střevních enzymů, které jsou nutné pro štěpení tuků, sacharidů, peptidů a jiných látek. Střevní šťáva se též podílí na neutralizaci chymu a obsahuje enzymy štěpící jak bílkoviny, tak i sacharidy, tuky a nukleové kyseliny. Žluč je produkována jaterními buňkami a slouží k trávení a vstřebávání tuků, jeho lehce alkalické pH napomáhá neutralizovat kyselé pH žaludeční traveniny, umožňuje resorpci vitamínů rozpustných v tucích, urychluje trávení, má baktericidní účinky. Žluč má také detoxikační a exkreční funkci, odstraňuje z organismu některé látky, jako jsou např. toxické látky, cholesterol, Fe. Chymus je segmentačními, kývavými a peristaltickými pohyby posouván do tlustého střeva.

Při trávení v tlustém střevě dochází ke vstřebávání vody a k syntéze vitamínů skupiny B a vitamínu K bakteriemi. V tlustém střevě se štěpí maximálně 40 % vlákniny, protože až 80 % se rozkládá v předžaludku (Jelínek a kol., 2003). Nestrávené bílkoviny se rozkládají bakteriálními enzymy na aminokyseliny a amoniak. Po zahuštění chymu v tlustém střevě a formování výkalů následuje defekace.

Obrázek č. 1: Žaludek a předžaludek skotu. A – levá strana, B – pravá mediální strana. 1 – jícen, 2 – bachorová předsíň, 3 – dorzální bachorový vak, 4 – ventrální bachorový vak, 5 – dorzální a 6 – ventrální slepý vak, 7 – čepec, 8 – kniha, 9 – slez, 10 – dvanáctník. Žaludek je vyznačen barevně (Marvan a kol., 2011).




### 1.1.1 Charakteristika žaludku přežvýkavců:

Funkcí předžaludku je hromadění potravy a fermentace rostlinné potravy za účasti mikroorganismů. Ve slezu probíhá vlastní trávení za přítomnosti žaludečních šťáv.

a) Bachor (rumen): tato část má největší význam z předžaludku. Vyznačuje se stálou teplotou (39 °C), pH 5,7 – 7,3, většinou se však udržuje kolem pH 6,2 – 6,8, objem 70 – 130 l, zaujímá 80 % z celkového objemu žaludku a celou levou polovinu břišní dutiny, po naplnění zasahuje i na pravou část. Z anatomického hlediska se dělí na dorzální a ventrální vak. Sliznice je tvořena až 1 cm vysokými papilami, zvětšujícími vnitřní povrch stěny bachoru cca až na sedminásobek. V bachoru dochází k míchání potravy, posouvání potravy a mechanickému narušení krmiva. Trávení celulózy je umožněno symbiotickými mikroorganismy, základní živiny jsou přeměněny v metabolické produkty. Malé částice (např. šrotované krmivo, obiloviny…) jsou usazeny na spodní části bachoru, zatímco větší části krmiva (stébla trav, sušené píce, slámy apod.) "plavou" v horní části bachoru.

b) Čepec (reticulum): objem 6 – 10 l, pH 6,1 – 7, tvoří až 5 % objemu žaludku. Čepec je nejníže položená část žaludku, vak kulovitého tvaru, kde dochází k mísení potravy a množení mikroorganismů.

c) Kniha (omasum): tvaru koule o objemu 9 – 15 l, pH 5,7 – 6,8, zaujímá 7 – 8 % celkového objemu. V knize dochází k drcení a roztírání potravy, absorpci tekutin a zahušťování tráveniny. Také se zde reguluje přemisťování krmiva mezi čepcem a slezem.

d) Slez (abomasum): neboli vlastní žaludek, objem 11 – 22 l, pH 1,5 – 3, tvoří 7 – 8 % celkového objemu žaludku. Sliznice slezu produkuje žaludeční šťávy, které obsahují trávicí enzymy pepsin, chymosin, žaludeční lipázu a kyselinu chlorovodíkovou. V žaludku se potrava skladuje, promíchává se sekrety a částečně tráví. Dochází k enzymatickému trávení potravy a mikroorganismů. Ve slezu se potrava zdržuje jen asi 30 – 60 minut (Jelínek a kol., 2003).

### 1.1.2 Mikrobiální osídlení předžaludku:

Fermentace probíhající v předžaludku je způsobena činností mikroorganismů. Mezi symbiotické mikroorganismy patří především bakterie, nálevníci a bachorové anaerobní houby, přítomny jsou i viry (bakteriofágy) žijící v bachorových bakteriích. Mikroorganismy vytvářejí asi 30 l plynu za hodinu, který je odstraněn krkáním. Mikrobiální biomasa, trávená ve slezu a střevě, je využívána jako zdroj energie, bílkovin a jiných živin. Poměrně stabilní podmínky bachorového prostředí zajišťují rozvoj mikroorganismů, z nichž nejdůležitější je pH (5,5 – 7,0), teplota (39 – 41 °C) a anaerobní prostředí. Počet a druhové zastoupení mikroorganismů ovlivňuje řada faktorů, např. frekvence krmení, charakter KD, substrát přicházející do bachoru s potravou.

Bakterie: anaerobní i fakultativně anaerobní druhy (až 50 % bakterií přichycených na stěnu předžaludku, spotřebovávají kyslík a zajišťují tak anaerobní prostředí v předžaludku), tvoří hlavní složku mikrobiální populace a jsou nepostradatelné. V 1 ml obsahu předžaludku je $10^9$ – $10^{12}$ bakterií, a to více než 60 druhů (Jelínek a kol., 2003). Maximální počet vyskytujících se bakterií je 2 – 6 hodin po nakrmení. Výskyt daného druhu bakterie a jejich počet závisí na krmné dávce a mění se i v průběhu dne, roku. Bakterie vytvářejí polysacharidová vlákna glykokalyxy, jimiž se mohou přichytit na povrch využívaného substrátu. Glykokalyxy jednotlivých bakterií mohou vytvářet kanálky, kterými se bakteriální enzymy přesunují směrem k substrátu, opačným směrem pak proudí živiny důležité pro bakteriální buňku. Mezi adherentní buňky patří také bakterie přichycené na stěnu předžaludku. Zbývající druhy bakterií jsou pak volně rozptýlené v bachorové tekutině. K nejvýznamnějším patří zejména bakterie celulolytické (*Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Bacteroides succinogenes*), hemicelulolytické (*Butyrivibrio fibrisolvens*), pektinolytické (*Treponema saccharophilum*),

amylolytické, metanogenní (*Methanobrevibacter ruminantium, Methanobacterium formicicum*), proteolytické, urealytické (*Megasphaera elsdenii*), bakterie utilizující kyseliny (*Megasphaera elsdenii*) a lipidy. V předžaludku se nachází také bakterie syntetizující vitaminy.

Nálevníci: přísně anaerobní, přibližně až 60 druhů nálevníků, vyskytují se především dvě podtřídy: *Holotricha* (rod *Isotricha*, *Dasytricha*) a *Entodiniomorpha* (rod *Diplodinium*, *Entodinium*, *Epidinium*). Jsou velmi citlivá na snížení pH pod 5,5 a zvýšení nad 8,0, jejich množství se pohybuje v řádu od $10^4$ do $10^7$/ml BT. Protozoa jsou náročnější na živiny než bakterie a po třídenním až šestidenním hladovění většinou z bachoru vymizí (Jelínek a kol., 2003). Zdrojem energie jsou různé sacharidy. Tím, že nálevníci spotřebovávají rozpustné cukry a škrob, nutí bakterie k trávení celulózy a procento stravitelnosti tohoto polysacharidu se zvyšuje (Jelínek a kol., 2003). Hlavními produkty fermentace jsou kyselina octová, máselná, mléčná, $CO_2$ a $H_2$.

Bachorové anaerobní houby: původně byly považovány za bičíkovce, na fermentačních procesech se významně nepodílejí, řadí se do třídy *Chytridiomycetes* (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis*, *Orpinomyces joyonii* a *Piromonas communis*), jsou trvalými obyvateli bachoru a rozmnožují se pomocí nepohlavních spor. Aktivně se podílejí na trávení vlákniny (kolonizují rostlinné tkáně a mají velmi vysokou celulolytickou a hemicelulolytickou aktivitu), pomocí celuláz rozrušují rostlinná pletiva zevnitř.

## 1.2 Vláknina a její význam ve výživě dojnic

Vláknina je nestravitelná část potravy, která je získávána z rostlin. Obsahuje složku rozpustnou (hlavně pektiny a β-glukany) a nerozpustnou (především celulóza a lignin). Trávicí trakt přežvýkavců (na rozdíl od lidského) je však uzpůsoben tuto složku trávit za pomoci symbiotických mikroorganismů.

Vláknina obsahuje: neškrobové polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, pektiny, β-glukany, chitin), nestravitelné oligosacharidy (inulin), složky příbuzné sacharidům – rezistentní škroby, modifikované celulózy, syntetické deriváty polysacharidů (karboxymethylcelulóza, methylcelulóza, dextriny) a lignin a doprovodné látky (kutin, třísloviny).

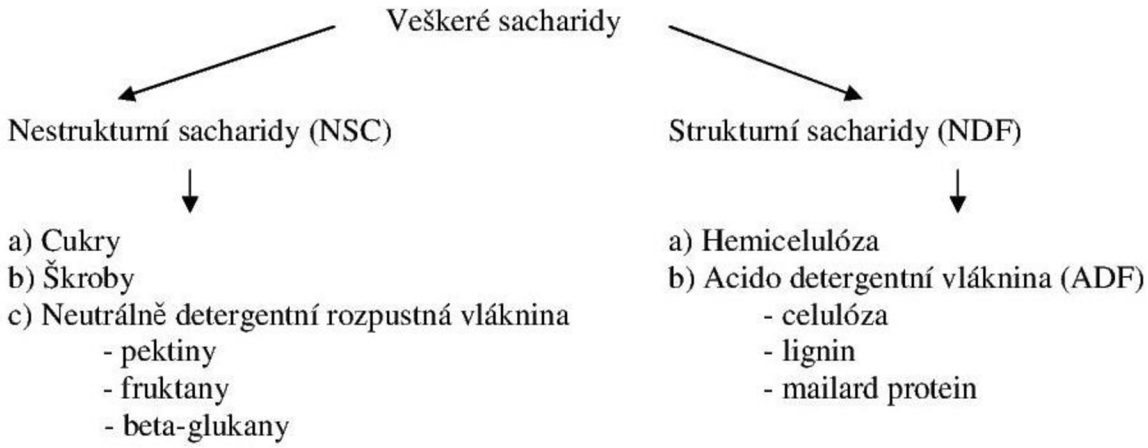
Hrubá vláknina – nerozpustná vláknina, zbytek vzorku potravy po působení detergentního roztoku a horkých kyselých a alkalických roztoků.

ADF (acido-detergentní vláknina) – charakterizuje obsah ligninu a celulózy v buněčné stěně. Její hodnota se dá použít jako velmi hrubý odhad stravitelnosti organické hmoty kukuřice.

NDF (neutrálně-detergentní vláknina) – její hodnota zahrnuje všechny složky buněčné stěny, tedy hemicelulózu, celulózu a lignin. Stanovení NDF je základní charakteristikou vlákniny v krmivu. Jedná se téměř o veškerou vlákninu, která je zčásti stravitelná.

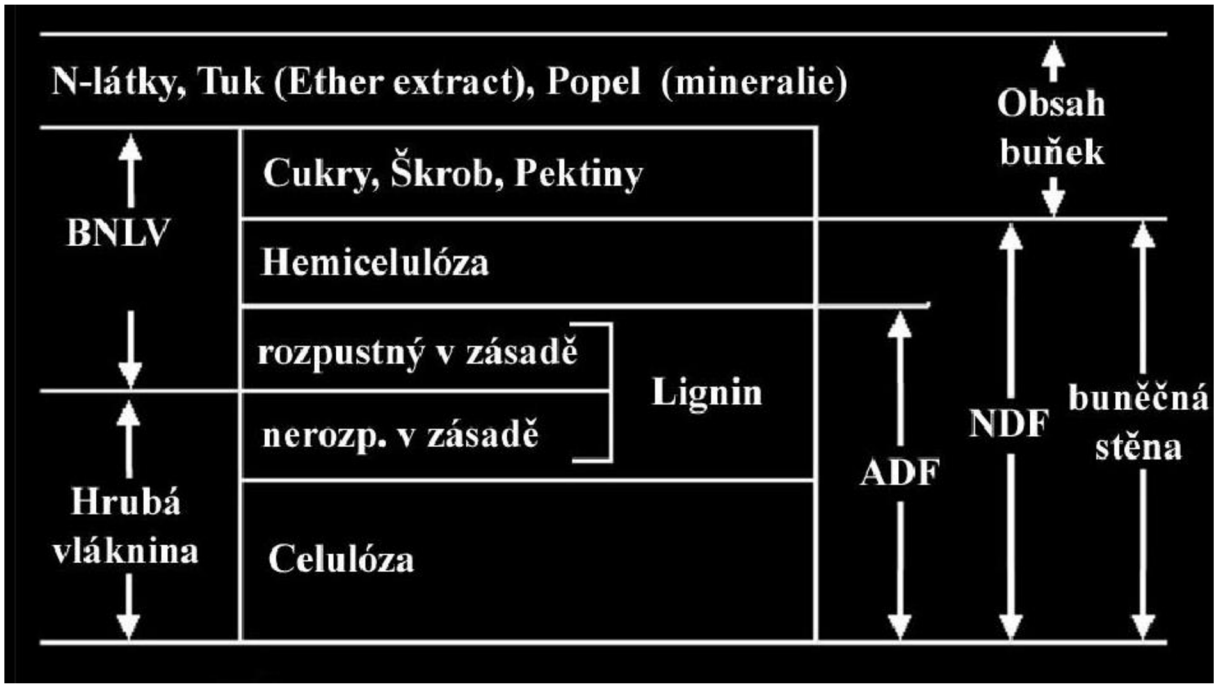
Na následujícím schématu (obrázek č. 2) je zobrazeno rozdělení veškerých sacharidů. Mezi strukturní sacharidy (NDF) je řazena hemicelulóza a ADF. Nestrukturní sacharidy zahrnují cukry, škroby a neutrálně detergentní rozpustnou vlákninu.

Obrázek č. 2: Teoretické členění sacharidových frakcí podle Van Sauna a Koukala, 2003; citace Koukolová a kol., 2010.




Neutrálně detergentní vláknina se získá po hydrolýze píce v neutrálním prostředí laurylsulfátu, je tvořena celulózou, hemicelulózou a ligninem (viz. obrázek č. 3).

Obrázek č. 3: Hodnocení krmiv podle způsobu stanovení jednotlivých frakcí vlákniny (Jambor a Vosynková, 2009)




Optimální koncentrace hrubé vlákniny v krmné dávce dojnic je 22 %, při vysoké užitkovosti 17 %, minimální obsah je 14 % (snížení ruminace a peristaltiky), maximální obsah je 28 % (při vyšším obsahu klesá stravitelnost a užitkovost) (Novotná a Kobes, 2013). Obsah NDF v píci se pohybuje v rozpětí 250 – 500 $g \cdot kg^{-1}$, optimum v píci je pro přežvýkavce v rozpětí 290 – 390 $g \cdot kg^{-1}$(Novotná a Kobes, 2013).

Podle Jambora a Vosynkové (2009) při zjišťování stravitelnosti vlákniny siláže byla vždy snížená užitkovost dojnic způsobena nižší stravitelností vlákniny. Při zvyšování koncentrace energie v krmné dávce prostřednictvím koncentrovaných krmiv dochází k výraznému snížení podílu vlákniny v bachoru, což má za následek dysfunkci bachoru a následné snížení fermentace organických živin v bachoru, hlavně klesá produkce mikrobiální bílkoviny, dochází také ke zdravotním problémům, které způsobuje acidóza dojnic v různých formách (Jambor a Vosynková, 2009).

Na produkci a kvalitu mléka mají vliv optimální podmínky pro bachorovou fermentaci, NDF a řada dalších faktorů. Podíl jednotlivých složek mléka není konstantní, k největším změnám dochází v obsahu mléčného tuku, naopak menší změny jsou v obsahu

bílkovin a k nejmenším dochází v obsahu laktózy a většiny minerálních látek v mléce obsažených (Koukolová a Homolka, 2008).

Prekursorem mléčného tuku v mléčné žláze je kyselina octová (tvořena v průběhu bachorové fermentace), dále pak kyselina máselná a hydroxymáselná. Pro syntézu mléčného tuku jsou využívány i mastné kyseliny obsažené v krmivech. Dostatečné množství efektivní vlákniny pozitivně stimuluje produkci slin, žvýkání, přežvykování a udržování optimálních hodnot pH bachorového obsahu - tím vším zabraňuje poruchám bachorové fermentace (Mertens, 2000; citace Koukolová a Homolka, 2008). Efektivnost NDF (účast NDF na udržení správné motoriky bachoru) je ovlivňována velikostí částic, stupněm lignifikace, hydratací buněčných stěn a zastoupením v jednotlivých skupinách krmiv (Zeman a kol., 2006). U mladého travního porostu, jenž má nízký obsah hrubé vlákniny a vysoký obsah rozpustných sacharidů, může dojít k vytváření menšího množství kyseliny octové, to má za následek omezení syntézy mléčného tuku.

V tabulce č. 1 jsou uvedeny doporučované obsahy živin podle McCullough, 1994 (citace Koukolová a Homolka, 2008).

Tabulka č. 1: Optimální úroveň živin v KD dojnic v průběhu mezidobí (McCullough, 1994; citace Koukolová a Homolka, 2008).

| Živiny (%) | Období laktace | | | Období stání na sucho | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Rané | Střední | Pozdní | Počátek | Před otelením |
| NL | 17 - 20 | 15 - 17 | 14 - 15 | 12 | 14 - 15 |
| Degradovatelné NL | 60 - 65 | 62 - 67 | 65 - 78 | 65 - 70 | 62 - 68 |
| Nedegradovatelné NL | 22 - 40 | 33 - 37 | 30 - 36 | 30 - 35 | 32 - 38 |
| Rozpustné NL (% z NL) | 30 - 35 | 30 - 37 | 30 - 50 | 32 - 35 | 31 - 34 |
| Vláknina (ADF) | 19 - 21 | 20 - 23 | 21 - 24 | 26 - 30 | 25 - 28 |
| Vláknina (NDF) | 30 - 33 | 30 - 36 | 30 - 34 | 40 - 45 | 37 - 40 |
| NDF z píce | 20 - 24 | 20 - 25 | 21 - 25 | 32 - 36 | 28 - 33 |

## 1. 3 Metody používané pro stanovení stravitelnosti vlákniny v objemných krmivech pro dojnice a jejich zhodnocení

Stanovení stravitelnosti živin v krmivech patří, kromě stanovení chemického složení krmiva, k ukazatelům, které nám umožňují hodnotit kvalitu a nutriční hodnotu krmiv (Koukolová a kol. 2010).

Stravitelnost živin může být stanovena několika metodami: bilančními metodami in vivo (Schiemann, 1981; Vencl, 1985), in situ či in sacco metodami (Ørskov a McDonald, 1979), laboratorními metodami (in vitro) (Tilley a Terry, 1963; Tománková a Homolka, 1995, 1999, 2002; Koukolová a kol., 2004).

Metody in vitro se jeví perspektivní a snáze proveditelné v provozních podmínkách krmivářských laboratoří, protože jsou časově i finančně méně náročné a méně pracné ve srovnání s in vivo a in situ metodami. Nicméně u metod in vitro musíme počítat s určitou variabilitou výsledků, která úzce souvisí s odlišností jednotlivých metodických postupů, a proto je nezbytné kalibrovat přesnost in vitro hodnot s hodnotami in vivo (Míka a kol., 1997; Tománková a Homolka, 1997) a in situ (Aufrére a kol., 1991; Michalet-Doreau a kol., 1992; Mertens, 1993) pro přesnou predikci hodnot (Koukolová a kol., 2010).

Hlavním společným znakem metod predikujících stravitelnost krmiv je napodobení trávicích pochodů živého zvířete (Koukolová a Homolka, 2008).

V tabulce č. 2 jsou uvedeny hodnoty parametrů bachorového prostředí, které by měla metoda in vitro napodobit.

Tabulka č. 2: Parametry bachorového prostředí: fyziologické rozmezí dle Hofírek a Dvořák (2009), Křížová a kol. (2011) a Marden a kol. (2005)

| | | |
|---|---|---|
| pH | | 6,2 – 6,8 |
| amoniak | | 4,0 – 12 mmol/l |
| TMK | celkem | 80 – 120 mmol/l |
| | kyselina octová | 55 – 65 % (48 – 72 mmol/l) |
| | kyselina propionová | 15 – 25 % (16 – 24 mmol/l) |
| | kyselina máselná | 10 – 15 % (9 – 17 mmol/l) |
| kyselina mléčná | | 0,0 – 3,3 mmol/l |
| Počet nálevníků | běžná KD | $2 – 4 \cdot 10^5$ nálevníků/ml BT |
| | KD s vysokým podílem sena | až $6,0 \cdot 10^5$ nálevníků/ml BT |
| redox - potenciál | | -185 až -228 mV |

### 1.3.1 Metoda in vivo

Metoda in vivo je bilanční metoda prováděná na zvířatech, kterou se zjišťuje úbytek živin v krmivu po jeho průchodu trávicím ústrojím. Při této metodě dochází k příjmu definovaného množství krmiva a ke kvantitativnímu sběru moči a výkalů během bilančního období. Vlastní pokus se skládá z přípravné a hlavní (odběrové) periody pokusného období. Zvířata musí být předem navyklá na bilanční ustájení, zařízení a pomůcky ke sběru výkalů a moči. Po návykovém (přípravném) období je zvířatům podáváno přesně odvážené množství krmiva, poté je zjišťováno množství přijatého krmiva a množství vyloučených výkalů. Následuje stanovení živin v krmivech a stanovení nestravitelných živin ve výkalech. Stravitelnost živin se vypočte jako rozdíl obsahu živin v podávaném krmivu a ve výkalech. Tato metoda je nejpřesnější, protože je prováděna přímo na živých zvířatech (reálné podmínky), ale je časově a finančně velice náročná a pracná.

### 1.3.2 Metoda in situ

Stanovení stravitelnosti in situ metodou (inkubace a trávení vzorků v nylonových sáčcích přímo v bachoru) se děje v podmínkách blízkým in vivo. Pro účely pokusu jsou

obvykle použity zaprahlé či laktující dojnice s vyvinutým bachorem a ruminální kanylou. Ke stanovení degradovatelnosti živin se používají nylonové sáčky, jejichž pórovitost (velikost ok 42 µm, Třináctý a kol., 2013) zaručuje přístup bachorové tekutiny k inkubovanému vzorku. Sáčky se vzorky jsou připevněny na nosič a vloženy do bachoru. Inkubace probíhají obvykle po dobu 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, (popř. 72) hodin (Třináctý a kol., 2013). Nylonové sáčky jsou ihned po vyjmutí z bachoru opláchnuty od hrubých nečistot, proprány v automatické pračce bez odstředění, usušeny a analyzovány na obsah živin. Stravitelnost se vypočte jako rozdíl obsahu živin ve vzorku před inkubací a po inkubaci.

### 1.3.3 Metoda in vitro

Metoda in vitro spočívá v napodobení podmínek bachorového prostředí působením bachorové tekutiny na krmivo v laboratorním prostředí. Využitím této metody v laboratořích a jejím zdokonalením se zabývá mnoho prací (např. Tilley a Terry, 1963; Setala a kol., 1984; Antoniewicz a kol., 1992; Tománková a Homolka, 1995; Koukolová a kol., 2004). Princip této metody spočívá v tom, že vzorek krmiva je zalit pufrovanou bachorovou tekutinou, aby bylo zachováno stálé pH bachorové tekutiny po celou dobu inkubace vzorku. Anaerobního prostředí se dosáhne vyfouknutím vzduchu oxidem uhličitým a okamžitým zazátkováním zkumavky. Stálé teploty (optimum je 39,5 ± 0,5 °C) je docíleno umístěním zkumavek ve vodní lázni v inkubátoru. V průběhu inkubace je obsah zkumavek promícháván. Po uplynutí zvoleného inkubačního intervalu je tekutina odsáta a ve zbytku krmiva je stanoven obsah NDF. Stravitelnost se vypočte jako rozdíl obsahu živin ve vzorku před inkubací a po inkubaci.

## 1.4 Kukuřičná siláž jako základní složka krmné dávky dojnic – charakteristika, obsah živin, hodnocení fermentačního procesu

Kukuřičná siláž je řazena mezi krmiva rostlinného původu a patří do krmiv objemných. Pro objemná krmiva je typická menší koncentrace živin, vyšší obsah vody a průměrný nebo vyšší obsah vlákniny. V klasifikaci podle Zemana a kol. (2006) patří kukuřičná siláž mezi objemná krmiva šťavnatá, která jsou charakteristická obsahem sušiny od 10 – 50 %, případně obsahem vody do 90 % a nízkou hodnotou pH (3,6 – 5,0). Koncentrace živin je nízká až průměrná, výživová hodnota je průměrná a velmi ovlivněna

vegetačním stádiem v období sklizně., je to především energetické krmivo. Vzniká fermentováním čerstvé hmoty. Kukuřičná siláž vzniká při procesu silážování, při kterém je řezanka z čerstvé hmoty ukládána do silážních prostor následně vzduchotěsně uzavřených. Konzervace (fermentace) probíhá za přeměny sacharidů na kyseliny, především na kyselinu mléčnou pomocí bakterií mléčného kvašení za anaerobních podmínek.

Kukuřičná siláž je nejvýznamnějším sacharidovým krmivem tvořícím až 50% podíl sušiny krmné dávky. U dojnic činí kukuřičná siláž v krmné dávce kolem 15 kg, vyšší množství, především v druhé třetině laktace, způsobuje tučnění zvířat. Denní maximum je 25 kg. U tradiční sklizně obsahuje kukuřičná siláž 30 – 32 % sušiny, v 1 kg sušiny je obsah škrobu 300 g, obsah vlákniny do 240 g (Zemana a kol., 2006).

U siláže se pH pohybuje v rozmezí 3,7 – 4,4, z kyselin obsahuje kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a kyselinu máselnou. V průběhu silážování dochází k poklesu obsahu bílkovin, stoupá obsah aminokyselin a amoniaku.

Kukuřičná siláž jako krmivo je velmi významným zdrojem energie u přežvýkavců. Zdrojem energie u kukuřičné siláže jsou uhlohydráty, tzn. vodorozpustné cukry, kukuřičný škrob, hrubá vláknina, NDF, ADF, ADL.

Obsah vlákniny v kukuřičné siláži ve formě NDF činí cca 40 %, podíl hrubé vlákniny je přibližně 20 %.

Nejlepším znakem kvalitní siláže je následná efektivní produkce mléka a dobré přírůstky živé váhy krmených zvířat, avšak produkční užitkovost hospodářských zvířat je výsledkem mnoha dalších faktorů, proto je třeba kvalitu siláže hodnotit pomocí buď organoleptických, nebo lépe rutinních laboratorních testů (Rada, 2009). Mezi doporučené laboratorní analýzy patří: stanovení sušiny, pH, stanovení kyselin a alkoholů, stanovení stravitelnosti a energetické hodnoty (ME), stanovení proteinů, organoleptické hodnocení (podle Wilkinson, 2005; citace Rada, 2009). Složení ideální siláže uvádí tabulka č. 3. Průměrný obsah živin v silážích podle Třináctého a kol. (2013) je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 3: Laboratorní analýza ideální siláže (Wilkinson, 2005; citace Rada, 2009)

| **Parametr** | **Ideální hodnota** |
|---|---|
| Sušina (g/kg) | 300 – 350 |
| pH | 4,0 – 4,2 |
| Popeloviny (g/kg sušiny) | < 80 |
| Hrubý protein (g/kg sušiny) | 150 – 170 |
| Kyselina mléčná (g/kg sušiny | 100 – 150 |
| Kyselina octová (g/kg sušiny) | 20 - 30 |
| Kyselina máselná (g/kg sušiny) | 0 |
| Etanol (g/kg sušiny) | > 10 |
| ME (MJ/kg sušiny) | > 11 |
| Amonný dusík (g/kg celkového dusíku) | < 50 |
| Aminokyselinový dusík (g/kg celkového rozpustného dusíku) | > 700 |

Tabulka č. 4: Průměrný obsah živin v kukuřičné siláži v roce 2012 (Třináctý a kol., 2013)

| | |
|---|---|
| Sušina (%) | 33,49 |
| NL (% sušiny) | 8,83 |
| NEL (MJ/kg sušiny) | 6,29 |
| Vláknina (% sušiny) | 19,11 |
| ADF (% sušiny) | 22,47 |
| NDF (% sušiny) | 41,86 |
| Popel (% sušiny) | 4,21 |
| pH | 3,82 |
| Kyselina mléčná (% původní hodnoty) | 1,99 |
| Kyselina octová (% původní hodnoty) | 0,68 |
| Škrob (% původní hodnoty) | 33,24 |

# 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo u vzorku kukuřičné siláže stanovit stravitelnost neutrálně-detergentní vlákniny metodou in vitro (inkubace vzorku v pufrované bachorové tekutině), metodou in situ (inkubace vzorku v bachoru dojnice) a tyto dvě metody mezi sebou porovnat.

# 3 Materiál a metody

## 3.1 Analytická část

### 3.1.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie a vzorky

#### 3.1.1.1 Používané přístroje

- analytické váhy
- mrazák
- automatická pračka
- Fibertec System M6
- Inkubátor s vodní lázní
- laboratorní sušárna s regulací teploty
- muflová pec s regulací teploty

#### 3.1.1.2 Používané pomůcky

- běžné laboratorní sklo a pomůcky
- exsikátor
- nylonové sáčky
- nosič
- frity
- zkumavky široké
- stojan na široké zkumavky

#### 3.1.1.3 Používané chemikálie

- destilovaná voda
- roztok NDF
- α-amyláza
- siřičitan sodný bezvodý

- aceton
- bachorová tekutina
- plynný $CO_2$
- pufr A (složení: $KH_2PO_4$ 10,0 g/l, $MgSO_4$ . 7 $H_2O$ 0,5 g/l, NaCl 0,5 g/l, $CaCl_2$ . 2 $H_2O$ 0,1 g/l, močovina 0,5 g/l)
- pufr B (složení: $Na_2CO_3$ 15,0 g/l, $Na_2S$ . 9 $H_2O$ 1,0 g/l)

Roztoky A a B jsou před použitím vyhřáty na 39°C a smíchány v poměru 5:1 (A:B).

#### 3.1.1.4 Používané vzorky

- standard – vojtěškové seno (vysušené a pomleté na 1 mm)
- vysušený a pomletý (1 mm) vzorek kukuřičné siláže

## 3.2 Experimentální část

### 3.2.1 Stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in situ

Metodou in situ se zjišťuje stravitelnost krmiv v bachoru dojnic s ruminální kanylou. Pro účely pokusu byly použity zaprahlé dojnice holštýnského plemene, které byly krmeny dvakrát denně krmnou dávkou složenou z vojtěškového sena a doplňkové krmné směsi, která obsahovala ječný a kukuřičný šrot v poměru 1:1. Dojnice byly na uvedenou krmnou dávku dlouhodobě navyklé.

Při této metodě byl použit jako standard vojtěškové seno a jako vzorek kukuřičná siláž (standard i vzorek byly již připraveny, tzn. usušeny a pomlety na 1 mm). Do nylonových sáčků (5 × 14 cm, vyrobené z Uhelonu T, Hedva, Moravská Třebová, ČR, velikost pórů 42 μm) byly naváženy vzorky siláže i standardu v množství 1,300 ± 0,050 g. Vzorek standardu byl navážen celkem do 5 sáčků, a to pro inkubační časy 0 (3 sáčky) a 8 hod. (2 sáčky). Vzorek siláže byl navážen vždy do tří sáčků pro inkubační interval 0, 2, 4, 8 a 12 hodin a do 5 sáčků pro intervaly 24 a 48 hodin. Všechny sáčky byly číselně označeny. Pro kontrolu byly zváženy nylonové sáčky prázdné a s navážkou. Nylonové sáčky byly připevněny na nosič (kromě sáčků s inkubačním intervalem 0 hod.), vloženy

do bachoru dojnice a inkubovány. Sáčky s inkubačním intervalem 0 hod. byly proprány studenou vodou v automatické pračce bez odstředění po dobu cca 12 minut, poté byly usušeny v sušárně při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin a zkondiciovány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. V daných časových intervalech byly sáčky vyjmuty z bachoru dojnice, opláchnuty od hrubých nečistot a zamraženy. Po ukončení pokusu byly všechny sáčky současně rozmraženy, poté proprány studenou vodou v automatické pračce bez odstředění po dobu cca 12 minut. Po vyprání byly sáčky usušeny v sušárně při teplotě 55 °C po dobu 24 hodin a zkondiciovány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté byly nylonové sáčky zváženy a jejich obsah byl sesypán do vzorkovnic podle časových intervalů (standard i siláž zvlášť).

Ke stanovení NDF (neutrálně detergentní vlákniny) byl použit přístroj Fibertec. NDF se stanovovala u všech časových intervalů vzorku siláže a u nulového intervalu standardu ve dvou opakováních. Do frit bylo naváženo od 0,500 do 0,800 ± 0,050 g podle množství vzorků ve vzorkovnicích a přidáno 0,250 – 0,400 g (poloviční množství oproti vzorku) $Na_2SO_3$. Frity se vzorkem a $Na_2SO_3$ byly připevněny na Fibertec se zpětným chladičem, zality horkým roztokem pro NDF po rysku 100 ml a bylo přidáno 50 µl α-amylázy. Po dosažení varu se roztok mírně vařil 1 hodinu, poté byl odsát a 3x promyt horkou vodou a 1x acetonem, vysušen při 55 °C po dobu 8 hodin a zvážen. Vzorky byly následně spalovány v muflové peci při 450 °C po 3 hodiny, dány do exsikátoru ke zchladnutí a poté zváženy. Z naměřených hodnot byla vypočtena stravitelnost vlákniny podle následujícího vzorce: stravitelnost NDF (%) = (NDF po inkubaci/NDF před inkubací) · 100 %, korekce se provedla na nulový inkubační interval.

### 3.2.2 Stanovení stravitelnosti vlákniny kukuřičné siláže metodou in vitro

Princip metody in vitro spočívá v napodobení podmínek působení bachorové tekutiny na krmivo v laboratorním prostředí a následném stanovení stravitelnosti vlákniny. Jako zdroj bachorové tekutiny byly použity stejné zaprahlé ruminálně kanylované dojnice jako v případě metody in situ. Bachorová tekutina byla odebrána 3 hodiny po ranním krmení do plastové láhve a dána do termoboxu (aby byla udržena stejná teplota jako v bachoru, byly do termoboxu dány předem dvě plastové láhve s teplou vodou), po rychlém převezení byla ihned zpracována.

Při této metodě byla jako vzorek použita kukuřičná siláž. Do širokých zkumavek bylo naváženo 0,500 ± 0,050 g vzorku, a to celkem pro šest časových intervalů 0, 2, 4, 8, 24, 48 hodin vždy po dvou zkumavkách, celkem tedy 12 zkumavek (byly značeny vždy podle časového intervalu a čísla a a b, např. 0a, 0b). Byl připraven roztok, který obsahoval 666 ml pufru A, 133 ml pufru B a 200 ml bachorové tekutiny. Do každé zkumavky bylo dávkováno 40 ml tohoto roztoku. Aby bylo docíleno anaerobního prostředí, byl z každé zkumavky vytěsněn vzduch oxidem uhličitým a ihned byla zkumavka zazátkována. Inkubace probíhala ve vodní lázni při teplotě 38,8 °C za občasného promíchání obsahu. Vzorek 0a a 0b byly inkubovány pouze cca 5 minut (další postup je zmíněn níže). V daných časových intervalech byly příslušné zkumavky vyjmuty, jejich obsah byl přelit do frit a roztok odsát. Do každé frity bylo přidáno 0,250 g $Na_2SO_3$. Poté byly frity upevněny na Fibertec, přelity 100 ml horkého roztoku pro NDF a bylo přidáno 50 µl α-amylázy. Pod zpětným chladičem se vzorek s roztokem mírně vařil 1 hodinu. Následně byl roztok odsát, vzorky byly 3x promyty horkou vodou a 1x acetonem, usušeny v sušárně při 55 °C po dobu 8 hodin a zváženy. Nakonec byly vzorky spalovány v muflové peci při 450 °C po 3 hodiny, ponechány v exsikátoru ke zchladnutí a opět zváženy.

### 3.3 Statistické vyhodnocení dat

Naměřená data byla zpracována do tabulek a následně převedena do grafů. Při porovnání metod byly hodnoty stravitelnosti převedeny do grafu a následně byla data zpracována pomocí softwaru Statistica 7.0.

# 4. Výsledky a diskuze

## 4. 1 Charakteristika sledovaného krmiva

Chemické složení testovaného vzorku kukuřičné siláže je uvedeno v tabulce č. 5. U kukuřičné siláže tvoří sušina 28,35 %. Obsah NL je 128,42 g/kg sušiny a obsah NDF je 393,20 g/kg sušiny. Obsah sušiny u našeho vzorku siláže byl nižší, než udává Třináctý a kol. (2013) nebo doporučuje Wilkinson (2005; citace Rada, 2009). Obsah NL byl naopak vyšší a obsah NDF nižší ve srovnání s Třináctým a kol. (2013).

Při vyhodnocování výsledků byly použity hodnoty z následující tabulky. Hodnoty základní charakteristiky kukuřičné siláže byly převzaty z databáze krmiv Agrovýzkumu Rapotín, pracoviště Pohořelice.

Tabulka č. 5: Základní charakteristika kukuřičné siláže (Agrovýzkum Rapotín, pracoviště Pohořelice)

| | Sušina % | Popel g/kg | CF g/kg | NDF g/kg | ADF g/kg | ADL g/kg | NL g/kg | Tuk g/kg | Škrob g/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kukuřičná siláž | 28,35 | 76,11 | 197,80 | 393,20 | 258,48 | 35,16 | 128,42 | 39,30 | 301,40 |

## 4.2 Stanovení degradovatelnosti sušiny a NDF kukuřičné siláže metodou in situ

Zjištěné hodnoty degradovatelnosti NDF byly korigovány 0 h inkubačním intervalem pro případný únik částeček z nylonového sáčku. Získané hodnoty degradovatelnosti NDF po in situ inkubacích byly korigovány na eventuální nežádoucí ztrátu (vyplavení) částeček krmiva z původní navážky z nylonového sáčku podle autorů Hvelplund a Weisbjerg (2000).

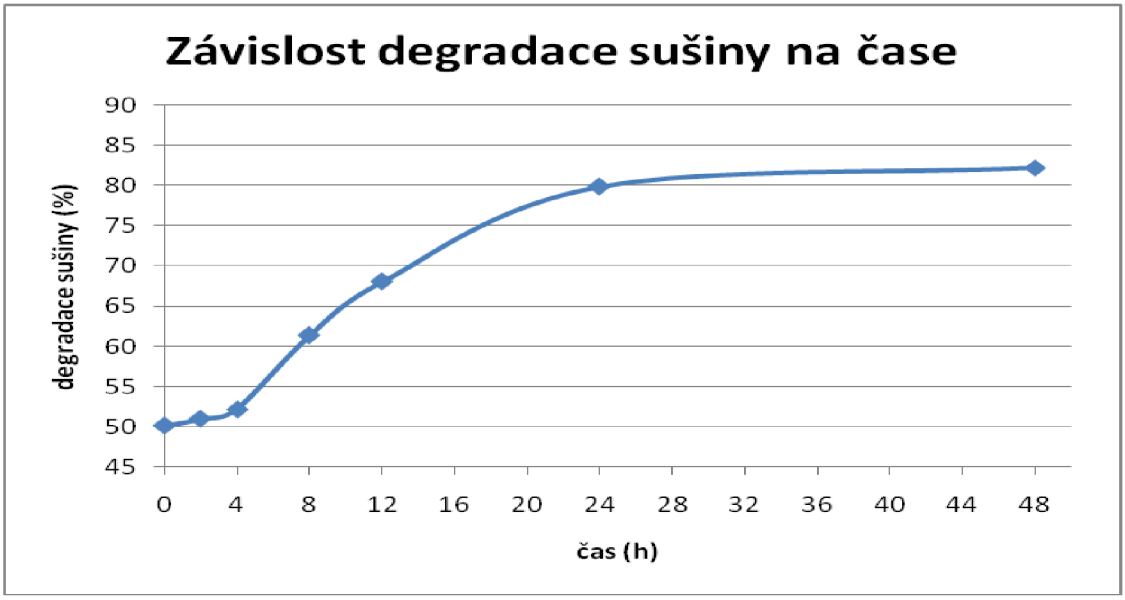
Pomocí metody in situ byla stanovena degradace sušiny kukuřičné siláže (viz. tabulka č. 6), která po 48 hod. inkubace v bachoru dosahovala 82,22 %. Námi zjištěné hodnoty jsou vyšší, než jaké uvádí např. Di Marco a kol. (2002), který po inkubaci kukuřičné siláže in situ po dobu 48 hod. zjistil stravitelnost sušiny ve výši 60 %. V časovém intervalu 4 – 24 hodin můžeme vidět rychlý nárůst degradace sušiny (viz. graf č. 1), po 24. hodině

inkubace nastává útlum (degradace sušiny mezi 24. a 48. hodinou inkubace pouze 2,34 %). Stravitelnost vlákniny metodou in situ dosahovala po 12 hodinách 20,02 %, po 24 hodinách 42,94 % (oproti inkubačnímu intervalu 12 hod. nárůst o 22,92 %) a po 48 hodinách činila 48,94 % (viz. tabulka č. 7). Hodnoty degradace NDF byly u inkubačních intervalů 2 a 4 hod. záporné. NDF degradovala nejvíce do inkubačního intervalu 24 hodin, poté nebyla degradace NDF tak výrazná (degradace NDF činila 6 % za 24 hodin v časovém intervalu 24 – 48 hodin, viz. graf č. 2).

Tabulka č. 6: Degradace sušiny pro jednotlivé inkubační intervaly

| Vzorek kukuřičná siláž | **Degradace sušiny průměr [%]** | SEM (střední chyba průměru) |
|---|---|---|
| 0 h siláž | **50,12** | 0,289 |
| 2 h siláž | **50,97** | 0,123 |
| 4 h siláž | **52,16** | 0,344 |
| 8 h siláž | **61,34** | 0,381 |
| 12 h siláž | **68,06** | 0,296 |
| 24 h siláž | **79,88** | 0,950 |
| 48 h siláž | **82,22** | 0,232 |

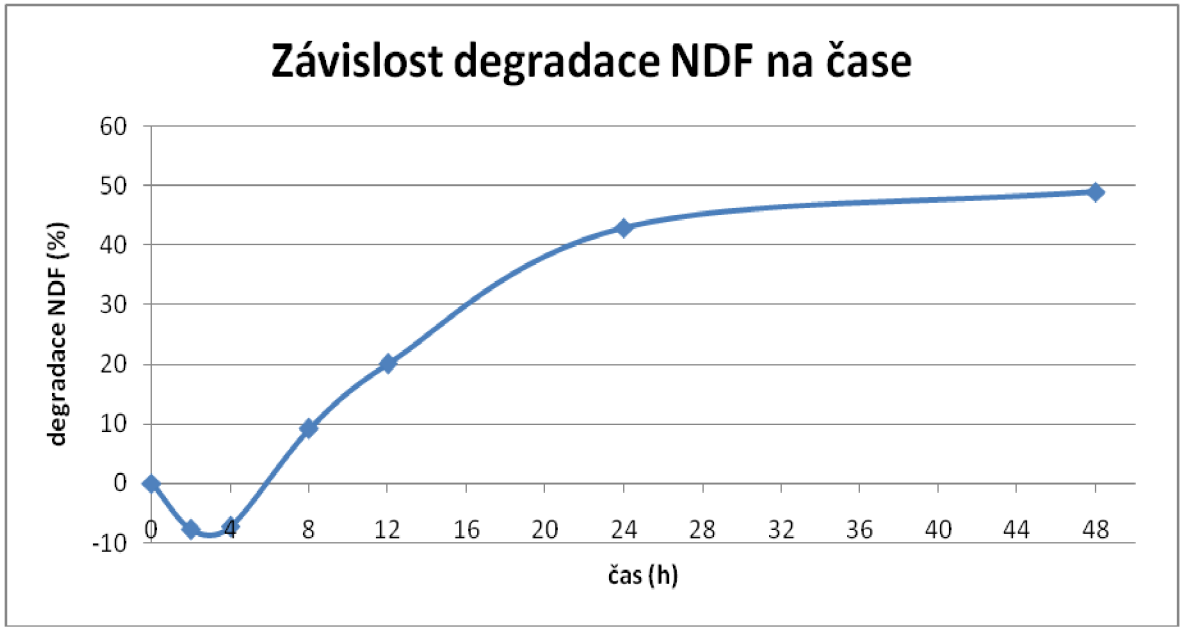
Graf č. 1: Závislost degradace sušiny na čase



Tabulka č. 7: Degradace NDF pro jednotlivé inkubační intervaly metodou in situ

| Vzorek kukuřičná siláž | Degradace NDF [%] | **Degradace NDF [%] po korekci** |
|---|---|---|
| 0 h siláž | 19,96 | |
| 2 h siláž | 12,20 | **-7,76** |
| 4 h siláž | 12,71 | **-7,25** |
| 8 h siláž | 29,10 | **9,14** |
| 12 h siláž | 39,98 | **20,02** |
| 24 h siláž | 62,90 | **42,94** |
| 48 h siláž | 68,90 | **48,94** |

Graf č. 2: Závislost degradace NDF na čase




### 4.3 Stanovení degradovatelnosti NDF kukuřičné siláže metodou in vitro

Metodou in vitro byla stanovena stravitelnost NDF po 24 hodinách inkubace 17,16 %, po 48 hodinách 40,16 % (viz. tabulka č. 8), rozdíl činí 23 %. V inkubačních intervalech 2 a 4 hodiny byly hodnoty stravitelnosti záporné. Pokud vynecháme záporné

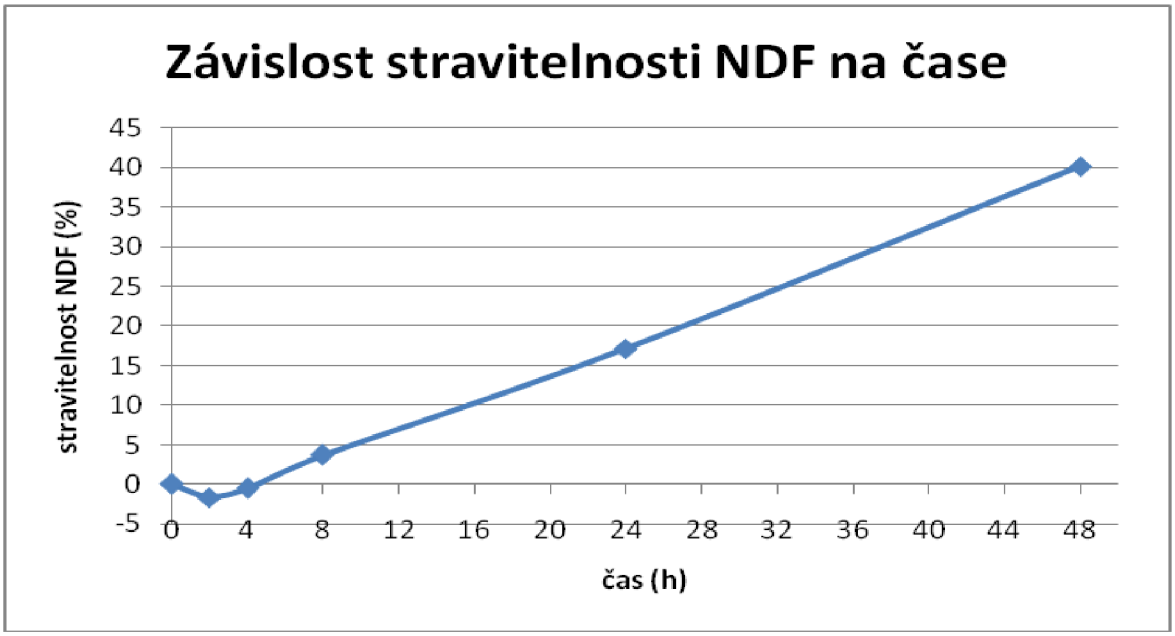
hodnoty, výsledky stravitelnosti metodou in vitro vykazují lineární závislost (viz. graf č. 3).

Podle Hoffman a Cobs, (2004) dosahovala stravitelnost metodou in vitro u kukuřičné siláže 58,9 % po 48 hodinách inkubace. Tato hodnota je o 18,74 % vyšší, než byla mnou naměřena. Podle Hall a Mertens (2008) byla stravitelnost 52,7 % po 24 hodinách inkubace, a 67,6 % po 48 hodinách inkubace. Hodnoty jsou opět vyšší než mnou naměřené. Naproti tomu Di Marco a kol. (2002) zjistili stravitelnosti NDF u kukuřičné siláže pouze 32 % po 48 hod. inkubace. Zjištěné rozdíly mohou být dány odlišným obsahem složek v krmivech nebo zdravotním stavem, a tím pádem prostředím v bachoru dojnice. Kromě toho Hall a Mertens (2008) zjistili rozdíly i mezi jednotlivými in vitro metodami, proto je důležité metody nejen přesně definovat, ale také kalibrovat přesnost in vitro hodnot s hodnotami in vivo (Tománková a Homolka, 1997) a in situ (Aufrére a kol., 1991; Michalet-Doreau a kol., 1992; Mertens, 1993).

Tabulka č. 8: Stravitelnost neutrálně detergentní vlákniny pro jednotlivé inkubační intervaly metodou in vitro

| Vzorek kukuřičná siláž | **NDFD průměr [%]** | SEM (střední chyba průměru) |
|---|---|---|
| 0 h siláž | **0,00** | 1,99 |
| 2 h siláž | **-1,61** | 0,36 |
| 4 h siláž | **-0,52** | 2,39 |
| 8 h siláž | **3,67** | 1,21 |
| 24 h siláž | **17,16** | 0,14 |
| 48 h siláž | **40,16** | 0,62 |

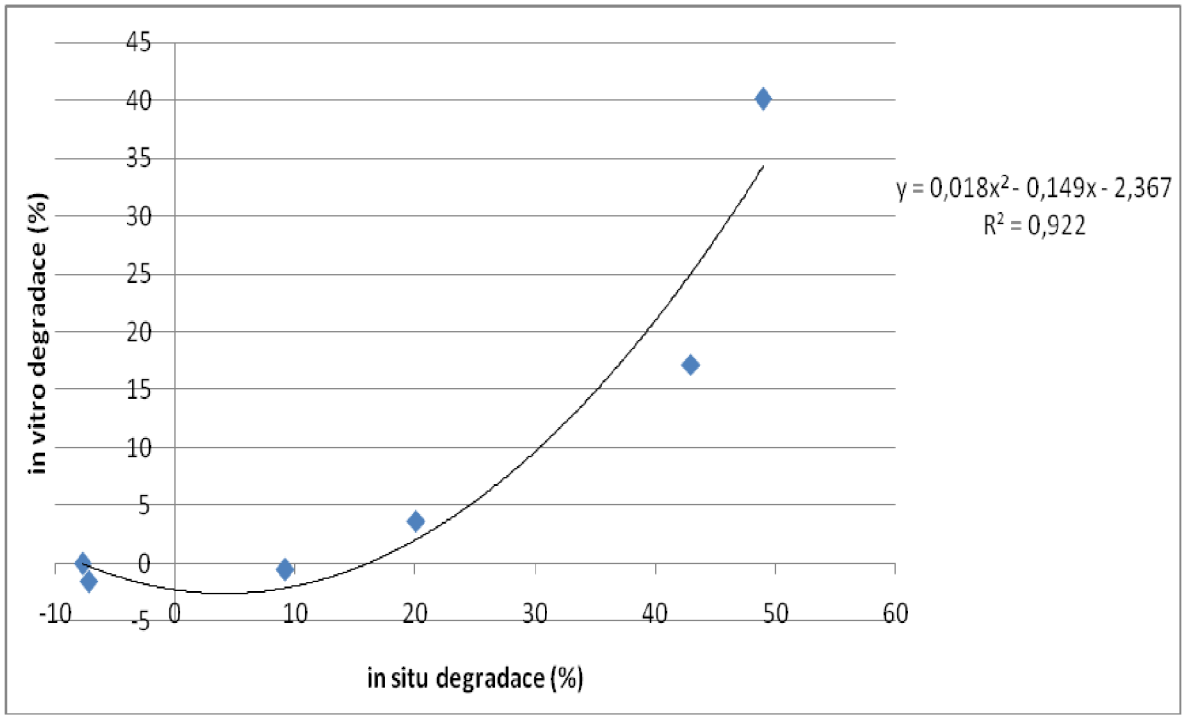
Graf č. 3: Závislost stravitelnosti NDF na čase




## 4.4 Porovnání in vitro a in situ metod pro stanovení degradovatelnosti NDF kukuřičné siláže

Stravitelnost zjištěna metodou in situ po 24 hodinách nabyla hodnoty 42,94 % a po 48 hodinách 48,94 %, oproti tomu metodou in vitro byla stravitelnost po 24 hodinách pouhých 17,16 % a po 48 hodinách 40,16 %. Zatímco u metody in situ stravitelnost v inkubačním intervalu 24 – 48 hodin téměř nenarostla, u metody in vitro byl zaznamenán velký nárůst stravitelnosti NDF. Hodnoty stravitelnosti jsou u metody in situ v časových intervalech 8, 24 a 48 hodin vždy vyšší než naměřené metodou in situ. To je v souladu např. s Di Marcem a kol. (2002). Vliv na tyto rozdíly má zajisté odlišnost metod zjišťování stravitelnosti, kdy u metody in situ má velký podíl na stravitelnosti proměnlivé prostředí bachoru. Měření stravitelnosti metodou in situ je tedy přesnější. Převedením těchto hodnot do grafu získáme polynomický graf (graf č. 4), přičemž teoreticky by závislost měla být lineární (stravitelnost ve stejných časových intervalech by měla vykazovat u obou metod stejné hodnoty).

Graf č. 4: Vztah mezi degradací NDF měřenou metodou in vitro a in situ se zobrazenou rovnicí grafu




## 4. 5 Vyhodnocení regrese

Pomocí softwaru Statistica 7.0 byla vyhodnocena rovnice regrese s hodnotami parametrů uvedených v tabulce č. 9. Vzhledem k tomu, že lineární regrese vykazovala horší parametry ($R^2$ = 0,7614, data nejsou uvedena) byla jako nejvhodnější vybrána polynomická regrese, u níž je hodnota $R^2$ = 0,9227. Polynomická regrese má následující rovnici:

invitro = a*insitu^2 + b *insitu + c

Hodnoty parametrů regrese včetně jejich intervalů spolehlivosti (±95 %) jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka č. 9).

Tabulka č. 9: Hodnoty parametrů regrese

| | |
|---|---|
| **R** | 0,9606 |
| **$R^2$** | 0,9227 |
| **P** | 0,0215 |
| **a** | 0,0184 |
| a (IS 95%-) | -0,0050 |
| a (IS 95%+) | 0,0418 |
| **b** | -0,1496 |
| b (IS 95%-) | -1,1492 |
| b (IS 95%+) | 0,8500 |
| **c** | -2,3676 |
| c (IS 95%-) | -12,4038 |
| c (IS 95%+) | 7,6685 |

a, b, c, = parametry regrese

IS 95%+- = interval spolehlivosti na úrovni 95 % pro každý parametr

R = index korelace (v případě lineárního vztahu - koeficient korelace)

$R^2$ = index determinace (v případě lineárního vztahu - koeficient determinace)

P = signifikantnost použitého matematického modelu (regresního vztahu)

# 5 Závěr

Stravitelnost neutrálně-detergentní vlákniny u kukuřičné siláže byla měřena dvěma metodami: in vitro a in situ. Metoda in vitro napodobuje podmínky prostředí bachoru, metoda in situ je přímé měření stravitelnosti v bachoru. Při porovnání těchto metod bylo zjištěno, že na stravitelnost má vliv mnoho faktorů, jako je obsah různých složek v krmivu, činnost bachoru, atd. Proto je nutné pro přesnou predikci hodnot stravitelnosti živin v krmivech provádět porovnávání in vitro a in situ (resp. in vivo) metod, aby bylo dosaženo větší přesnosti u hodnot zjišťovaných v laboratorních podmínkách (tj. metodami in vitro).

# 6 Seznam použité literatury


Antoniewicz A., Van Vuuren A. M., Van Der Koelen C. J., Kosmala J. (1992). Intestinal digestibility of rumen undergraded protein of formaldehyde-treated feedstuffs measured by mobile bag and in vitro technique. Anim. Feed Sci. Technol. 39: 111-124.

Aufrére J., Graviou D., Demarquilly C., Vérité R., Michalet-Doreau B., Chapoutot P. (1991). Prediction in situ degradability of feed proteins in the rumen by two enzymatic methods (solubility and enzymatic degradation). Anim. Feed Sci. Technol. 33: 97-116.

Di Marco O.N., Aello M.S., Nomdedeu M., Van Houtte S. (2002): Effect of maize crop maturity on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). Anim. Feed Sci. Technol. 99, 37–43.

Gosselink J.M.J., Dulphy J.P., Poncet C., Jailler M., Tamminga S., Cone J.W. 2004. Prediction of forage digestibility in ruminants using in situ and in vitro techniques Anim Feed Sci Technol, 115, 227-246.

Gosselink J.M.J., Dulphy J.P., Poncet C., Tamminga S., Cone J.W. 2004 A comparison of *in situ* and *in vitro* methods to estimate *in vivo* fermentable organic matter of forages in ruminants. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences, 52, 29–45

Hall M.B., Mertens D. R., 2008: In vitro fermentation vessel type and method alter fiber digestibility estimates. J. Dairy Sci. 91:301–307.

Hoffman P., Combs D., 2004: Using NDF digestibility in ration formulation. Dostupné na http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/lolndfd.pdf

Hofírek, B., Dvořák, R. Speciální vyšetřovací a diagnostické metody a postupy, s. 181-207. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležal, R., Pospíšil, Z. (ed.): Nemoci skotu. Brno: Česká buiatrická společnost, 2009. 1149 s. ISBN: 978-80-86542-19-5.

Hvelplund T., Weisbjerg M. R., 2000. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In.: D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford,

H. M. Omed (Editors), Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing, 233-258.

Jambor V., Vosynková B., 2009: Vláknina jako zdroj energie v kukuřici. Dostupné na http://www.nutrivet.cz/nutrivet/clanky/2.pdf

Jančík F., Rinne M., Homolka P., Čermák B., Huhtanen P. (2011): Comparison of methods for forage digestibility determination. Anim Feed Sci Technol. 169: 11– 23

Jelínek P., Koudela K., Doskočil J., Illek J., Kotrbáček V., Kovářů F., Kroupová V., Kučera M., Kudláč E., Trávníček J., Valent M. (2003). Fyziologie hospodářských zvířat. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 414 p.

Jensen C., Weisbjerg M.R., Nørgaard P., Hvelplund T. (2005): Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 118, 279–294

Koukolová V., Homolka P. (2008). Hodnocení stravitelnosti neutrálně-detergentní vlákniny ve výživě skotu. Metodika. 29 p.

Koukolová V., Homolka P., Kudrna V. (2010): Vliv strukturních sacharidů na bachorovou fermentaci, zdraví zvířat a kvalitu mléka. Vědecký výbor výživy zvířat, Praha, květen 2010, 41 str.

Koukolová V., Weisbjerg M. R., Hvelplund T., Lund P., Čermák B. (2004). Prediction of NDF degradation characteristics of grass/clover forages based on laboratory methods. J. Anim. Feed Sci. 13, 691-708

Křížová L, Richter M, Třináctý J, Říha, J., Kumprechtová, D. 2011. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redoxpotential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. Czech J. Anim. Sci., 56 (1), 37-45

Marden J. P., Bayourthe C., Enjalbert F., Moncoulon R. (2005): A new device formeasuring kinetics of ruminal pH and redoxpotential in dairycow. Journal of Dairy Science, 88, 277–281.

Marvan, F. a kol. (2011). Morfologie hospodářských zvířat. Vyd. 5. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze v nakl. Brázda, 303 s.

Mertens D. R. (1993). Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: H.G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, J. Ralph (Editors). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy. 535-570.

Michalet-Doreau B., 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.

Míka V., Harazim J., Kalač P., Kohoutek A., Komárek P., Pavlů V., Pozdíšek J. (1997).

Kvalita píce. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha. 227 p. ISBN 80-96153-59-2

Novotná R., Kobes M., (2013): Hodnocení kvality píce. Dostupné na http://opr.zf.jcu.cz/vyuka.php?PredToView=3, [vid. 20. března 2014].

Ørskov E.R., McDonald I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agr. Sci. 92: 499-503.

Rada V., (2009): Siláž a zdraví zvířat. Vědecký výbor výživy zvířat, Praha, září 2009, 40 str.

Richter M., Třináctý J., Křížová L. (2013): Kapitola 5. Systém hodnocení krmiv dle INRA (2007) a analýzy krmiv. s. 64-78. In: Třináctý J. *et al.* (Eds) *Hodnocení krmiv pro dojnice*. AgroDigest s.r.o., Pohořelice, 592 s.

Schiemann R. (1981). Archiv. f. Tierernahr. 31, 1-19.

Setala J., Vaatainen H., Ettala T. (1984). In vitro evaluation of protein digestibility in the abomasum and small intestine of ruminants. J. Agric. Sci. (Finland). 56: 151-161.

Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two stages technique for the in vitro digestion of forage crops. Br. J. Grassland Soc. 18, 104–111.

Tománková O., Homolka P. (1995). Predikce střevní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bachoru enzymatickou metodou. Czech J. Anim. Sci. 40: 171-175.

Tománková O., Homolka P. (1997). Comparison of enzymatic technique and mobile bag technique for determination of intestinal digestibility of feedstuff undegradable protein. Czech J. Anim. Sci. 42: 219-222.

Tománková O., Homolka P. (1999). Predikce střevní stravitelnosti proteinu nedegradovaného v bachoru kombinovanou enzymatickou metodou. Czech J. Anim. Sci. 44: 323-328.

Tománková O., Homolka P. (2002). Intestinální stravitelnost dusíkatých látek u jadrných krmiv stanovená enzymaticky kombinovanou metodou. Czech J. Anim. Sci. 47 (1): 15-20.

Třináctý J., Richter M., Křížová L. (2013): Kapitola 4. Systém hodnocení krmiv dle NRC (2001) a analýzy krmiv. s. 28-62. In: Třináctý J. *et al.* (Eds) *Hodnocení krmiv pro dojnice*. AgroDigest s.r.o., Pohořelice, 592 s. ISBN 978-80-260-2514-6

Van Soest, P. J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysacharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Vencl B. (1985). Metodické zásady pro provádění bilančních a skupinových pokusů na přežvýkavcích. VÚŽV Uhříněves. 36 p.

Zeman L., Doležal P., Kopřiva A., Mrkvicová E., Procházková J., Ryant P., Skládanka J., Straková E., Suchý P., Veselý P., Zelenka J. (2006). Výživa a krmení hospodářských zvířat, 360 p.