

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv probiotických krmných aditiv na funkční stav bachoru

Autor diplomové práce:

Bc. Veronika Hadačová

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Luboš Záborský, Ph.D.

České Budějovice
2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika HADAČOVÁ**
Osobní číslo: **Z14313**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Vliv probiotických krmných aditiv na funkční stav bachoru**
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Stravitelnost krmiv je důležitá pro mléčnou a masnou užitkovost. S tím souvisí funkční stav bachoru, který je ovlivněn především množstvím příjmu krmiva a jeho kvalitou. Cílem práce je zjistit, jak probiotické krmné doplňky ovlivní bachorovou mikroflóru a stravitelnost krmiv u kanylovaných krav.

V pokusné stáji katedry budete kanylovaným kravám podávat krmné doplňky v časových intervalech podle vypracovaného harmonogramu. Podle časového rozvrhu budete odebírat bachorovou tekutinu a následně stanovovat vliv krmných doplňků na funkční stav bachoru (počty mikroorganismů, pH, hladiny mastných kyselin a dusíkatých látek, apod.) v laboratoři. Z výsledků analýz zjistíte vliv těchto doplňků na celkovou stravitelnost krmné dávky. Zjištěné údaje zpracujete do tabulek a grafů, statisticky vyhodnotíte, porovnáte s poznatky získanými z literární rešerše a vyvodíte doporučení a hlediska využití krmných doplňků.

Rozsah grafických prací: 5 tabulek, 5 grafů
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

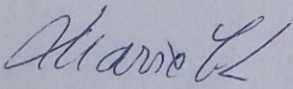
- BOUŠKA, J. et al.: Chov dojeného skotu. Profi Press, Praha, 2006, 186 s. ISBN 80-86726-16-9.
KAUR, I.P., CHOPRA, K., SAINA, A.: Probiotics potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15 (2002), s. 1-9.
NĚMĚC, M., HORÁKOVÁ, D.: Základy mikrobiologie. Brno: Nakladatelství MU, 1999. 233s. ISBN 80-210-2060-1.
OHASHI, Y., USHIDA, K.: Health-beneficial effects of probiotics its mode of action. 2009, s. 361-371.
REECE, O. W.: Fyziologie domácích zvířat. Grada Publishing, 1998, 449 s.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Luboš Záborský
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 9. září 2015
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2016

V. z.
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 17. března 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce na téma „Vliv probiotických krmných aditiv na funkční stav bachoru“, a to- v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 5. dubna 2016

.....

Bc. Veronika Hadačová

Abstrakt

V mé práci jsem se věnovala vlivu probiotik *Bifidobacterium* sp. na funkční stav bachoru skotu. V pokusu byly použity dvě dospělé krávy plemene Aberdeen-angus se zavedenou permanentní kanylou, kterým byla denně podávána probiotika *Bifidobacterium* sp.. Z odebraných vzorků bachorové tekutiny byli analyzovány těkavé mastné kyseliny, protozoa, pH a množství amoniaku. Při testování vlivu probiotik na jednotlivé proměnné, s pevným efektem jedince nebyl vliv probiotik prokázán. Při testování bez efektu jedince vyšla v lineárním modelu nejlépe popisujícím má data kyselina octová a máselná. V jejich závislosti se zvyšovaly počty protozoí. Jelikož byli použiti pouze dva pokusní jedinci, je zde silný efekt jedince. Z mých výsledků vyplývá, že vliv probiotik *Bifidobacterium* sp. na funkční stav bachoru je nízký. Tyto výsledky mohly být ovlivněny nízkým počtem replikací aplikace probiotik a také nízkým počtem zvířat.

Klíčová slova: *Bifidobacterium* sp., protozoa, krmné doplňky, píštěl, skot

Abstract

In my study I was examining the influence of the probiotic *Bifidobacterium* sp. on the functional status of the cattle's rumen. Two adult cows Aberdeen-angus were used in this experiment. They were treated with a permanent cannula, which served for daily dosing of probiotics *Bifidobacterium* sp.. Samples of rumen fluid were analyzed for the amount of volatile fatty acids, protozoans, pH and the quantity of ammonia. When we tested the effect of the probiotics on each variable, the fixed effect of the influence of an individual has not been proved. When we tested the data without the effect of the individual in a linear model, the variables best describing my data were the butyric and acetic acids. The amount of protozoans increased as there levels grew. There is a strong effect of the individual as only two individuals were used. My results indicate that the influence of the probiotics *Bifidobacterium* sp., on the functional status of the rumen is low. These results could be affected by the low number of experiment-replication as well as by small quantity of tested animals.

Key words: *Bifidobacterium* sp., protozoa, feed supplements, fistula, cattle

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu Ing. Luboši Zábranskému, Ph.D., za odborné vedení a ochotu se mnou spolupracovat při psaní diplomové práce a za veškerou podporu při mém studiu. Děkuji pracovníkům Účelového zařízení školního zemědělského statku ve Čtyřech dvorech. Poděkování patří i Ing. Anně Poborské za pomoc s odebráním vzorků. Děkuji také Ing. Evě Petráškové, Ph.D., za analýzu vzorků v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat svému přítelovi za pomoc při zpracování, za rady a hlavně trpělivost během psaní diplomové práce. Děkuji rodině, která mě vždy ve studiu podporovala.

Zkratky

VFA – (volatile fatty acids) těkavé mastné kyseliny

GIT – gastrointestinální trakt

ZKD – základní krmná dávka

NDF – neutrálně detergentní vláknina

P – pokus

K -kontrola

Kys.- kyselina

LM - lineární model

Obsah

1 .	Úvod	11
2 .	Literární přehled.....	12
2 .1	Trávicí trakt přežvýkavců	12
2 .2	Rozvoj předžaludku	12
2 .3	Anatomie předžaludku	13
2 .3 .1	Bachor.....	13
2 .3 .1 .1	Bachorová motorika.....	14
2 .3 .1 .2	Přežvykování, sliny, produkce plynů a krkání	14
2 .3 .1 .3	Bachorové prostředí	15
2 .3 .1 .4	Bachorová tekutina	17
2 .4	Metabolické procesy v bachoru.....	18
2 .4 .1	Metabolismus sacharidů.....	18
2 .4 .2	Metabolismus lipidů	20
2 .4 .3	Metabolismus bílkovin.....	20
2 .4 .4	Těkavé mastné kyseliny	21
2 .4 .5	Vitamíny.....	22
2 .4 .6	Minerální látky	23
2 .5	Probiotika	23
2 .5 .1	Hlavní probiotické druhy	25
2 .5 .1 .1	<i>Lactobacillus</i>	25
2 .5 .1 .2	<i>Enterococcus</i>	25
2 .5 .1 .3	<i>Bacillus</i>	25
2 .5 .1 .4	<i>Saccharomyces</i>	25
2 .5 .1 .5	<i>Bifidobacterium</i>	26
2 .5 .2	Probiotika a imunitní systém.....	26
2 .5 .3	Probiotika a přežvýkavci.....	26
2 .6	Stravitelnost krmiv.....	27
3 .	Materiál a metodika.....	28
3 .1	Zvířata a experimentální design	28

3.2	Krmení	29
3.3	Odběr vzorků.....	29
3.3.2	Odběr bachorové tekutiny	29
3.3.2	Odběr výkalů	30
3.4	Analýza vzorků.....	30
3.4.1	Bachorová tekutina	30
3.4.2	Výkaly.....	30
3.5	Statistická analýza	31
4.	Výsledky.....	32
4.1	Analýza bachorové tekutiny	32
5.	Diskuze	41
6.	Závěr.....	44
7.	Seznam literatury	45

Přílohy

1. Úvod

Hlavním cílem živočišné výroby je zajištění kvalitních a bezpečných produktů pro člověka. Důležité jsou i správné životní podmínky živočicha a ohled na životní prostředí. Významnou oblastí zootechnického výzkumu je zlepšení kvality a zdravotní nezávadnosti masa. V minulosti byla často používána antibiotika jako krmné doplňky. Během let začaly být však obavy z vývoje rezistence vůči antibiotikům, přenosné ze zvířete na člověka a jeho mikroflóru. To vše vedlo k zákazu užívání antibiotik a tím se dostal do popředí výzkum alternativních krmných doplňků a to probiotik, prebiotik a synbiotik. Přestože se znalost o účincích těchto doplňkových látek zvýšila, základní informace a dopad na jedince jsou stále neúplné a často rozporné.

Cílem této práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivní podávání probiotických krmných aditiv mikroflóru a mikrofaunu bacheru. Jak zapůsobí na základní chemické a biologické pochody v bacheru a také jejich vliv na celkovou stravitelnost podávaného krmiva u kanylovaného skotu.

2. Literární přehled

2.1 Trávicí trakt přežvýkavců

Funkcí trávicí soustavy přežvýkavců je nejen přijímání krmiva, ale i rozklad složek na vstřebatelné látky, jejich následná resorpce do krve a mízy a vylučování nestrávených zbytků potravy z těla ven. Trávicí soustava je složena z dutiny ústní, hltanu, jícnu, žaludku, střev a dále velkými žlázami jako jsou slinné žlázy, slinivka břišní a játra (Bouška et al., 2006; Reece, 1998). Přežvýkavci neprodukují žádné enzymy, které by napomáhaly rozkladu přijatého krmiva. Mají však mikroorganismy (bakterie, houby a prvoky), kteří zajišťují rozložení krmiva pro svou vlastní energii a růst a produkují těkavé mastné kyseliny (VFA) (Hulsen and Aerden, 2014; Russell and Rychlik, 2001). Pomocí enzymů mikrobiálního původu probíhá v předžaludku také trávení ostatních živin. Spolu s mikrobiálním trávením probíhají procesy syntetické. Významným syntetickým procesem je syntéza mikrobiální bílkoviny, která je pro hostitelský organismus významný zdroj esenciálních aminokyselin. Přežvýkavci přijímají velké množství krmiva, čímž se v průběhu vývoje zvyšuje kapacita jejich předžaludku. Na vývoji sliznice předžaludku se významně podílejí produkty mikrobiální činnosti ovlivňující tloušťku sliznice a zvětšení resorpční plochy. Ke zvětšení povrchu dochází především v knize. Následkem je vstřebávání velkého množství vody, těkavých mastných kyselin a minerálních látek. U přežvýkavých domácích zvířat probíhá velká část trávení potravy v bachoru. Ke zbylému trávení, především trávení bílkovin, dochází ve slezu. Vstřebávání živin probíhá v tenkém a tlustém střevě. V tlustém střevě dochází i k trávení, které je poměrně zanedbatelné v porovnání s trávením v bachoru (Fuller, 2004; Jelínek et al., 2003; Reece, 1998).

2.2 Rozvoj předžaludku

Trávení u telat v nejmladším věku se výrazně odlišuje od trávení dospělých zvířat, protože v průběhu vývojových fází se mění anatomické poměry a fyziologie trávení. Příjem objemných krmiv urychluje vývoj a kapacitu předžaludku a již ve třech měsících věku je tento vývoj ukončen. Na vývoji předžaludku se výrazně podílejí produkty mikrobiální činnosti, těkavé mastné kyseliny, které mají vliv

na tloušťku sliznice předžaludku, stimulují vývoj bachorových papil, čepcoslezových řas a listů knihy (Jelínek et al., 2003). V prvních dnech po narození se zvětšuje nejintenzivněji slez, naopak hmotnost předžaludku se zdvojnásobí za 2 -3 týdny (Kudrna et al., 1998). V dalším období se zvětšování slezu zpomaluje a mnohem rychleji se zvětšuje objem bachoru, zejména v závislosti na příjmu rostlinné složky, mikrobiální činnosti a dalších faktorů (Urban et al., 1997). U narozeného telete je poměr předžaludku a slezu 1:9, v 8. týdnu věku se poměr vyrovnává, ve věku 12. týdnů je již poměr bachoru a slezu 2:1 a v dospělosti se poměr obrací ve prospěch předžaludku, tedy 9:1 (Červený et al., 1999; Urban et al., 1997).

Po narození je tele inokulováno prvními bakteriemi ze slin matky. Nejprve se jedná o fakultativně anaerobní bakterie, které do několika dní vystřídají přísně anaerobní mikroorganismy. V prvním týdnu života telete se rozvíjí metanové bakterie, dále celulotické bakterie a ve dvou týdnech se objevují plísňe. Bachor je plně funkční až po jeho osídlení prvoky (Bouška et al., 2006; Reece, 1998).

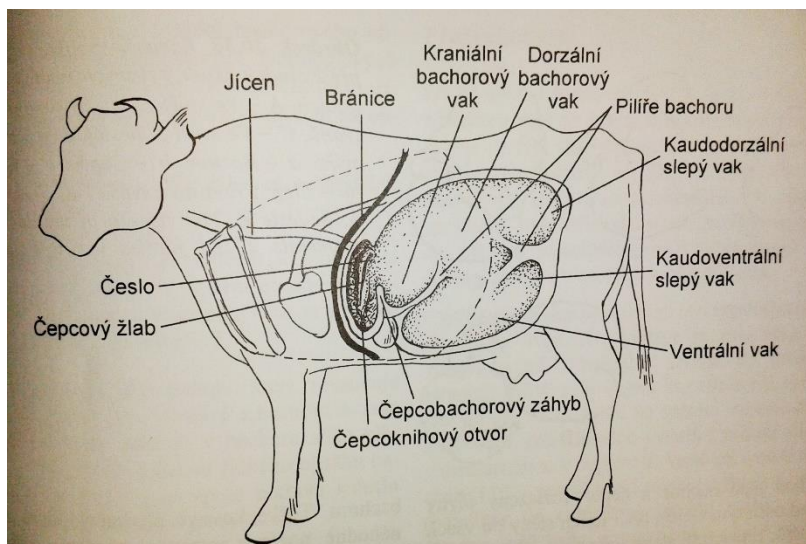
2.3 Anatomie předžaludku

Předžaludek je trojdílný, vakovitě uspořádaný orgán vystlaný bezžláznatou sliznicí, který zaujímá celou levou polovinu břišní dutiny. Předžaludek se skládá ze tří samostatných oddílů: bachor (*rumen*), čepce (*reticulum*) a kniha (*omasum*) (Červený et al., 1999).

2.3.1 Bachor

Jedná se o první oddíl předžaludku skotu, kde dochází k fermentaci, což umožňuje trávení vlákniny a dalších krmiv. Bachor je největší částí žaludku, má objem až 120 litrů (Radunz, 2012). Vyplňuje téměř celou levou polovinu břišní dutiny zvířete. Jeho pravou i levou plochu dělí horizontálně probíhající podélné povrchové brázdy, jimž uvnitř bachorové dutiny odpovídají bachorové pilíře. Ty rozdělují bachor na pět propojených vaků (Obr.1). Bachor je vystlán bezžláznatou sliznicí (mukózou), krytou vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Bachorová sliznice vytváří papily jazýčkovitého tvaru, vysoké 12 až 15 mm, výrazně zvyšující celkovou plochu bachorového epitelu. Velikost papil a jejich množství se v průběhu reprodukčního

cyklu, v závislosti na skladbě krmné dávky a intenzitě fermentačních pochodů v bachoru, značně mění. Ve ventrálním bachorovém vaku vždy zůstává část obsahu z předchozího krmení a nově přijímané krmivo se na něj vrství (Jelínek et al., 2003; Reece, 1998).



Obr. 1: Předžaludek skotu (Reece, 1998)

2.3.1.1 Bachorová motorika

Kontrakce bachoru a čepce umožňují ruminaci, zajišťují potřebný stupeň promísení krmiva, jeho využití v komplexních fermentačních pochodech, uskutečňovaných bachorovými mikroorganismy a následnou distribuci do knihy. Pro průběh těchto pochodů je důležité, aby krmná dávka zvířat obsahovala dostatek efektivní vlákniny stimulující kontrakce svaloviny předžaludku (Jelínek et al., 2003). Je také důležité, aby bylo udržováno určité uspořádání bachorového obsahu. Bachorový obsah zahrnuje několik vrstev, vrstvu flotujících, dosud nestrávených často vláknitých částic, tekutou střední vrstvu a na dně bachoru pak usazenou hustou složku, tvořenou již z části natrávenými, těžšími komponenty. Horní vláknitá vrstva zpomaluje u krmiv s vysokým obsahem nestrukturálních sacharidů (rychle dostupné sacharidy - především škrob a cukry) rychlost fermentace a současně brání jejich časnému posunu do knihy a slezu (Reece, 1998).

2.3.1.2 Přežvykování, sliny, produkce plynů a krkání

Na bachorovou motoriku navazují procesy ruminace. Přežvykování se skládá ze čtyř

fázi: rejekce neboli vyvržení sousta (regurgitace), přežvykování (remastikace), dodatečné proslinění a opětovné spolknutí.

Jedná se o reflexní činnost, která se spouští na základě podráždění mechanoreceptorů ve sliznici čepce a v bachoru v oblasti česla. Přežvykování a proslinění začínají současně. Během přežvykování se mohou 2 - 3krát spolknout sliny. Opětovné spolknutí sousta celý cyklus ukončí a nový začne zhruba za 5 vteřin (Gillespie and Flanders, 2014; Reece, 1998). Sliny skotu jsou vysoce alkalické, pH v rozmezí 8,2 - 8,4, protože obsahují velké množství močoviny, NaHCO_3 a Na_2HPO_4 . Sliny působí jako pufrční systém organismu, udržující optimální pH bachorového prostředí, což je nezbytné pro fyziologický rozvoj mikroorganismů a jejich fermentaci. Pufrční systém slin není schopen neutralizovat všechny bachorové kyseliny a v případě většího zatížení kyselinami se uplatňuje pufrční účinek močoviny. Obsah močoviny ve slinách se zvyšuje úměrně s poklesem koncentrace amoniaku v bachorové tekutině a poklesem bachorového pH. Nepřítomnost slin má za následek narušení acidobazické rovnováhy a vodní bilance (Hofírek et al., 2009; Jelínek et al., 2003; Reece, 1998). Plyny vznikající v bachoru jako produkty fermentace krmiva, jsou především oxid uhličitý (60 – 70 %) a metan (30 – 40 %). Dusík, kyslík a vodík mohou být přítomny ve stopách a na krátkou dobu, protože se rychle účastní dalších reakcí. Krkání (eruktace) je proces při kterém se plyn z předžaludku odvede jícnem a hltanem do dutiny ústní a ven z těla. Krkání se uskutečňuje jednou za minutu (Reece, 1998).

2.3.1.3 Bachorové prostředí

Bachor hostí velké množství mikroorganismů včetně bakterií, prvoků a hub, kteří fungují na základně striktního anaerobního prostředí. Tyto mikroby degradují rostlinou vlákninu na nevláknité sacharidy, bílkoviny, těkavé mastné kyseliny a amoniak. Amoniak využívají mikroby jako energii a vlastní zdroj dusíku potřebný k růstu (Flint, 1997; Fraga et al., 2013; Gillespie and Flanders, 2014; Ozutsumi et al., 2005; Pinloche et al., 2013; Welkie et al., 2010). Z toho vyplývá, že tyto mikroorganismy mají významnou úlohu pro zachování stability bachorového prostředí a zdraví hostitele (Castillo-Gonzalez et al., 2014; Round and Mazmanian, 2009).

Teplota bachoru je dána teplotou zvířete, která ale souvisí i s teplotou prostředí, pohybovou aktivitou jedince. Její hodnoty jsou mezi 38,6 – 40C . Teplota bachoru

se mění po požití napájecí vody o nízké nebo naopak příliš vysoké teplotě (Brod et al., 1982).

Osmotický tlak je převážně ovlivněn druhem přijímaného krmiva. Značný vliv má také permeabilita epitelu bachorové stěny pro ionty VFA, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻. Před nakrmením je osmotický tlak bachorového obsahu vůči krevní plazmě hypotonický, hodnoty jsou nižší než 280 mosmol. kg⁻¹, po nakrmení vzroste až k hodnotě 400 mosmol. kg⁻¹ (Lodemmann and Martens, 2006).

Bakterie

Bakterie jsou nejdůležitější mikroby podílející se na trávení přežvýkavců. Počet v 1 ml bachorové tekutiny bývá 10⁹ až 10¹² bakterií (Bouška et al., 2006; Prescott et al., 2005). Konkurence bakterií závisí na řadě faktorů, jako jsou preference substrátu, energetické nároky a odolnost vůči některým produktům, které mohou být toxické (Pitta et al., 2010). Bakterie jsou obvykle klasifikovány podle svých schopností fermentovat jednotlivé substráty a podle druhu tvořených metabolitů, jako bakterie celulolytické, hemicelulolytické, pektinolytické, amylolytické, metanogenní, proteolytické, urealytické, ale také bakterie využívající kyseliny a lipidy (Jelínek et al., 2003). Celulolytické bakterie hrají důležitou roli ve výživě přežvýkavců, jelikož celulóza je hlavní složkou buněčných stěn rostlin (Russell et al., 2009). Bakterie také produkují mnoho vitamínů důležitých pro přežvýkavce. Poté co bakterie dokončí svůj reprodukční cyklus, jedinec je stráví, z čehož má přežvýkavec další výhody (Gillespie and Flanders, 2014).

Nálevníci

Bachorový nálevníci, anaerobně fermentační mikroorganismy, výrazně přispívají k trávení přežvýkavců (Ushida, 2011). K osídlení bachoru nálevníky dochází při přechodu z mléčné výživy na zkrmování objemné píče kontaminované nálevníky nebo kontaktním přenosem od okolních zvířat (Jelínek et al., 2003). Nálevníci představují 40 – 80 % živočišné biomasy bachoru. Systematicky spadají do podtřídy *Trichostomatia* a můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin: řád *Entodiniomorphida* a *Vestibuliferida* (Firkins et al., 2007; Ricard et al., 2006; Yañez-Ruiz et al., 2004). Tráví sacharidy, produkují aminokyseliny a zpracovávají nestravitelné strukturní polysacharidy na nestabilní lipidy, které mohou být snadno absorbovány hostitelem a vytvářet tak jeho hlavní zásoby energie (Cameron, 2003). Jsou velmi citliví na snížení pH pod 5,5 a zvýšení osmotického tlaku

nad 0,9 Mpa/l . Při poklesu pH pod 4,5 dochází do tří dnů k defaunaci předžaludku. Jejich celkový počet kolísá od 10^4 do 10^7 .ml⁻¹ bachorové tekutiny, v závislosti na složení krmné dávky a době po nakrmení. Z dalších faktorů je uplatňován věk, užítkovost, stupeň anaerobiózy, pH obsahu předžaludku a fyziologický stav zvířete (Jelínek et al., 2003).

Houby

Houby představují v mikroflóře bachoru malou část, přibližně 8 %, ale i tak hrají důležitou roli při trávení krmiva (Jenkins et al., 2008; Nam and Garnsworthy, 2007). Účast anaerobních hub na metabolických pochodech v předžaludku přežvýkavců byla popsána teprve v r. 1975. Nyní je známo, že bachorové houby se aktivně podílí na stravitelnosti vlákniny. Do těla přežvýkavce se dostávají spolu s krmivem (Dey et al., 2004; Lee et al., 2004a). Bachorové anaerobní houby se rozmnožují pomocí nepohlavních spor, které se uvolňují ze zralého sporangia. Počet spor, který se obvykle pohybuje v rozmezí $10^2 - 10^5$.ml⁻¹, může výrazně kolísat, především v závislosti na druhu přijímaného krmiva. Neumožní-li složení krmné dávky, aby se krmivo v bachoru zadrželo po dobu nezbytnou pro proběhnutí celého vývojového cyklu, počet hub v jeho obsahu výrazně klesá. Naproti tomu krmná dávka bohatá na vlákninu prodlužuje dobu zadržení rostlinných částic a počet hub se výrazně zvyšuje (Jelínek et al., 2003).

2.3.1.4 Bachorová tekutina

Bachorová tekutina je mírně viskózní tekutina aromatické vůně. Barva normální bachorové tekutiny je obvykle olivově zelená nebo zelenohnědá. Barva se liší v závislosti na druhu krmiva. U zvířat žijících na pastvě má zelenou barvu. Při požívání okopanin bývá barva šedá a po krmení slámou je obvykle žlutohnědá. Může být zelenočerná v případech, kdy se v bachoru vyskytuje hniloba. Na druhu krmiva a na intervalu mezi krmením závisí pH bachorové tekutiny. Optimální pH je v intervalu hodnot 6,2 -7,2 . Podle Gillespie & Flanders (2014) je ideální hodnota pH 6,5 . Složení tekutiny je ovlivněno druhem krmiva, složením slin a absorpcí rozpuštěných látek (Fuller, 2004; Jackson and Cockcroft, 2002).

2.4 Metabolické procesy v bachoru

Sacharidy jsou zdrojem energie jak pro přežvýkavce, tak pro bachorové mikroorganismy (Jelínek et al., 2003). Bachorová fermentace je velmi precizně biologicky a nutričně regulovaný kompletní systém spolupůsobení celého mikrobiálního ekosystému, krmiva a zvířat, který má při hodnocení úrovně výživy vysokou diagnostickou hodnotu (Vajda et al., 2003). Bakterie se realizují asi z 80 % a prvoci asi z 20 % metabolismu v bachoru (Reece, 1998). Jako vedlejší produkty fermentace vznikají metan a oxid uhličitý, které se hromadí jako plynné vrstvy nad bachorovým obsahem (Frandsen et al., 2013).

2.4.1 Metabolismus sacharidů

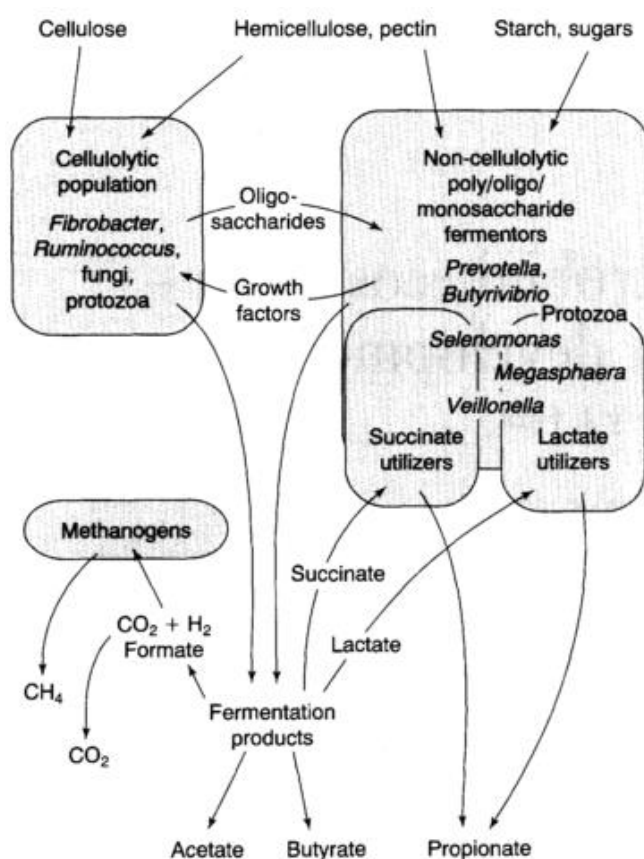
Sacharidy jsou nejdůležitějším zdrojem energie a také primární prekurzory mléčného tuku a laktózy. Rostlinné sacharidy mohou být rozděleny dle místa zabudování na sacharidy buněčného obsahu, sacharidy vyskytující se v mezibuněčném prostoru a sacharidy buněčných stěn. Sacharidy buněčného obsahu a mezibuněčného prostoru jsou nazývány nestrukturální sacharidy. Mezi ně patří: jednoduché sacharidy, organické kyseliny, škrob, fruktany, β -glukany a pektiny. Strukturální sacharidy zahrnují hemicelulózu (xylany, glukomanany), celulózu, ligniny a jsou součástí buněčných stěn (Skřivánek, 2000).

Veškeré sacharidy	
Nestrukturní sacharidy	Strukturální sacharidy (NDF)
a) Cukry	a) Hemicelulóza
b) Škroby	
c) Neutrálně-detergentní rozpustná vláknina	b) Acido-detergentní vláknina (ADF)
- pektiny	- celulóza
- fruktany	- lignin
- beta-glukany	- mailard protein

Obr. 2: Dělení sacharidových frakcí (Van Saun and Koukal, 2003)

Produkty fermentace většiny sacharidů jsou jednoduché směsi těkavých mastných kyselin (VFA) s oxidem uhličitým. Štěpení celulózy probíhá ve třech stupních. Nejprve je celulóza depolymerizována na menší fragmenty (celodextriny). Ty jsou štěpeny celobiohydrolázou na celobiózu, která je dále β -glukosidázami degradována na glukózu. Ta je dále mikrobiálně fermentována na VFA (Jelínek et al., 2003).

Bachorový epitel může resorbovat glukózu stejně jako těkavé mastné kyseliny, a tak se část přijaté nebo vzniklé glukózy může vstřebat před její fermentací. Je však pravděpodobné, že se většina glukózy přeměňuje na VFA (Reece, 1998). Extracelulární amylázy štěpí škrob na maltózu. Ta je v reakci katalyzované maltázou rozložena na dvě molekuly glukózy. Konečným produktem jsou opět VFA. Za 24 hodin se v předžaludku vytvoří kolem 4,5 kg VFA a ty pokryjí 40 až 70 % celkové energetické potřeby (Jelínek et al., 2003).



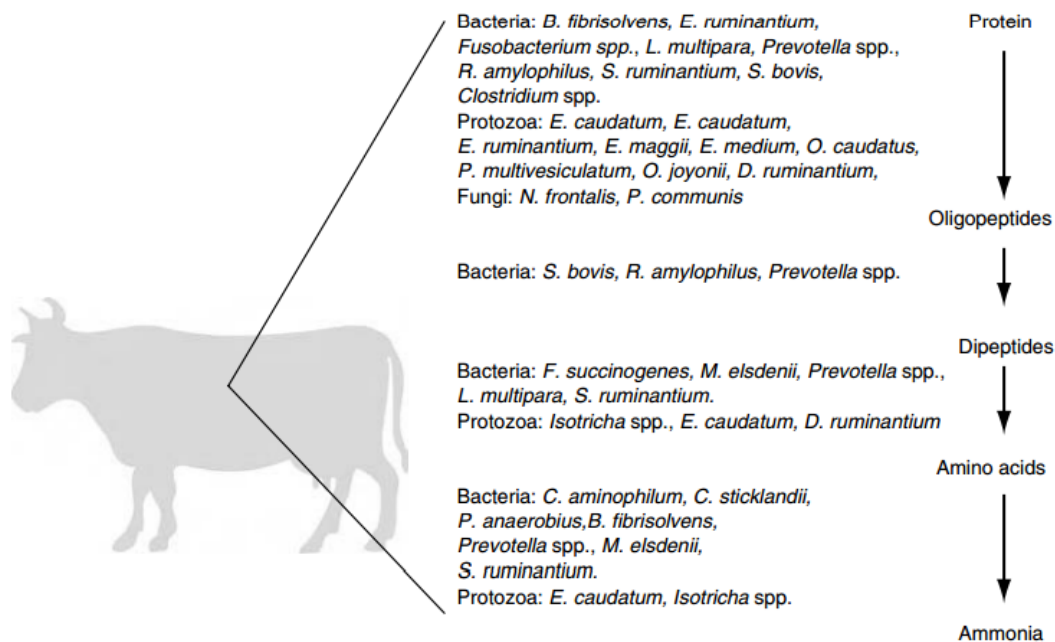
Obr. 3: Nutriční interakce mezi hlavními mikroorganismy bachoru podílející se na využití sacharidů (Flint, 1997)

2.4.2 Metabolismus lipidů

Lipidy jsou v bacheru fermentovány z nenasycených mastných kyselin na nasycené mastné kyseliny. Hlavní druhy lipidů v krmivě jsou triglyceridy, fosfolipidy a galaktolipidy. Bacherové mikroorganismy fermentují lipidy pomocí lipáz a biohydrogenáz (Jenkins et al., 2008). Po příjmu jsou lipidy ihned hydrolyzovány mikrobiálními lipázami, které uvolňují jednotlivé mastné kyseliny, glycerol a menší část diglyceridů (Jenkins, 1993). Glycerol a galaktóza jsou rychle fermentovány na VFA. Glycerol převážně na kyselinu propionovou a galaktóza na kyselinu octovou, propionovou a máselnou. Na hydrolyze lipidů v předžaludku se podílejí hlavně anaerobní lipolytické bakterie, v menší míře protozoa a enzymy rostlinného původu (Jelínek et al., 2003). Nenasycené mastné kyseliny mají v bacheru poměrně krátkou existenci, jelikož jsou velmi rychle hydrogenovány. Jedná se o způsob ochrany bacherových mikroorganismů před toxickými účinky. Ačkoli jsou lipidy vydatným zdrojem energie, přídavek lipidů do krmné dávky může významně ovlivnit mikrobiální fermentaci, snížením stravitelnosti ostatních zdrojů energie. Přidání 10 % degradovatelných lipidů může díky toxicitě nenasycených mastných kyselin klesnout stravitelnost strukturálních sacharidů až o 50 % (Jenkins, 1993). Významně tak klesá produkce metanu, vodíku, VFA (hl. acetát) (Náměstková et al., 2005). Také je potlačena fermentace proteinů. Degradace škrobu většinou ovlivněna nebývá (Jenkins et al., 2008).

2.4.3 Metabolismus bílkovin

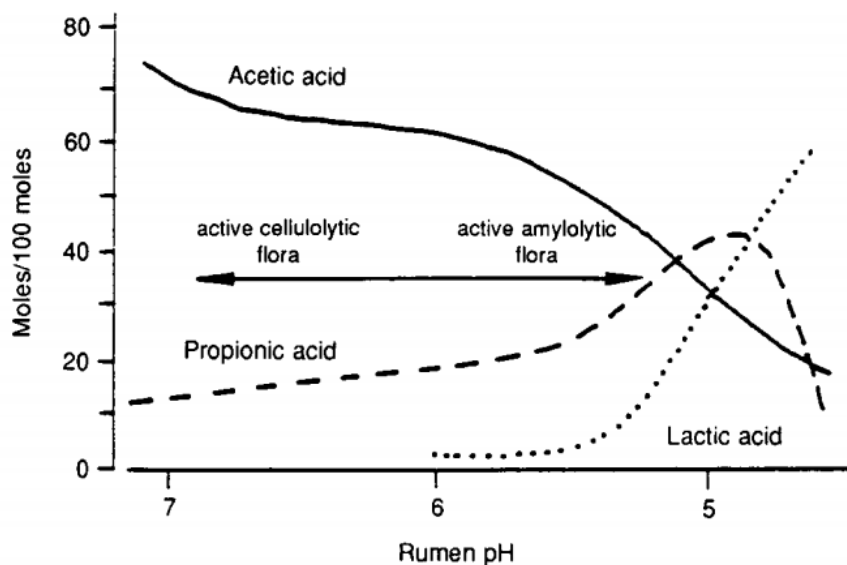
Kvalita bílkovin závisí na zastoupení jednotlivých aminokyselin, které určují jejich biologickou hodnotu. Čím více se aminokyselinové složení bílkovin podobá složení tělních tekutin, tím jsou bílkoviny biologicky hodnotnější a lépe využitelnější a jejich biologická hodnota dosahuje vyšších hodnot. Tato biologická hodnota udává, kolik dusíku se vstřebalo z krmiva a zabudovalo do vlastních bílkovin v organismu (Jelínek et al., 2003). Mikroorganismy bacheru se účastní hydrolyzy bílkovin, která se uskutečňuje jako štěpení peptidů, se snižující se délkou řetězce až na volné aminokyseliny. Ty jsou většinou destruovány fermentativní deaminací doprovázenou produkcí oxidu uhličitého, čpavku a VFA (Reece, 1998).



Obr.4: Mikroorganismy podílející se na metabolismu proteinů (Pfeffer and Hristov, 2005)

2.4.4 Těkavé mastné kyseliny

Celková koncentrace VFA a jejich podíly, jsou závislé na krmné dávce (Perry and Cecava, 1995). Výsledkem složitého fermentačního procesu v bachoru je vznik konečných produktů degradace chemických struktur základních živin, obsažených v krmivu. Základní těkavé mastné kyseliny jsou kyselina octová, propionová a máselná. VFA jsou většinou resorbovány ještě v bachoru a jsou společně s mikrobiálním proteinem (bakteriální protein, protozoární protein) významným nutričním zdrojem přežvýkavců (Ducháček and Lamka, 2014).



Obr. 5: Vztah bachorového pH na poměry mezi VFA –kys.propionová, octová a mléčná (Kaufmann et al., 1980)

Kyselina octová

Kyselina octová, acetát, se podílí na obsahu VFA z 60 – 70 %. Čím je v dávce více objemné píče, tím se zastoupení kyseliny octové zvětšuje. Dojnice využívá absorbovanou kyselinu octovou k syntéze mléčného nebo tělesného tuku, proto nazývána lipogenním substrátem, dále na pokrytí tvorby tělesné energie a tepla. Při nízkém zastoupení objemné píče v krmné dávce mikrobiální syntéza kyseliny octové klesá, což má za následek snížení obsahu tuku v mléce. Ke stejným výsledkům vede zkrmování vysokého podílu jaderných koncentrátů nebo jejich rozšrotování najemno (Kudrna and Homolka, 2007).

Kyselina propionová

Kyselina propionová, propionát, se na obsahu VFA podílí z 15 – 20 %. Koncentrace se zvyšuje tehdy, jestliže dieta obsahuje velké množství rozpustného cukru nebo škrobu a ke snížení dochází při zkrmování špatného sena (Reece, 1998). Vysoké dávky koncentrovaných krmiv, s vysokým podílem škrobů a rozpustných sacharidů, podporují tvorbu kyseliny propionové a depresivně působí na tvorbu kyseliny octové a tím i na syntézu mléčného tuku (Kudrna and Homolka, 2007).

Kyselina máselná

Kyselina máselná, butyrát, se na obsahu VFA podílí z 10 – 15 %. Je hlavním zdrojem energie pro bachorovou stěnu. Během absorpce je kyselina máselná v bachorovém epitelu převedena na kyselinu β -hydroxymáselnou, která rovněž patří mezi lipogenní faktory a je využívána k syntéze tělního a mléčného tuku (Kudrna and Homolka, 2007).

Poměr kyselin propionátu a acetátu se zvyšuje v důsledku přítomnosti některých látek. Například antibiotikum monensin inhibuje některé organismy (producenty vodíku) a podporuje jiné (producenty sukcinátu) a tím se poměr kyselin zvyšuje (Reece, 1998).

2.4.5 Vitamíny

Vitamíny jsou organické sloučeniny, nutné k udržení všech životně důležitých funkcí v organismu (zdraví, reprodukce, tvorby užitkovosti apod.). Jsou to také exogenní nezbytné organické katalyzátory metabolických dějů v organismu.

Doposud je známo 14 vitamínů, z toho 4 rozpustné v tucích (A, D, E a K), ostatní jsou rozpustné ve vodě.

Do krmných dávek vysokoužitkových dojnic se zpravidla doplňuje 4 – 5 vitamínů (A, D, E, B₁, niacin). Vitamin A má pozitivní vliv na omezení výskytu mastitid a na počet somatických buněk v mléce. Vitamin E mj. umožňuje dobré využití selenu a niacin zlepšuje využití živin (zejména tuku) a je využíván k prevenci ketózy (Urban et al., 1997). Obecně u dospělých přežvýkavců jsou vitamíny skupiny B většinou v dostatečném množství syntetizovány bachorovými mikroorganismy a dostatečná je také tvorba kyseliny askorbové (vitamín C). Výjimkou mohou být niacin, vitamín B₁, případně cholin. Vyskytnout se může také deficit vitamínu B₁₂ v souvislosti s nedostatečným příjmem kobaltu (Kudrna et al., 1998; Reece, 1998).

2.4.6 Minerální látky

V těle rostlin a živočichů je obsažena většina prvků periodické soustavy. Prvky, které jsou nezbytné pro život organismů, se nazývají biogenní. Existují čtyři základní funkce minerálních prvků, a to: strukturální, fyziologická, katalytická a regulační funkce (Jelínek et al., 2003). Minerální látky obsažené v organismu živočichů tvoří 4 – 5 % jejich hmotnosti. Biologická významnost jednotlivých minerálních látek je velká a jejich nedostatek často způsobuje vážné zdravotní komplikace.

V současné době se krmná dávka dojnic doplňuje minimálně o 5 makroprvků (Ca, P, Na, Mg, Cl) a 6 mikroprvků, nazývaných také stopové prvky (Cu, Co, Se, I, Mn a Zn) (Reece, 1998).

2.5 Probiotika

Termín „probiotika“ má mnoho používaných definic. Všeobecně nejčastěji užívaný výklad je: živé organismy, podávané v přiměřeném množství, mající zdravotní přínos pro hostitele (FAO/WHO, 2002). Tato definice dokazuje, že jsou prokázány účinky probiotik. Mezi úspěšné působení je zahrnována: regulace střevní mikrobiální homeostázy (Salminen et al., 1996), exprese bakteriocinů (Mazmanian et al., 2008), enzymatická aktivita podporující absorpci a výživu (Hooper et al., 2002;

Timmerman et al., 2005) a imuno-modulační účinky (Ewaschuk et al., 2004; Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Salzman et al., 2003; Uyeno et al., 2015). Dle Vandelpas et al., (2015) mohou probiotika ochránit hostitele před infekcí. U probiotik bylo také prokázáno, že zvyšují ochranu proti toxinům vytvořených patogenními bakteriemi a inhibují růst a šíření patogenních mikroorganismů (Mapple et al., 2012; Guerra-Ordaz et al., 2013). Probiotické účinky je velmi těžké specifikovat a nelze je zobecňovat. Jeden kmen může vykazovat odlišné výhody při užití samostatně či v kombinaci s jiným kmenem. Výhody se také liší na základě druhu jedince (Chapman et al., 2011), charakteru krmné dávky, denní dávky krmiva a stabilitou produktu (Rada and Marounek, 2005). Cílem aplikace mnoha probiotik je prevence a léčba poruch spojených s gastrointestinálním traktem (GIT) (Charalampopoulos and Rastall, 2009). Očekávané vlastnosti probiotik a jejich kritéria jsou uvedeny v tabulce 1 .

Tab.1 .

Vlastnosti a kritéria probiotik (Gaggia et al., 2010)

Netoxické a nepatogenní

Přesná taxonomická identifikace

Původní organismy cílového druhu

Přežívají, kolonizují a jsou metabolicky aktivní v cílovém místě, což znamená:

Odolnost vůči žaludeční šťávě a žluči

Přetrvání v trávicím traktu

Přilnavost na epitel či hlen

Konkurence s rezidentní mikrobiotou

Antagonismus vůči patogenním bakteriím

Stimulace imunitní odpovědi

Genetická stabilita

Poddajnost kmene a stabilita požadovaných vlastností v průběhu zpracování, skladování a aplikováním

Životaschopnost při vysokých počtech v populaci

Žádoucí organoleptické a technické vlastnosti

2.5.1 Hlavní probiotické druhy

Seznam probiotických druhů, užívaných ve studiích krmných dávek je uveden v tabulce 2 . (příloha). *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* a *Saccharomyces* jsou nejčastěji užívaná probiotika u hospodářských zvířat (Gaggia et al., 2010).

2.5.1.1 *Lactobacillus*

Tento rod obsahuje více než 100 druhů a je velice heterogenní. Patří do skupiny bakterií, které produkují kyselinu mléčnou. Mnohé jsou důležitou střevní mikrobiotou jak zvířat, tak i lidí. Někteří zástupci jsou také záměrně užíváni v potravinách (Vesterlund et al., 2007).

2.5.1.2 *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* patří do skupin bakterií produkující kyselinu mléčnou. Druhy tohoto rodu se vyskytují běžně v potravinách. Enterokoky jsou běžnými obyvateli lidské i zvířecí střevní mikrobioty. *E. faecium* a *E. faecalis* jsou nejčastější druhy u lidí. Zatímco *E. faecium* se vyskytuje nejvíce u zvířat (Fisher and Phillip, 2009).

2.5.1.3 *Bacillus*

Druhy rodu *Bacillus* jsou Gram-pozitivní, sporující bakterie, které se běžně vyskytují v půdě, vodě či vzduchu. Ve střevním traktu se jedná o nepůvodní druhy, nejčastěji v důsledku požití kontaminovaného krmiva (Sandres et al., 2003). Přesto jsou některé druhy vhodné jako probiotika. K významným z tohoto rodu patří *B. clausii*, který patří k nejprozkoumanějším probiotikům z hlediska rezistence vůči antibiotikům a nepřenositeli této rezistence na patogenní mikroorganismy (Frühauf et al., 2011).

2.5.1.4 *Saccharomyces*

Kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou součástí zbytkového mikrobiálního systému střevní mikrobioty. Druh *S. cerevisiae* je běžně rozšířený v přírodě (ovoce, rostliny, půda). Je obsažen v potravinách a nápojích a hraje klíčovou roli v procesu kvašení (Kühle and Jespersen, 2003).

2.5.1.5 *Bifidobacterium*

Nachází se ve střevním traktu zvířat i lidí. Bifidobakterie jsou považovány za jeden z klíčových rodů. Jejich přítomnost ve vysokém počtu je spojena s dobrým zdravotním stavem hostitele. Existuje obecné pravidlo, že přítomnost tohoto rodu v trávicím traktu vede k udržení rovnováhy mikroflóry, čímž snižuje riziko infekce patogenem (Biavati and Mattarelli, 2006).

2.5.2 Probiotika a imunitní systém

Probiotika jsou rozpoznávána imunitním systémem hostitele pomocí receptorů přirozené imunity enterocytů a profesionálních imunitních buněk střevní sliznice podobně jako komensální mikroflóra a patogenní mikroorganismy. Také probiotika modulují imunitní odpověď, avšak v mutualistické – vzájemně prospěšné kooperaci s imunitním systémem hostitele. Řada probiotik indukuje protizánětlivý cytokin interleucin-10 a transformační růstový faktor - beta (TGF - β), který hraje důležitou roli v lokální toleranci, snižuje patologický zánět, indukuje diferenciaci T-regulačních lymfocytů a podporuje tvorbu slizničních protilátek. Bylo prokázáno, že probiotika snižují závažnost následné injekce patogenními mikroorganismy. Probiotika zvyšují sekreci mucinu a produkci antimikrobiálních peptidů ve střevě a tím i rezistenci hostitele proti bakteriální infekci (Toman et al., 2009).

2.5.3 Probiotika a přežvýkavci

Studie o užívání probiotik byly prováděny hlavně u mláďat a dospělých přežvýkavců, s ohledem na zdravotní stav jednice (snížení výskytu průjmů a patogenních mikroorganismů) a ekonomické parametry. Z přežvýkavců byla probiotika studována nejvíce u skotu, méně u ovcí a koz (Gaggia et al., 2010). U telat při podávání probiotik bylo zaznamenáno zlepšení funkce bachoru a přibývání na váze (Adams et al., 2008). U přežvýkavců sloužící k mléčné produkci, při aplikaci kvasinek, byl prokázán zlepšený zdravotní stav a zvýšená produkce mléka (Jouany, 2006; Sttela et al., 2007).

2.6 Stravitelnost krmiv

Definice stravitelnosti krmiva je, že u množství krmiva, které nebylo vyloučeno stolicí, se předpokládá, že bylo absorbováno zvířetem. Tato definice není zcela pravdivá například při produkci metanu, dochází k ztrátě plynu říháním, a není tak absorbován. Výkaly také obsahují, kromě zbytků krmiva, enzymy a jiné látky vylučované do střeva, které také nejsou vstřebávány stejně jako části střevní výstelky. Množství metabolického materiálu vylučovaného stolicí je v rozmezí od 0,098 do 0,129 g.g⁻¹ příjmu sušiny (Givens et al., 2000).

3. Materiál a metodika

Pokus probíhal v akreditované stáji účelového zařízení školního zemědělského statku ve Čtyřech dvorech od 25.8. 2015 do 29.1. 2016.

3.1 Zvířata a experimentální design

Byly použity dvě dospělé krávy plemena Aberdeen-angus se zavedenou permanentní bachorovou kanylou (\varnothing 13 cm) k vyhodnocení účinku podávání probiotik rodu *Bifidobacterium* sp. (10^7 g⁻¹). Pokusná zvířata byla ustájena volně v boxových lóžích s přístupem *ad libitum* k napáječce s vodou a k lizu. Průměrná tělesná hmotnost během pokusu byla u prvního zvířete $799 \pm 7,1$ kg u druhého zvířete 594 ± 9 kg. Probiotika *Bifidobacterium* sp. byla podávána v lyofilizované formě po 2 g rozmíchána ve 100 ml pitné vody a aplikována přes píštěl do bachoru každý den v 9:00 během celého návykového a pokusného období.

Pokus probíhal ve dvou opakováních, která měla shodná schéma aktivit (tab. 2). Během jednoho opakování byly do pokusného období zařazeny postupně obě krávy. Ve třetím kontrolním období, zvířata dostávaly základní krmnou dávku (ZKD). Během celého pokusu bylo sledováno stájové mikroklima pomocí datalogeru.

Schéma organizace jednotlivých období pokusu:

a) **Příprava** - 14 dní

- zvířata po dobu přípravy přijímala pouze ZKD, z důvodu uvedení bachorové mikroflóry u obou zvířat do stejného fyziologického stavu
- v průběhu byly provedeny odběry bachorové tekutiny a vzorky výkalů a provedena jejich analýza

b) **Návykové období** - 14 dní

- zvířata během návykového období dostávala ZKD a byla aplikována probiotika
- cílem bylo přivyknutí bachorové mikroflóry na aplikované krmné aditivum
- byla odebírána bachorová tekutina a výkaly pro laboratorní analýzu

c) **Pokusné období** - 21 dní

- zvířata dostávala ZKD zároveň s probiotiky, byla odebírána bachorová tekutina a výkaly na analýzu v laboratoři

Tab. 2

zvíře	příprava	návyk	pokus	návyk	pokus	návyk	pokus	návyk	pokus
1	ZKD	ZKD + P	ZKD + P	ZKD	ZKD	ZKD + P	ZKD+P	ZKD	ZKD
2	ZKD	ZKD	ZKD	ZKD + P	ZKD + P	ZKD	ZKD	ZKD + P	ZKD + P

ZKD – základní krmná dávka

ZKD – kontrola

ZKD + P – pokus

3.2 Krmení

Zvířata byla krmena dvakrát denně (06:00 a 15:00). Základní krmná dávka byla složena z příjmu vody *ad libitum* a ze sena. Krmná dávka zvířete 1 byla vypočítána podle hmotnosti jedince na 7 - 7,5 kg sena (průměr $7,25 \pm 0,16$ kg). Pro zvíře 2 byla stanovena na 5 - 5,5 kg (průměr $5,3 \pm 0,15$ kg). Množství vypité vody bylo zaznamenáváno při ranním krmení. Zvíře 1 vypilo průměrně $31 \pm 7,8$ l . den⁻¹, zvíře 2 vypilo průměrně $33 \pm 6,7$ l . den⁻¹.

3.3 Odběr vzorků

3.3.2 Odběr bachorové tekutiny

Vzorky bachorové tekutiny byly odebírány ve všech třech obdobích 3 hodiny po ranním nakrmení 3x týdně, vždy v pondělí, ve středu a v pátek. Vlastní odběr byl prováděn přes bachorovou kanylu sondou připojenou na podtlakovou ruční pumpu, podle Hofírek and Dvořák (2002). Bachorová tekutina byla ihned dopravena do laboratoře. Pro následné laboratorní rozborů byly vzorky přefiltrovány přes gázu. Bachorová tekutina byla užita ke stanovení pH, analýze dusíkatých látek, VFA a pro stanovení počtu nálevníků.

3.3.2 Odběr výkalů

Vzorky výkalů byly získávány manuálním odběrem přímo z rekta a v plastových vzorkovnicích dopraveny neprodleně do laboratoře k rozborům. Výkaly byly odebírány stejně jako vzorky bachorové tekutiny, tedy 3 hodiny po nakrmení.

3.4 Analýza vzorků

3.4.1 Bachorová tekutina

Stanovení dusíkatých látek - dusíkaté látky (NL) byly ve vzorcích lyofilizované bachorové tekutiny stanoveny po mineralizaci, destilaci a titraci na přístroji KJELTEC metodou podle Kjeldahla (AOAC, 2005).

Měření koncentrace vodíkových iontů (pH) - pro měření pH vzorků elektrometrickým stanovením byl použit digitální pH metr INOLAB PH LEVEL 2 .

Stanovení těkavých mastných kyselin - těkavé mastné kyseliny byly stanoveny izotachoforetickou metodou dělení iontů na základě rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném poli na přístroji Ionosep 2001 podle aplikačních listů RECMAN LABORATORNÍ TECHNIKA.

Stanovení obsahu protozoí - množství protozoí v bachorové tekutině bylo zjištěno přepočtem v Bürkerově komůrce po obarvení a naředění vzorků 0,1% roztokem metylenové modři v poměru 1 :10. Pro stanovení celkového počtu protozoí v 1 ml bachorové tekutiny byl zjištěný počet vynásoben faktorem 10000 zahrnujícím faktor komůrky a index ředění (Trávníček et al., 1998).

3.4.2 Výkaly

Laboratorní sušina - vzorky výkalů byly nejprve předsoušeny na petriho miskách ve skříňové sušárně 48 hodin při 55 °C. Pro stanovení laboratorní sušiny byly všechny následně sušeny ve vysoušecích miskách ve skříňové sušárně při 103 °C po dobu 4 hodin.

Stanovení dusíkatých látek - zde byly použity předsušené vzorky výkalů. NL byly stanoveny po mineralizaci, destilaci a titraci na přístroji Kjeltec metodou podle Kjeldahla (AOAC, 2005). Výsledky byly přepočítány na laboratorní sušinu.

Stanovení organické hmoty - vysušené vzorky výkalů byly spalovány v Muflové peci při 550 °C po dobu 6 hodin. Organická hmota byla zjištěna z rozdílu sušené hmoty a množství popela.

3.5 Statistická analýza

Nejprve byly testovány jednotlivé proměnné pH, kyseliny octová, propionová, máselná a čpavek jako prediktory vůči probiotikům a poté vůči nálevníkům pomocí lineárních regresních modelů (LM), vliv probiotik byl dále testován také na stravitelnost sena a množství sušiny. Pro vyhodnocení vlivu probiotik, pH kyselin octové, propionové a máselné, čpavku a stravitelnosti sena na početnost nálevníků (log-transformovaná data) byl použit LM s normálním rozdělením. V modelu byly nejprve použity všechny vysvětlující proměnné a model byl pak zjednodušován (*backward selection*) pomocí funkce *stepAIC* na výsledný model nejlépe popisující sesbíraná data. K zohlednění efektu jedince (jelikož byly použity pouze dvě zvířata) byla proměnná zvíře (1 či 2) použita jako pevný efekt v dalším LM. Pro zjištění vlivu probiotik byla v jednotlivých LM testována vždy vysvětlující proměnná (pH, VFA, stravitelnost a množství nálevníků) vůči probiotikům. Data byla analyzována v programu R verze 3.1.2 (R Development Core Team, 2014), pro vizualizaci grafů byla použita knihovna *ggplot2* (Wickham, 2009) a pro vizualizaci výsledků konečného modelu byla využita knihovna *effects* (Fox, 2003) a program Excel (REF).

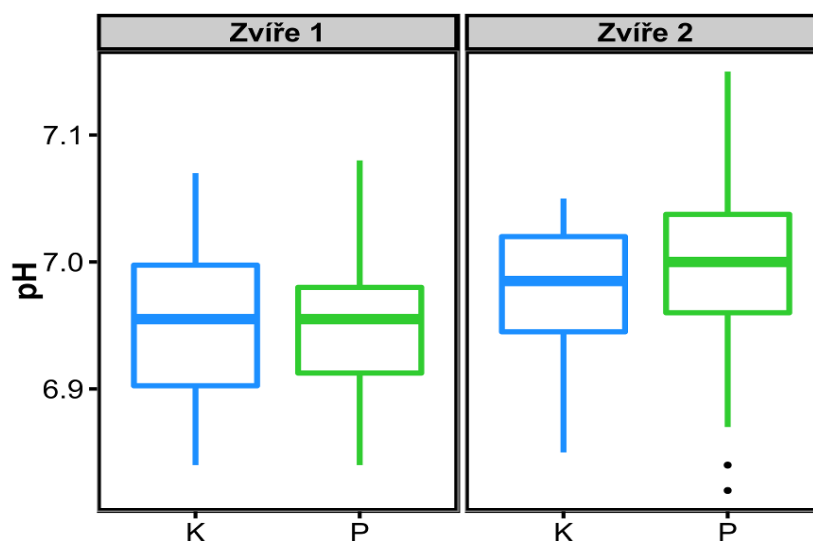
4. Výsledky

4.1 Analýza bachorové tekutiny

Celkem bylo odebráno 60 vzorků bachorové tekutiny od každého jedince. Z bachorové tekutiny byla měřena hodnota pH, množství VFA (kyselina octová, máselná, propionová), množství dusíkatých látek (NH_3) a počty protozoí.

pH

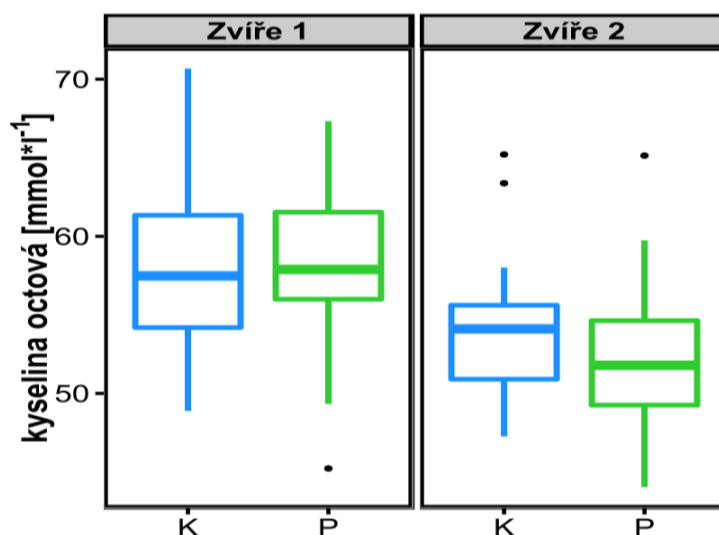
Naměřené hodnoty znázorňující obr. 6 nám ukazují minimální rozdíl mezi jednotlivými skupinami ($F_{1,117} = 0,059$; $p = 0,807$). U zvířete 2 došlo při pokusu k nepatrnému navýšení průměrné hodnoty pH. Průměrná pH u obou jedinců se pohybovala mezi hodnotami 6,9 - 7,0.



Obr. 6: Krabicový graf znázorňující hodnoty pH u obou testovaných jedinců, rozlišující skupiny (K= kontrola, P= pokus). Boxy znázorňují medián hodnot, první a třetí kvartil. Úsečky jsou 95% konfidenční intervaly.

Kyselina octová

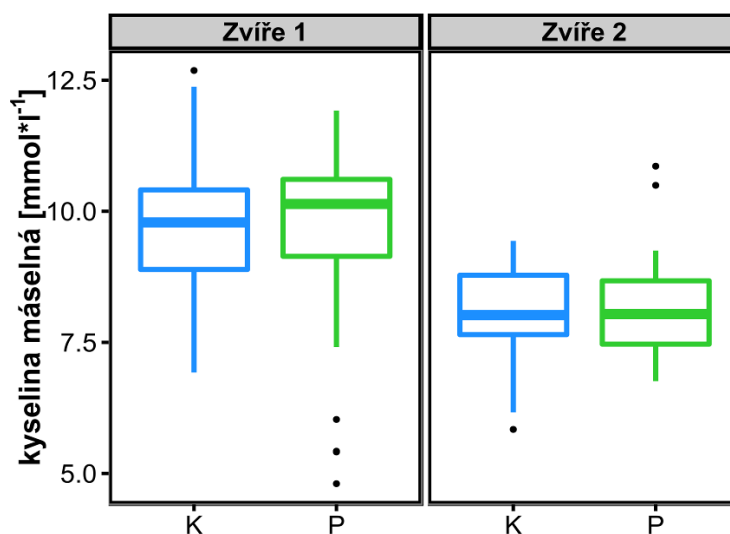
Obr. 7 představuje průměrné naměřené hodnoty kyseliny octové v bachorové tekutině. Celkově nenastaly změny mezi jednotlivými skupinami ($F_{1,117} = 0,4277$; $p = 0,5144$). U zvířete 2 došlo v pokusném období ke snížení průměru.



Obr. 7: Krabicový graf znázorňující naměřené hodnoty kyseliny octové v bachoru u obou testovaných jedinců (vysvětlivky viz obr. 6).

Kyselina máselná

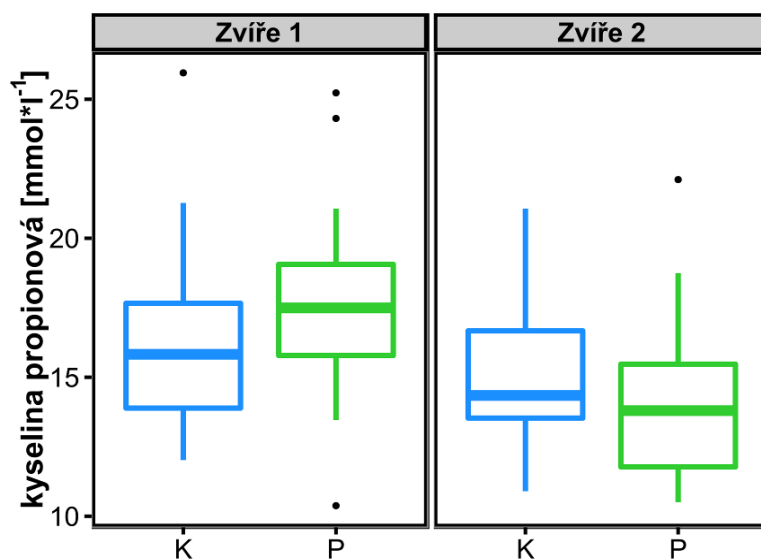
Průměrné hodnoty množství kyseliny máselné se mezi jednotlivými skupinami neliší ($F_{1,117} = 0,0001$; $p = 0,991$). Hodnoty se liší pouze mezi jedinci.



Obr. 8: Krabicový graf znázorňující naměřené množství [mmol.l⁻¹] kyseliny máselné u obou testovaných jedinců (vysvětlivky viz obr. 6).

Kyselina propionová

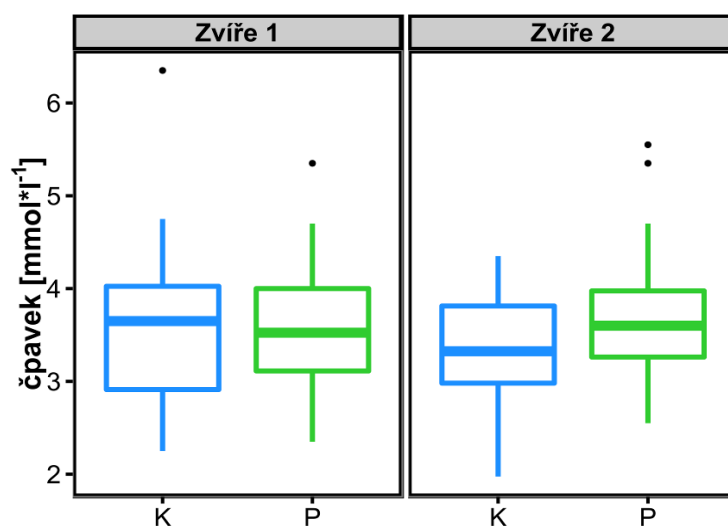
Naměřené hodnoty zobrazující obr. 9 ukazují průměrné množství kyseliny propionové v bachorové tekutině. K průkaznému rozdílu mezi skupinami nedošlo ($F_{1,117} = 0,1163$; $p = 0,7337$). Z obrázku je patrné, že u zvířete 1 v pokusu průměr hodnot narostl, naproti tomu u zvířete 2 průměr hodnot v pokusném období klesl.



Obr. 9: Krabicový graf znázorňující množství [mmol.l⁻¹] kyseliny propionové (vysvětlivky viz obr. 6).

Amoniak

Obr. 10 ukazuje průměrné naměřené hodnoty množství NH_3 u obou jedinců. Rozdíly mezi skupinami nebyly prokázány ($F_{1,117} = 1,1943$; $p = 0,2767$). U zvířete jedna průměr mírně poklesl v pokusné skupině, naproti tomu u zvířete dva průměr mírně narostl.



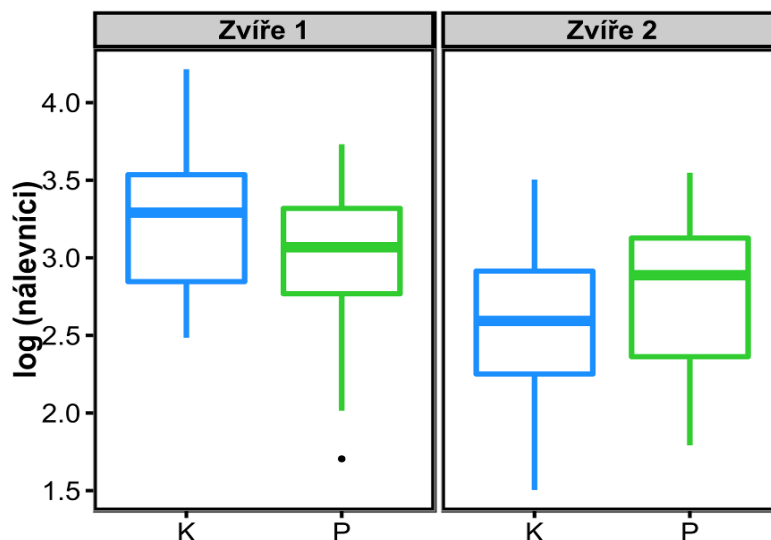
Obr. 10 : Krabicový graf znázorňující množství $[\text{mmol.l}^{-1}]$ obsahu amoniaku v bacheru u obou testovaných jedinců (vysvětlivky viz Obr. 6).

Nálevníci

Množství nálevníků se průkazně lišilo pouze mezi jedinci ($F_{1,112} = 26,899$; $p < 0,0001$) nikoliv mezi jednotlivými skupinami. Z obr. 11 je patrný pokles zlogaritmovaného množství nálevníků u zvířete 1. U zvířete 2 se průměrné počty nálevníků mírně navýšily.

Tab. 3: Nelogaritmované průměry nálevníků v bacheru.

	Zvíře 1		Zvíře 2	
	K	P	K	P
nálevníci $10^4 \cdot \text{l}^{-1}$	$20,9 \pm 10,1$	$19,45 \pm 9,1$	$17,6 \pm 7,9$	$20,6 \pm 9,6$



Obr. 11: Krabicový graf znázorňující množství nálevníků v bachoru u obou testovaných jedinců (vysvětlivky viz Obr. 6).

Statistické hodnocení bachorové tekutiny

Nejdříve byl testován vliv proměnných na množství nálevníků v bachoru bez efektu jedince, pomocí LM (tab. 4) z kterého vyšly průkazně hodnoty pH ($F_{1,113} = 4,1674$; $p = 0,04$) a množství kyseliny octové ($F_{1,113} = 6,6834$; $p = 0,011$). LM byl následně zjednodušován ve výsledný lineární model (tab.5), nejlépe popisující získaná data, kde vyšla průkazně proměnná kyselina octová ($F_{1,117} = 10,56$; $p = 0,001$) a neprůkazně kyselina máselná ($F_{1,117} = 3,07$; $p = 0,08$). Následně byla data testována vůči vlivu skupiny (pokus, kontrola) s pevným efektem jedince. Tab. 6 ukazuje přehled výsledků jednotlivých testování, kde byly všechny proměnné neprůkazné.

Tab.4 : Základní lineární model před zjednodušením bez efektu jedince.

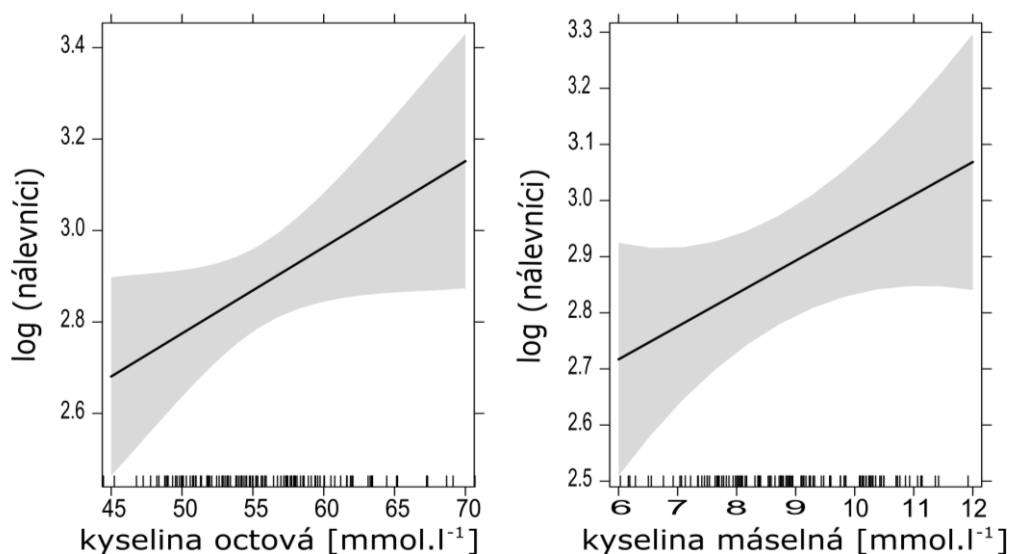
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	P
pH	1	1,0332	1,03317	4,1674	0,04354*
kys. octová	1	1,6569	1,65693	6,6834	0,011**
kys. máselná	1	0,6646	0,66457	2,6806	0,10436
kys. propionová	1	0,1101	0,11014	0,4442	0,50644
amoniak	1	0,0937	0,09372	0,378	0,5399

signif. kódy: ** 0,01 ; * 0,05

Tab. 5: Výsledný lineární model nejlépe popisující ovlivnění množství nálevníků sledovanými proměnnými, množství [mmol.l⁻¹] kyseliny máselné, propionové, octové, hladina pH a množství čpavku v bachorové tekutině obou pokusných zvířat.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p
kys. octová	1	2,553	2,553	10,56	0,001509 ***
kys. máselná	1	0,7422	0,7422	3,07	0,082369 *

signif. kódy: *** 0,001; * >0,05



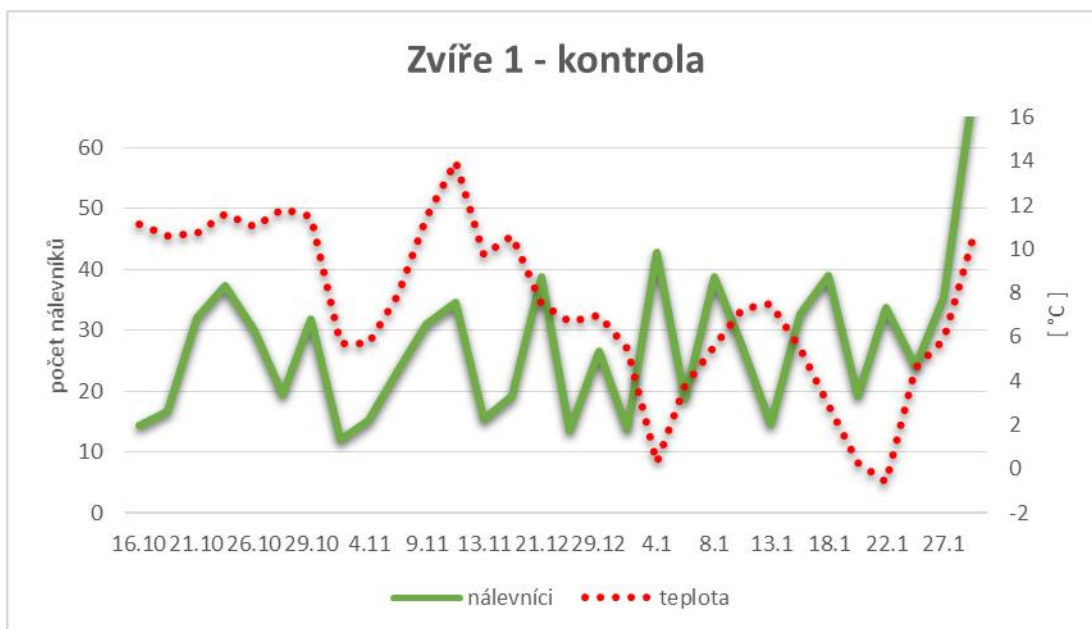
Obr. 12: Vizualizace výsledného lineárního modelu znázorňující stoupající množství kyseliny octové a máselné se zvyšujícím se počtem nálevníků. Šedé zóny znázorňují 95% konfidenční interval.

Tab.6: Souhrnné výsledky jednotlivých modelů, které testovali jednotlivé proměnné vůči skupině (pokus, kontrola) s pevným efektem jedince. Hodnota p u všech proměnných vyšla neprůkazně. Zároveň vždy vyšel průkazně efekt jedince.

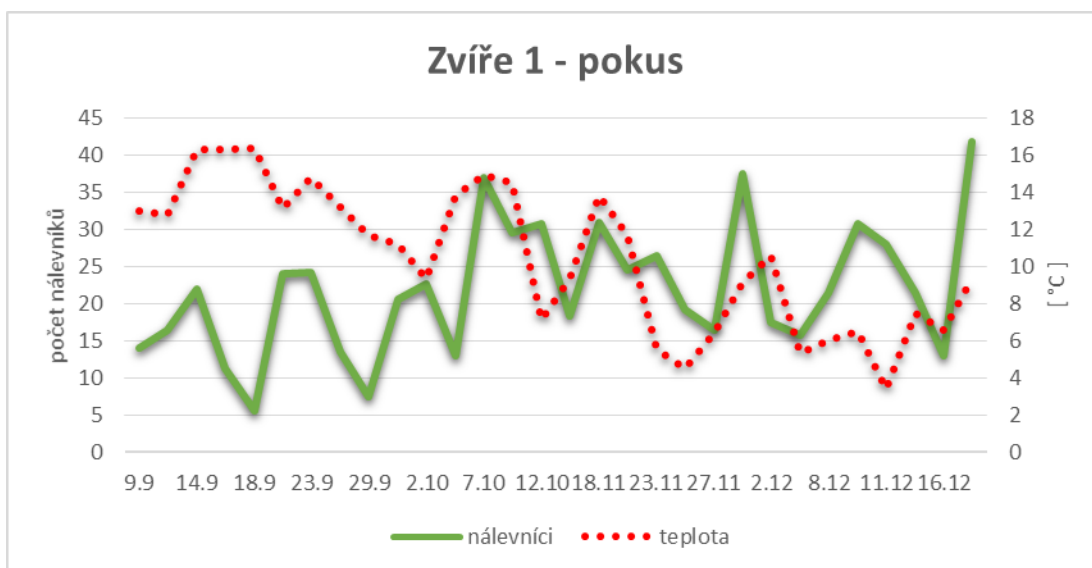
	skupinat				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p
pH	1	0,00027	0,00027	0,0599	0,80714
kys. octová	1	10,33	10,33	0,4277	0,5144
kys. máselná	1	0	0	0,0001	0,991
kys. propionová	1	0,95	0,948	0,1163	0,7337
amoniak	1	0,585	0,58451	1,1943	0,2767
nálevníci	1	42,6	42,64	0,4995	0,4811

Teplota

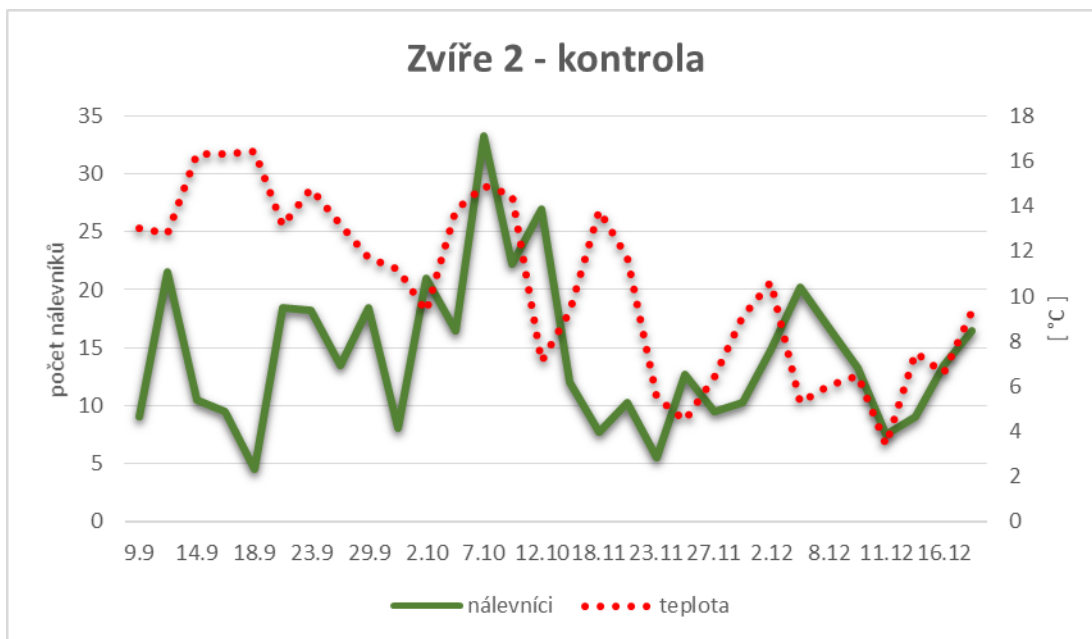
Obr. 13 až 16 ukazují počty nálevníků v porovnání s naměřenou teplotou vždy při odběru vzorků. Z obrázků můžeme vyčíst částečnou korelaci teploty s množstvím nálevníků.



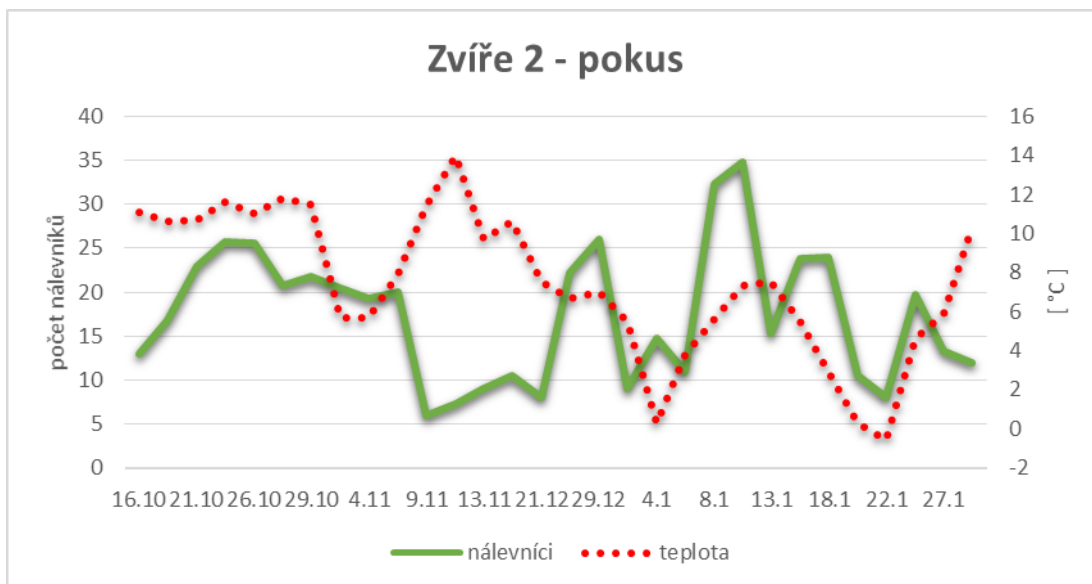
Obr. 13: Porovnání průměrných denních teplot s počtem nálevníků u kontrolního období zvířete 1.



Obr. 14: Porovnání průměrných denních teplot s počtem nálevníků u pokusného období zvířete 1.



Obr. 15: Porovnání průměrných denních teplot s počtem nálevníků u kontrolního období zvířete 2.



Obr. 16: Porovnání průměrných denních teplot s s počtem nálevníků u pokusného období zvířete 2.

Využitelnost krmiv

Tab. 7: Souhrnné výsledky testování jednotlivých proměnných vůči skupině (pokus, kontrola) s pevným efektem jedince. Hodnota p u všech proměnných vyšla neprůkazně. Efekt jedince vyšel průkazně u % popeloviny a % NDF.

	skupina				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p
lab. sušina	1	2,813	2,81296	1,6409	0,2027
% popeloviny	1	0,139	0,139	0,1974	0,6576
% NDF	1	16,83	16,834	1,9995	0,16

Tab. 8: Průměrné naměřené hodnoty.

[%]	Zvíře 1		Zvíře 2	
	K	P	K	P
popel	7,9 ± 0,9	8,1 ± 1,0	8,08 ± 1,1	7,9 ± 1,0
NDF	58,3 ± 3,4	58,4 ± 2,6	58,18 ± 2,5	58,29 ± 3,4

5. Diskuze

Cílem mé práce bylo zjistit jaký má vliv podávání probiotických krmných aditiv *Bifidobacterium* sp. na množství VFA, čpavku, nálevníků, na hodnoty pH v bachoru skotu a na celkovou stravitelnost krmiva.

Bylo prokázáno, že probiotka mají vliv na stabilizaci pH, zlepšený příjem živin od bachorové mikrobioty k hostiteli a zlepšení bachorového prostředí (Beauchemin et al., 2003; Chiquette et al., 2012, 2008).

Vliv probiotik na hodnoty pH v mé studii nebyl prokázán, byl pouze prokázán vliv jedince, který uvádí ve své studii také Ritz et al. (2014). U obou skupin byly hodnoty pH v průměrech mezi 6,9 - 7,0. Optimální hodnota pH bachorové tekutiny je v rozmezí od 6,2 - 7,2 (Jackson and Cockcroft, 2002). Relativně vysoké pH bachorové tekutiny je dáno krmnou dávkou. Pro zvířata krmená objemnými krmivy se pH pohybuje v oblasti 6,2 - 6,8. Pokud převážný podíl krmné dávky tvoří seno, může se pH zvýšit i nad hodnotu 7 (Strapák, 2013). Qadis et al. (2014) uvádí pH 6,6 – 6,8 jako konstantní pH v pokusné skupině a průkazný vliv probiotik na hodnoty pH. Další průkazný vliv probiotik na pH uvádí také Wang et al. (2016). U všech je pravděpodobné, že má vliv na průkaznost druh probiotik. Qadis et al. (2014) použili ve své studii probiotika kombinací *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* a *Clostridium butyricum* a Wang et al. (2016) *Bacillus subtilis* natto oproti mé studii kde byla používáno probiotikum *Bifidobacterium* sp., protože jejich vliv byl sice již prokázán (Charteris et al., 1997; Russell et al., 2011), ale zatím nám není známa studie, při které byli jedinci krmeni pouze senem.

Hodnoty pH souvisí s produkcí těkavých mastných kyselin (Bannink, 2007). Na množství VFA v bachorové tekutině probiotika neměla vliv, stejně jako v dalších studiích (Qadis et al., 2014). Wang et al. (2016) uvádí, že probiotika snižují koncentrace kyseliny propionové a octové, což je opak studie Beauchemin et al. (2003). U všech VFA v mé studii byl prokázán pouze vliv jedince. U zvířete 2 jsou celkově VFA nižších hodnot, pravděpodobně z důvodu nižšího tělesného rámce jedince. Ostatní VFA se v bachorovém prostředí vyskytují ve stopovém množství a tím jsou zanedbatelné.

Pro posouzení bachorové fermentace a množení samotných mikroorganismů je důležitým kritériem obsah amoniakových iontů. Hladina amoniaku v bachoru závisí na pH bachorové tekutiny.

Při pH nad 7,3 převládá neionizovaná forma NH_3 (Jelínek et al., 2003). Z tabulky č.10 v příloze můžeme vyčíst, že se průměrné naměřené hodnoty amoniaku pohybovaly od $2,89 \pm 0,7$ do $3,89 \pm 0,6 \text{ mmol.l}^{-1}$. Optimum pro mikrobiální syntézu je $2,9 - 3,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ (Firkins et al., 2007; Jallow and Hsia, 2011). Z tabulky můžeme také vyčíst, že se průměry zvyšovaly, oproti období před pokusem. K navýšení ovšem došlo i v kontrolních obdobích u obou jedinců, což může být zapříčiněno střídáním pokusných a kontrolních období u jedince. Li et al. (2009) konstatují, že hodnoty koncentrací amoniaku, jsou závislé na místě odběru bachorové tekutiny. Hodnoty ze vzorků z oblasti centrálního bachoru mohou být až 10krát nižší, než hodnoty ze vzorků odebraných z částí kraniálních.

Bachorová tekutina řádově obsahuje 10^6 protozoí (Saleem et al., 2013). Tyto mikroorganismy jsou velmi citlivé k dietárním změnám a velmi rychle reagují na změny podmínek, zejména pH (Pfeffer and Hristov, 2005). Po aplikaci probiotik u zvířete dva došlo k mírnému nárůstu nálevníků, statistická průkaznost byla však nesignifikantní u obou pokusných zvířat.

Pokusná zvířata byla krmena pouze senem. Kvalitní seno by mělo obsahovat 90 – 130 g/kg stravitelných dusíkatých látek (Ribeiro et al., 2011). Neprůkazné výsledky ve stravitelnosti mezi jednotlivými skupinami, pravděpodobně způsobuje fakt, že pokusná zvířata byla krmena pouze senem. Kdyby se krmilo siláží, mohly být výsledky prokazatelné, jako v jiných studiích (Cao et al., 2011; Contreras-Govea et al., 2013; Guedes et al., 2008; Han et al., 2014).

Podle studií Giancesella et al., (2012) a Tajima et al. (2007) souvisí nižší teplota okolního prostředí s vyšší bachorovou fermentací, tedy s nárůstem koncentrace těkavých mastných kyselin i amonných iontů. Na bachorové fermentaci se kromě teploty vnějšího prostředí významně podílí i vzdušná vlhkost. Pokud v období, kdy je vyšší teplota, je i vyšší vlhkost ovzduší, mohou být fermentační charakteristiky naopak vyšší v porovnání s obdobím s teplotami nižšími. Teplota i vzdušná vlhkost mají vliv i na množství a zastoupení bachorové mikroflóry (Tajima et al., 2007).

Neprůkaznost mého pokusu mohla být také z důvodu nízkého počtu zvířat, které je zapříčiněno hlavně z prostorových a finančních nedostatků. Je také velice složité získat oprávnění na kanylací zvířat a na samotnou manipulaci. Ve studiích Qadis et al. (2014) a Lee et al., (2004b) bylo užito k experimentu pouze dvanáct

kanylovaných jedinců a ve studii Guedes et al. (2008) dokonce pouze tři jedinci, což je pro statistické zpracování také nízký počet.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo zjistit vliv probiotických krmných aditiv (směs druhů *Bifidobacterium*) na funkční stav bachoru a na celkovou stravitelnost krmiv.

Ze získaných dat a následných analýz pomocí lineárního modelu nevyšel žádný průkazný výsledek, a tím nebyl vliv probiotik *Bifidobacterium* sp. v tomto pokusu prokázán. V testech vyšli pouze průkazně vliv kyseliny octové a nejlépe neprůkazně kyselina máselná, které zvyšovaly společenstva nálevníků, avšak tento výsledek nevyšel průkazně v dalším testu, kde byl do analýzy přidán jedinec jako pevný efekt. Výsledky pokusu mohly být ovlivněny nízkým počtem replikací aplikace probiotik a také nízkým počtem zvířat. Nízký počet zvířat je dán hlavně vysokými náklady na jejich provoz a také náročností aplikování kanyly a nakonec i samotným získáním povolením na manipulaci se zvířaty.

Dále mohlo výsledky ovlivnit krátké aplikování probiotik a rychlé střídání jednotlivých skupin (pokusu a kontroly). Nakonec na neprůkaznost výsledků mohl mít vliv druh probiotik (*Bifidobacterium* sp.) a množství dávky těchto probiotik.

V dalším výzkumu by bylo vhodné sledovat i ovlivnění aminokyselin v bachoru, jelikož jejich zvýšení by pozitivně ovlivnilo stravitelnost krmiv a také vyzkoušet jiné druhy probiotik či testovat jejich různé dávkování.

7. Seznam literatury

- Adams, M. C., Luo, J., Rayward, D., King, S., Gibson, R., Moghaddam, G.H., 2008. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 41–52.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis, in: Aoac International, 18 Th Edition. Gaithersburg.
- Bannink, A., 2007. Modelling Volatile Fatty Acid, Dynamics and Rumen function in lactating cows. Wageningen University: Ponsen & Looijen, 133–163.
- Beauchemin, K. a., Yang, W.Z., Morgavi, D.P., Ghorbani, G.R., Kautz, W., Leedle, J.A., 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81, 1628–1640.
- Biavati, B., Mattarelli, P., 2006. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworkin, M., Hansen, P. A., Lessel, E. F. (Eds.), *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer-Verlag, New York, 322–382.
- Bouška, J., Doležal, O., Jílek, F., Kudrna, V., Kvapilík, J., Příbyl, J., Rajmon, R., Sedmíková, M., Skřivanová, V., Šlosárková, S., Tyrolová, Y., Vacek, M., Žižlavský, J., 2006. *Chov dojeného skotu*. Profi press, Praha, 186.
- Brod, D.L., Bolsen, K.K., Brent, B.E., 1982. Effect of water temperature on rumen temperature, digestion and rumen fermentation in sheep. *J. Anim. Sci.* 54, 179–182.
- Cameron, S.L., 2003. Taxonomy and phylogeny of endosymbiotic Ciliates (Ciliophora: Litostomatea) associated with Australian herbivorous marsupials. *Int. J. Parasitol.* 33, 347–355.
- Cao, Y., Cai, Y., Tajahashi, T., Yoshida, N., Tohno, M., Uegaki, R., Nonaka, K., Terada, F., 2011. Effect of lactic acid bacteria inoculant and beet pulp addition on fermentation characteristics and in vitro ruminal digestion of vegetable residue silage. *J. Dairy Sci.* 94, 3902–3912.
- Castillo-Gonzalez, A R., Burrola-Barraza, M.E., Dominguez-Viveros, J., Chavez-Martinez, a, 2014. Rumen microorganisms and fermentation Microorganismos y fermentación ruminal. *Arch Med Vet* 46, 349–361.
- Contreras-Govea, F.E., Muck, R.E., Broderick, G. a., Weimer, P.J., 2013. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179, 61–68.
- Červený, Č., Komárek, V., Štěrbá, O., 1999. *Koldův atlas veterinární anatomie*. Grada Publishing, Praha, 701.

- Dey, A., Sehgal, J.P., Puniya, A.K., Singh, K., 2004. Influence of an anaerobic fungal culture (*Orpinomyces* sp.) administration on growth rate, ruminal fermentation and nutrient digestion in calves. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 17, 733–884.
- Ducháček, L., Lamka, J., 2014. *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Karolinum Press, 145.
- Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., Chirino-Trejo, M., Zello, G. A., 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can. J. Vet. Res.* 68, 249–253.
- FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. guidelines for the evaluation of probiotics in food. 1–11.
- Firkins, J.L., Yu, Z., Morrison, M., 2007. Ruminal nitrogen metabolism: Perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *J Dairy Sci* 90, 1–16.
- Fisher, K., Phillip, P., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- Flint, H.J., 1997. The rumen microbial ecosystem--some recent developments. *Trends Microbiol.* 5, 483–488.
- Fox, J., 2003. Effect displays in R for Generalised Linear Models. *J. Stat. Softw.* 1–27.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Valencia, M.J., Martínez, M., Abin-Carriquiry, A., Cajarville, C., Zunino, P., 2013. Evaluation of native potential probiotic bacteria using an in vitro ruminal fermentation system. *Ann. Microbiol.* 64, 1149–1156.
- Frandsen, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013. *Anatomy and physiology of farm animals: Edition 7*. John Wiley & Sons, 528.
- Frühauf, M.P., Slíva, M.J., Ph, D., Ambrožová, M.H., Ph, D., Kotlářová, M.L., 2011. *Bacillus clausii*- probiotikum rezistentní vůči antibiotikům 12, 361–362.
- Fuller, M.F., 2004. *The encyclopedia of farm animal nutrition*. CABI Publishing, 488–493.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S15–S28.
- Gianesella, M., Piccione, G., Cannizzo, C., Casella, S., Morgante, M., 2012. Influence of temperature and humidity on rumen pH and fatty acids in dairy cows. *J. Environ. Biol.* 33, 1093–1096.
- Gillespie, J.R., Flanders, F.B., 2014. *Modern livestock and poultry production*, Igarss 2014, 1–5.

- Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E., 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, 496.
- Guedes, C.M., Gonçalves, D., Rodrigues, M.A.M., Dias-da-Silva, A., 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 27–40.
- Guerra-Ordaz, a. a., Molist, F., Hermes, R.G., Gómez de Segura, A., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Tchorzewska, M. a., Collins, J.W., Pérez, J.F., Martín-Orúe, S.M., 2013. Effect of inclusion of lactulose and *Lactobacillus plantarum* on the intestinal environment and performance of piglets at weaning. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185, 160–168.
- Han, H., Ogata, Y., Yamamoto, Y., Nagao, S., Nishino, N., 2014. Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. *J. Dairy Sci.* 97, 5754–5762.
- Hofírek, B., Dvořák, R., 2002. Metody odběru bachorové tekutiny a její praktický význam. *Farmář* 7, 46–47.
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležal, R., Pospíšil, Z., 2009. Nemoci skotu. Česká buiatrická společnost, Brno, 1149.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Anu. Rev. Nutr.* 22, 283–307.
- Hulsen, J., Aerden, D., 2014. Signály krmení: praktická příručka ke krmení dojníc pro jejich zdraví a užitkovost. H.R.G spol. s r.o., Praha, 80.
- Chapman, C.M., Gibson, G.B., Rowland, I., 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr* 50(1), 1–17.
- Charalampopoulos, D., Rastall, R.A., 2009. Prebiotics and probiotics Science and Technology, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 160.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 1–27.
- Chaucheyras-Durand, F.H., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Ben. Micrib* 1, 3–9.
- Chiquette, J., Allison, M.J., Rasmussen, M.A., 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 5985–5995.
- Chiquette, J., Allison, M.J., Rasmussen, M.A., 2008. *Prevotella bryantii* 25A Used as a Probiotic in Early-Lactation Dairy Cows: Effect on Ruminal Fermentation

- Characteristics, Milk Production, and Milk Composition. *J. Dairy Sci.* 91, 3536–3543.
- Jackson, P.G.G., Cockcroft, P.D., 2002. Clinical examination of farm animals. Blackwell Sci. Ltd 104–107.
- Jallow, D.B., Hsia, L.C., 2011. Effect of Six Feed Supplements on Ruminal Degradation Characteristics and Amino Acid Profile of Sheep. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 3, 367–373.
- Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Valent, M., 2003. Fyziologie hospodářských zvířat, 1. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 409.
- Jenkins, T.C., 1993. Lipid metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3581–3863.
- Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E., 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Science* 86, 397–412.
- Jouany, J.P., 2006. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 250–264.
- Kaufmann, W., Hagemester, H., Dirksen, G., 1980. Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. *AVI, Westport*, 587.
- Kudrna, V., Čermák, B., Doležal, O., Frydrych, Z., Herrmann, H., Homolka, P., Illek, J., Loučka, R., Macháčková, E., Martínek, V., Mikyska, F., Mrkvička, J., Mudřík, Z., Pindřák, J., Poděbradský, Z., Pulkrábek, J., Skřivanová, V., Šantrůček, J., Šimek, M., Veselá, M., V., V., Zelenka, J., Zemanová, D., 1998. Produkce krmiv a výživa skotu. *Agrospoj, Praha*, 362.
- Kudrna, V., Homolka, P., 2007. Vliv krmné dávky dojnic na množství a kvalitu mléčného tuku. *Vědecký výbor výživy*, 49.
- Kühle, A., Jespersen, L., 2003. The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 564–571.
- Lee, S.S., Choi, C.K., Ahn, B.H., Moon, Y.H., Kim, C., Ha, J.K., 2004a. In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 215–226.
- Lee, S.S., Kim, H.S., Moon, Y.H., Choi, N.J., Ha, J.K., 2004b. The effects of a non-ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 37–50.

- Li, M., Penner, G.B., Hernandez-Sanabria, E., Oba, M., Guan, L.L., 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1924–1934.
- Lodemmann, U., Martens, H., 2006. Effects of diet and osmotic pressure on Na⁺ transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium. *Exp. Physiol.* 91, 539–550.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kasper, D., 2008. A microbial symbiosis factor prevents inflammatory disease. *Nature* 453, 620–625.
- Nam, I.S., Garnsworthy, P.C., 2007. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J Appl Microbiol* 103, 551–556.
- Náměstková, P., Čermák, B., Homolka, P., 2005. Mastné kyseliny ve váživě skotu. *Náš chov* 65, 11–19.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H., 2005. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 499–506.
- Perry, T.W., Cecava, M.J., 1995. Beef cattle feeding and nutrition: second edition, Igarss 2014. Academic press, inc., San Diiego, 1-5.
- Pfeffer, E., Hristov, A.N., 2005. Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle. CABI Publishing, Wallingford, 288.
- Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J.-P., Bayourthe, C., Auclair, E., Newbold, C.J., 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. *PLoS One* 8, e67824.
- Pitta, D.W., Pinchak, E., Dowd, S.E., Osterstok, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A., Malinowski, D.P., 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol* 59, 511–522.
- Prescott, L.M., Harley, J., Klein, D.A., 2005. Microbiology. McGraw-Hill Education, Boston, 1494.
- Qadis, A.Q., Goya, S., Ikuta, K., Yatsu, M., Kimura, A., Nakanishi, S., Sato, S., 2014. Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Ruminant pH, Volatile Fatty Acids and Bacterial Flora of Holstein Calves. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 877–885.
- R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2014.
- Rada, V., Marounek, M., 2005. Probiotika a Prebiotika Ve Výživě Zvřat 1–42.

- Radunz, A., 2012. Back to basic: Ruminant digestive system [WWW Document]. URL <http://fyi.uwex.edu/wbic/2012/01/18/back-to-basics-ruminant-digestive-system/> (accessed 1.1.15).
- Reece, W.O., 1998. Fyziologie domácích zvířat. Grada Publishing, Praha, 449.
- Ribeiro, S.S., Vasconcelos, J.T., Morais, M.G., Ítavo, C.B.C.F., Franco, G.L., 2011. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, in situ degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164, 53–61.
- Ricard, G., McEwan, N.R., Dutilh, B.E., Jouany, J.-P., Macheboeuf, M., McInthosh, F.M., Michalowski, T., Nagamine, T., Nelson, N., Newbold, C.J., Nsabimana, E., Takenaka, A., Thomas, N.A., Ushida, K., Hackstein, J.H.P., Huynen, M.A., 2006. Horizontal gene transfer from bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics* 7, 22.
- Ritz, J., Codron, D., Wenger, S., Rensch, E., Hatt, J.-M., Braun, U., Clauss, M., 2014. Ruminal pH in cattle (*Bos primigenius* f. *taurus*) and moose (*Alces alces*) under different feeding conditions: a pilot investigation. *J. zoo aquarium Res.* 2, 44–51.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323.
- Russell, D. a., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 88–105.
- Russell, J.B., Muck, R.E., Weimer, P.J., 2009. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS* 67, 183–197.
- Russell, J.B., Rychlik, J.L., 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292, 1119–1122.
- Saleem, F., Bouatra, S., Guo, A.C., Psychogios, N., Mandal, R., Dunn, S.M., Ametaj, B.N., Wishart, D.S., 2013. The Bovine Ruminal Fluid Metabolome. *Metabolomics* 9, 360–378.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 347–358.
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L., 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526.
- Sandres, M.E., Morelli, L., Tmpkins, T.A., 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Food Sci. Food Saf.* 2, 101–110.

- Skřivánek, M., 2000. Výživa a zdraví dojnic. *Farmář* 3, 34–38.
- Strapák, P., 2013. Chov hovädzieho dobytku, 624.
- Sttela, A.V., Parrate, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Sincini, G., Chevaux, E., Dell'Orto, V., Savoini, G., 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Rumin. Res.* 67, 7–13.
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Takusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Aminov, R.I., 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe* 13, 57–64.
- Timmerman, H.M., Mulder, L., Everst, H., van Espen, D., van der Wal, E., Klaasen, G., Rouwers, S.M., Hartemink, R., Roumbouts, F.M., Beynen, A.C., 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88, 2154–2165.
- Toman, M., Bárta, O., Dostál, J., Faldyna, M., Holáň, V., Hořín, P., Hruban, V., Jeklová, E., 2009. Probiotika a imunitní systém, in: *Veterinární imunologie:2., Doplněné a Aktualizované Vydání.* Grada Publishing a.s., 320.
- Trávníček, J., Kroupová, V., Kratochvíl, P., 1998. *Fyziologie hospodářských zvířat (cvičení).* Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 89.
- Urban, F., Bouška, J., Čermák, V., Doležal, O., Fulka, J., Fulka, J. jr., Futerová, J., Homolka, P., Jílek, F., Kudrna, V., Marounek, M., Váchal, J., Loučka, R., Macháčová, E., Mikšík, J., Mudřík, Z., Petr, J., Poděbradský, Z., Šereda, L., Skřivanová, V., Vetýška, J., Žižlavský, J., 1997. *Chov dojeného skotu.* Apros, Praha, 288.
- Ushida, K., 2011. Symbiotic methanogens and rumen Ciliates. *Microbiology Monographs* 19, 25–34.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T., 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ.* 30, 126–32.
- Vajda, V., Mitrik, T., Maskaľová, I., Bachratý, M., 2003. Nutričná regulácia bachorových funkcií. *Slov. chov* 4, 32–33.
- Van Saun, J.R., Koukal, P., 2003. Výživa přežvýkavců - trávení sacharidů. *Farmář* 1, 40–42.
- Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 325–331.

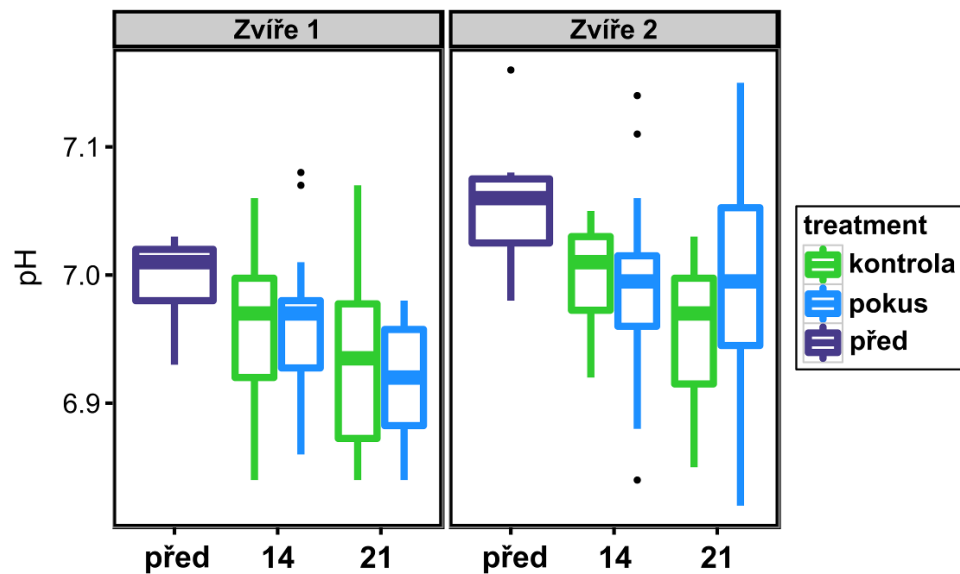
- Wang, Z., He, Z., Beauchemin, K. a., Tang, S., Zhou, C., Han, X., Wang, M., Kang, J., Odongo, N.E., Tan, Z., 2016. Comparison of two live *Bacillus* species as feed additives for improving in vitro fermentation of cereal straws. *Anim. Sci. J.* 87, 27–36.
- Welkie, D.G., Stevenson, D.M., Weimer, P.J., 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe* 16, 94–100.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2: elegant graphisc for data analysis*. Springer-Verlag, New York, 211.
- Yañez-Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín García, A.I., Molina Alcaide, E., 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 16–25.
- Zelenka, J. 2015. Krmná aditiva. Inovace bez legrace 13/018/1310b/164/000695. Program rozvoje venkova Ministerstva zemědělství.

Přílohy

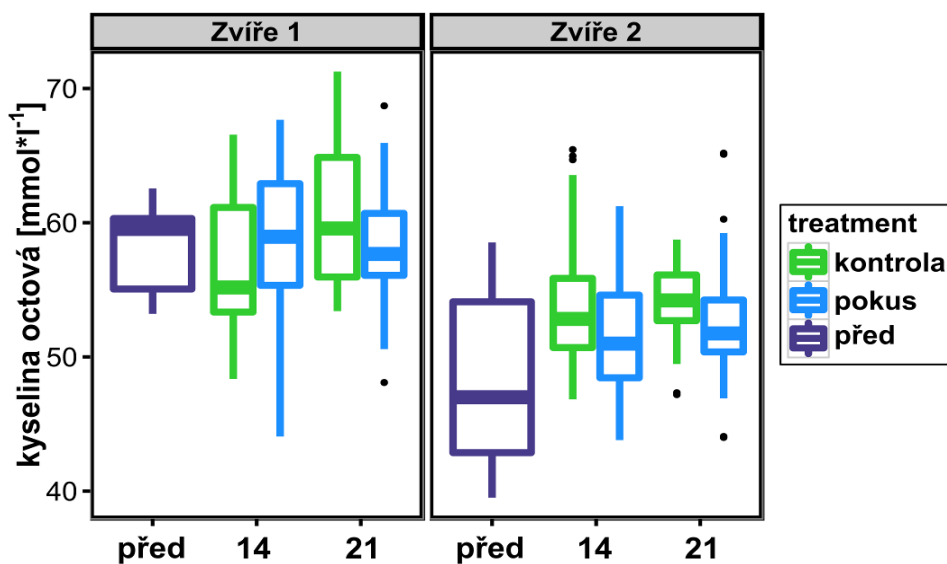
Tab. č.9 Seznam probiotických druhů, užívaným ve studiích v krmných dávkách (Gaggia et al., 2010)

Rod	druh
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis subsp. animalis (B. animalis)*</i> <i>B. lactis subsp. lactis (B. lactis)</i> <i>B. longum subsp. longum (B. longum)</i> <i>B. pseudolongum subsp. pseudolongum (B. pseudolongum)</i> <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis (Streptococcus faecalis)</i> <i>E. faecium (Streptococcus faecium)</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei subsp. casei (L. casei)</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. farmicinis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. murinus</i> <i>L. plantarum subsp. plantarum (L. plantarum)</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. amylovorus (L. sobrius)</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis subsp. cremoris (Streptococcus cremoris)</i> <i>L. lactis subsp. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus subsp. pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i> <i>S. salivarius subsp. salivarius</i> <i>S. thermophilus (S. salivarius subsp. thermophilus)</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus (B. cereus var. toyoi)</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae (S. boulardii)</i> <i>S. pastorianus</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i>

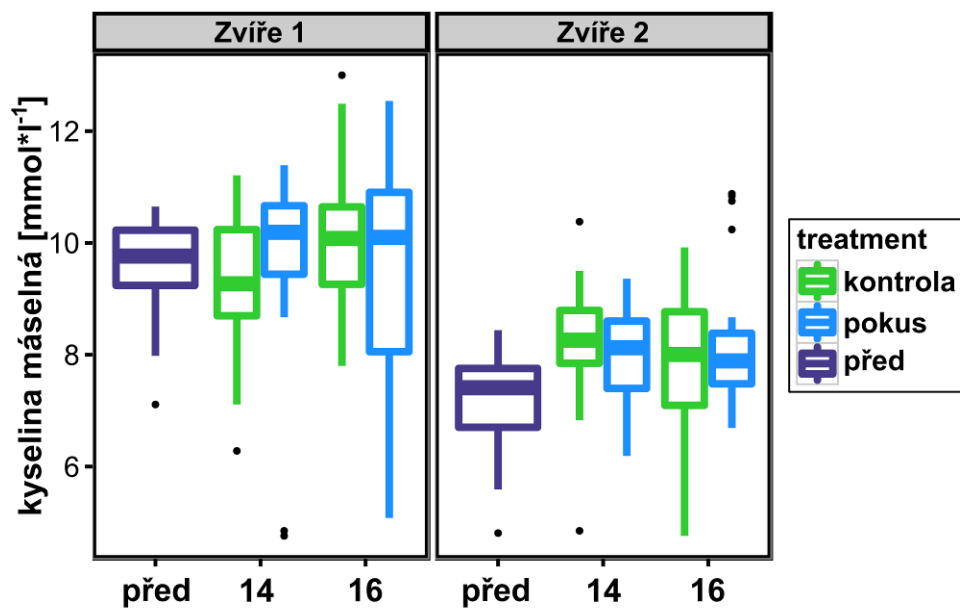
* V závorkách jsou uvedeny neplatná taxonomická označení užívaná na komerčních přípravcích a ve vědeckých publikacích



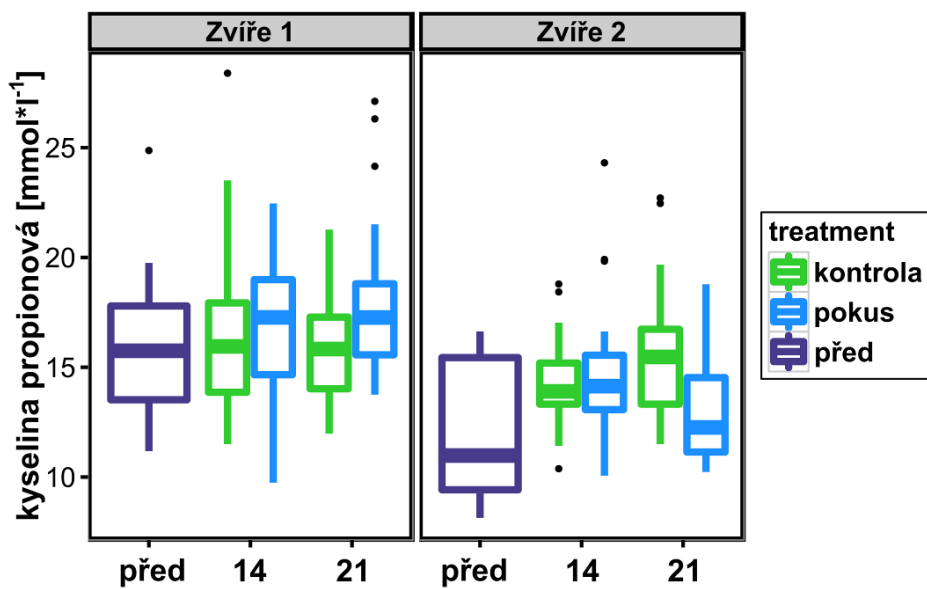
Obr. 17: Zde je znázornění průměrných hodnot pH u obou pokusných jedinců rozdělené na jednotlivá období (před pokusem, konec návykového období -14 dní, konec pokusného období – 21 dní, vždy odebráno 7 vzorků) v obou skupinách. Boxy znázorňují medián hodnot, první a třetí kvartil. Úsečky jsou 95% konfidenční intervaly.



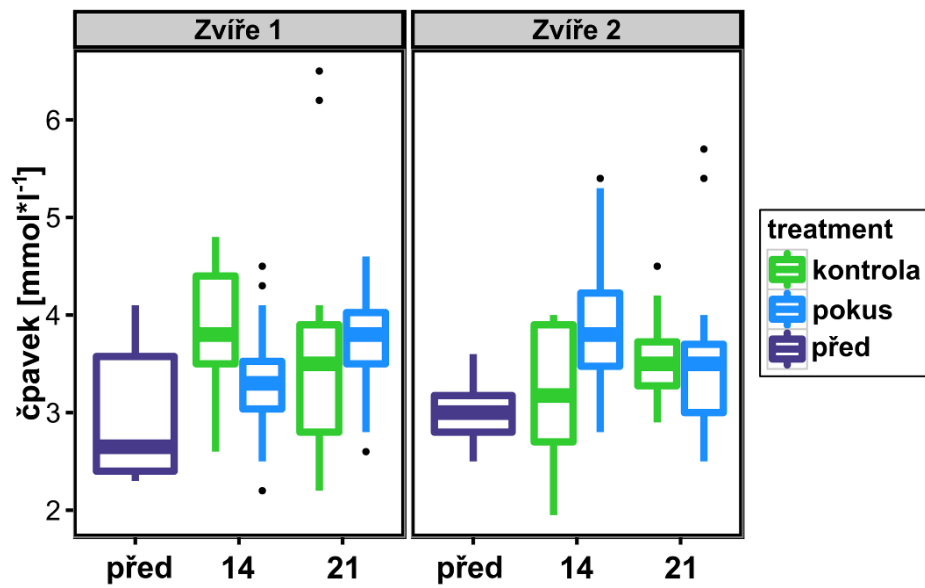
Obr. 18: Průměrné naměřené množství kyseliny octové [mmol.l⁻¹] (viz obr. 17).



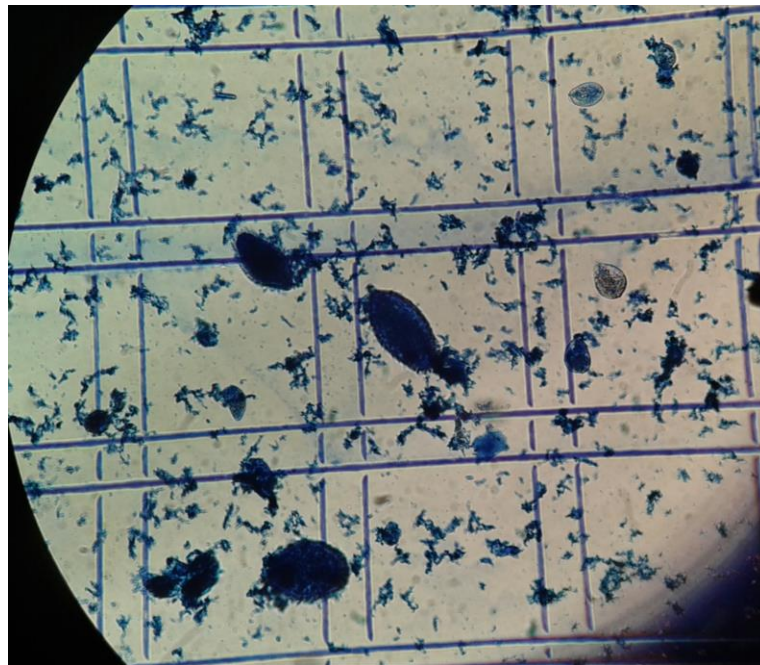
Obr. 19: Průměrné naměřené množství kyseliny másečné [mmol.l⁻¹] (viz obr.17).



Obr. 20: Průměrné naměřené množství kyseliny propionové [mmol.l⁻¹] (viz obr.17).



Obr. 21: Průměrné naměřené množství amoniaku [mmol.l⁻¹] (viz obr.17).



Obr.22 : Snímek nálevníků v Bürkerově komůrce (foto: Hadačová)



Obr. 23: Odběr bachorové tekutiny přímo z pístěle. (foto: Hadačová)



Obr. 24: Odběr bachorové tekutiny přímo z pístěle.(foto: Hadačová)

Tab. 10 : Souhrnná tabulka znázorňující průměrné hodnoty (se směrodatnou odchylkou) jednotlivých proměnných získaných při odběrech bachorové tekutiny. Hodnoty jsou rozděleny na období před pokusem (7 dní před), po 14 dnech (konec návykového období), po 21 dnech (konec pokusného období) a na jednotlivé skupiny u obou pokusných jedinců.

	zvíře 1					zvíře 2				
	před	K		P		před	K		P	
		14dní	21dní	14dní	21dní		14dní	21dní	14dní	21dní
[mmol.l ⁻¹]										
kyselina octová	58,14 ± 3,2	56,44 ± 5,2	60,81 ± 5,6	58,52 ± 5,8	58,26 ± 4,6	48,18 ± 6,3	54,16 ± 5,6	54,02 ± 3,1	51,82 ± 4,6	52,66 ± 5,2
kyselina propionová	16,1 ± 6,5	16,46 ± 3,7	15,89 ± 2,6	16,92 ± 3,1	17,85 ± 3,4	12,13 ± 3,1	14,26 ± 1,9	15,61 ± 2,9	14,61 ± 3,0	13,05 ± 2,5
kyselina máselná	9,53 ± 1,0	9,25 ± 1,3	10,09 ± 1,3	9,8 ± 1,6	9,44 ± 2,1	7,14 ± 0,9	8,26 ± 0,9	7,81 ± 1,2	7,99 ± 0,8	8,19 ± 1,2
NH ₃	2,98 ± 0,7	3,89 ± 0,6	3,5 ± 0,9	3,34 ± 0,5	3,75 ± 0,45	3,02 ± 0,3	3,15 ± 0,7	3,49 ± 0,4	3,89 ± 0,64	3,47 ± 0,7
pH	6,99 ± 0,03	6,96 ± 0,06	6,94 ± 0,07	6,97 ± 0,06	6,92 ± 0,04	7,05 ± 0,05	6,99 ± 0,04	6,96 ± 0,05	6,99 ± 0,08	6,99 ± 0,09