

Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. 17210/2015 – 1

o uznání uplatněné certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Hodnocení dusíkatých látek horských pastevních porostů dle Cornellského systému

*Ing. Marie Koukolová, Ing. Veronika Koukolová, Ph. D.,
doc. Ing. Petr Homolka, CSc., Ph.D.*

*Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.,
Přátelství 815, Praha Uhřetěves*

ISBN 978-80-7403-136-6

Metodika vznikla jako součást řešení institucionální podpory
na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe
MZERO0715.

V Praze dne 2. 6. 2015



.....
Ing. Jiří Hojer
ředitel odboru
živočišných komodit – 17210



VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i.

Praha Uhřetěves

METODIKA

Hodnocení dusíkatých látek horských pastevních porostů dle Cornellského systému

Autoři

Ing. Marie Koukolová

Ing. Veronika Koukolová, Ph.D.

doc. Ing. Petr Homolka, CSc., Ph.D.

Oponenti

prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.

Mendelova univerzita v Brně

Ing. Juraj Saksún

Ministerstvo zemědělství České republiky

Metodika vznikla jako součást řešení institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj
výzkumné organizace MZe ČR MZERO0715.

ISBN 978-80-7403-136-6

Obsah

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE	3
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	3
1. Úvod.....	3
2. Literární přehled	3
2.1. Využitelnost a metabolismus dusíkatých látek u přežvýkavců	3
2.2. Hodnocení degradovatelnosti dusíkatých látek a aminokyselin u krmiv pro přežvýkavce	4
2.3. Význam hodnocení frakcí dusíkatých látek ve výživě přežvýkavců	5
3. Experimentální část metodiky	6
3.1. Materiál a metodika.....	6
3.2. Výsledky a diskuze	9
3.3. Závěr.....	17
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	18
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	18
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	18
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	19
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	21

Seznam použitých zkratk

A	= nebílkovinný dusík
AD	= acido detergentní roztok
ADF	= acido detergentní vláknina
ADIP	= dusík nerozpustný v kyselém detergentu
ADL	= acido detergentní lignin
B1	= rychle rozložitelný protein
B2	= středně rozložitelný protein
B3	= pomalu rozložitelný protein
BE	= brutto energie
BNLV	= bezdusíkaté látky výťažkové
BSP	= v pufru rozpustný protein
C	= vázaný (nestravitelný) protein
CNCPS	= Cornell Net Carbohydrate and Protein System
VI	= hrubá vláknina
ECP	= endogenní protein
IP	= nerozpustný dusík
MCP	= mikrobiální hrubý protein
ND	= neutrálně detergentní roztok
NDF	= neutrálně detergentní vláknina
NDIP	= dusík nerozpustný v neutrálním detergentu
NL	= dusíkaté látky
NPN	= nebílkovinný dusík
NRC	= National Research Council system
OH	= organická hmota
PDI	= protein skutečně stravitelný v tenkém střevě
RDP	= v bachoru degradovatelný protein
RUP	= hrubý protein krmiva nedegradovatelný v bachoru
SNL	= stravitelné dusíkaté látky
SOLP	= rozpustný dusík
TCA	= kyselina trichloroctová
TIP	= dusík nerozpustný v kyselině trichloroctové

I. Cíl metodiky a dedikace

Hypotéza metodiky

Rozdělení dusíkatých látek do jednotlivých frakcí zpřesňuje krmnou dávku a tím pozitivně ovlivňuje nutriční požadavky a užítkovost zvířat.

Cíl metodiky

Stanovit nutriční hodnotu krmiv pomocí základních chemických rozborů a vyhodnotit jednotlivé frakce dusíkatých látek stanovené laboratorními postupy vycházejících z metod (1) stanovení nebílkovinného dusíku (NPN), (2) stanovení rozpustného dusíku a bílkovin, (3) stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu (ADIP) a (4) stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (NDIP).

Dedikace metodiky

Metodika vznikla jako součást řešení institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR MZERO0715.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Vhodná krmná dávka poskytuje důležité živiny ve výživě a krmení hospodářských zvířat, což vedle užítkovosti ovlivňuje i kvalitu výsledné produkce. Významná je optimální stravitelnost živin krmné dávky, neboť ze stravitelných živin mohou přežvýkavci využívat energii pro biologické procesy, záchovu, růst, březost, mléčnou a masnou užítkovost.

Nepostradatelnou živinou ve výživě zvířat jsou dusíkaté látky (bílkoviny). Dusíkaté látky v těle zvířat tvoří 80 až 90 % organických látek a jsou důležité především pro růst, obnovu, látkový metabolismus a výživu živočišných buněk. Bílkoviny jsou přítomny v každé buňce, představují nedílnou součást cytoplasmy a v případě jejich přebytku slouží jako částečný zdroj energie. Výslednými produkty jejich metabolických procesů jsou voda, oxid uhličitý a amoniak, které jsou z těla vylučovány.

2. Literární přehled

2.1. Využitelnost a metabolismus dusíkatých látek u přežvýkavců

Nenahraditelnou živinou pro přežvýkavce jsou dusíkaté látky bílkovinné a nebílkovinné povahy, jejichž zastoupení v krmivech je variabilní. Bílkoviny jsou velké molekuly, které se liší velikostí, tvarem, rozpustností a složením. Jsou přítomny v buňkách a tvoří obsah rostlinných a živočišných tkání, kde zastupují různé funkce (např. funkci stavební, zásobní apod.). Nebílkovinný dusík je tvořen menšími molekulami, které obsahují peptidy, nukleové kyseliny, amidy, aminy, dusičnany a amoniak (Schwab *et al.*, 2003; Cornell University, Department of Animal Science, 2014).

Tyto látky jsou v organismu důležité pro metabolické procesy (dusíkaté látky umožňují činnost orgánů, spouští a regulují veškeré změny v živočišném organismu), účastní se realizace genetických informací, jsou obsaženy v nukleových kyselinách, enzymech a jsou součástí hormonů. Jejich další funkcí je např. podíl na ochraně organismů před infekcemi nebo na regulaci metabolismu vody (osmotický tlak bílkovin a jejich velikost jim nedovolí prostupovat membránami, což způsobuje kontrolovatelný transport vody do buňky i z buňky do mimobuněčného prostoru). V mimořádných situacích mohou být bílkoviny zdrojem energie, nebo se podílet na tvorbě glukosy či mastných kyselin (Kudrna *et al.*, 1998).

Kvalita bílkovin závisí na zastoupení jednotlivých aminokyselin, které určují jejich biologickou hodnotu. Tato biologická hodnota udává, kolik dusíku se vstřebalo z krmiva a zabudovalo do vlastních bílkovin v organismu. Zjišťuje se v bilančních pokusech a závisí na obsahu esenciálních a neesenciálních aminokyselin (Jelínek *et al.*, 2003).

Trávení bílkovin probíhá v žaludku a na začátku tenkého střeva, kde jsou bílkoviny rozštěpeny na oligopeptidy s krátkým řetězcem (peptidy, jejichž molekula je složená z 2 až 10 aminokyselin) a na volné aminokyseliny (aminokyseliny, které nejsou navzájem propojeny do řetězce tvořícího bílkoviny). Ke štěpení dochází prostřednictvím enzymů v zažívacím traktu a takto rozštěpené aminokyseliny jsou absorbovány prostřednictvím krve nebo lymfy do jater, kde probíhají následující reakce. Syntéza bílkovin, deaminace (část amoniaku se vyloučí jako močovina močí, bezdusíkatá frakce se oxiduje nebo se z ní vytvoří cukry) a reakce, při níž se aminokyseliny pomocí krve transportují do svalů, kde dojde k syntéze bílkovin, odštěpení amoniaku a bezdusíkatá frakce se oxiduje (Zeman *et al.*, 2006).

Pokud při syntéze bílkovin některá z aminokyselin chybí a v krvi není dostupná, je tvorba bílkovin (tzv. proteosyntéza) zastavena. Je-li to neesenciální aminokyselina, může být syntetizována v organismu zvířete a dále využita při proteosyntéze. Pokud chybí esenciální aminokyselina, proteosyntéza ustává a obnovuje se až po doplnění této aminokyseliny v krmné dávce. Tuto aminokyselinu nazýváme limitující, protože omezuje tvorbu bílkovin. Všeobecně se za první limitující aminokyselinu u dojníc považují lyzin a metionin (Rulquin, 1994).

2.2. Hodnocení degradovatelnosti dusíkatých látek a aminokyselin u krmiv pro přežvýkavce

V rámci evropských systémů hodnocení degradovatelnosti dusíkatých látek se vychází ze stejných kritérií, které hodnotí zvláště dusíkaté látky pro bachorové mikroorganismy a pro organismus hostitelského zvířete. Odlišnost hodnocení spočívá v (Kudrna *et al.*, 1998):

- syntéze mikrobiálních látek z dostupné energie,
- metodě stanovení degradovatelnosti a výtokové rychlosti částic,
- hodnotě střevní stravitelnosti nedegradovatelného proteinu,
- účinnosti využití degradovatelných dusíkatých látek a neproteinového dusíku bachorovými mikroorganismy,
- složení a stravitelnosti mikrobiálních dusíkatých látek,
- účinnosti využití absorbovaných aminokyselin.

Jeden z používaných a u nás nejrozšířenějších systémů je systém PDI (protein skutečně stravitelný v tenkém střevě), který nahradil dříve používaný systém SNL (stravitelné dusíkaté látky). Oproti systému SNL (systém, který odvozoval požadavky organismu mezi množstvím dusíkatých látek v krmivu a množstvím dusíkatých látek ve výkalech) posuzuje PDI požadavky organismu na protein podle jeho množství skutečně vstupujícího do tenkého střeva (Kudrna *et al.*,

1998). Systém PDI zohledňuje mikrobiální fermentaci v bachoru, degradaci dusíkatých látek krmiva a rozdílné využití dusíkatých látek vstupujících do tenkého střeva (Homolka *et al.*, 1996).

2.3. Význam hodnocení frakcí dusíkatých látek ve výživě přežvýkavců

Jedním ze systémů hodnocení dusíkatých látek je tzv. Cornellský systém (CNCPS, tj. Cornell Net Carbohydrate and Protein System), který využívá chemickou frakcionaci dle Licitry *et al.* (1996). Tento systém vznikl na Cornellské universitě v USA, kde byly jednotlivé frakce dusíkatých látek v krmivu popsány a byl vyvinut za účelem predikovat nutriční požadavky zvířat, využitelnost přijímaných krmiv, užítkovost zvířat a živiny přecházející do výsledné produkce. Tento systém, který je založen na chemické frakcionaci, využívá poznatky o složení krmiva, trávení a metabolismu při zásobení živinami tak, aby byly zajištěny nutriční požadavky zvířete (Fox *et al.*, 2004; Ghoorchi a Arbabi, 2010; Cornell University, Department of Animal Science, 2014).

Richter a Třináctý (2009) popisují rozdíly v hodnocení dusíkatých látek a uvádějí hlavní rozdíly mezi výše zmiňovaným CNCPS a mezi NRC (2001). NRC (2001) využívá frakcionace dusíkatých látek krmiva založené na metodě nylonových nebo polyesterových sáčků vložených do bachoru zvířete. Tato NRC metoda definuje jednotlivé frakce dusíku získané metodou *in situ* na frakce: A (rozpustná rychle degradovatelná frakce proteinu krmiva), B (potencionálně degradovatelná frakce proteinu krmiva) a C (nedegradovatelná frakce proteinu krmiva). Oproti tomu Cornellský systém dle Licitry *et al.* (1996) používá podrobnější rozdělení frakcí dusíkatých látek (vyjádřených v procentech dusíkatých látek), tj. frakci A (nebílkovinný dusík), B1 (rychle rozložitelný protein), B2 (středně rozložitelný protein), B3 (pomalu rozložitelný protein) a C (vázaný (neboli nestravitelný) protein) (Richter a Třináctý, 2009). Cornellský systém sjednotil postupy hodnocení dusíku v krmivech vycházející z proteinových frakcí A, B a C. Metody stanovení sacharidových frakcí jsou oproti metodám stanovení frakcí dusíkatých látek poměrně standardizovány. U metod stanovení jednotlivých dusíkatých frakcí je v laboratorních postupech zaznamenána značná variabilita. Z tohoto důvodu je důležitá standardizace postupů hodnotících jednotlivé frakce dusíku pro přežvýkavce (Licitra *et al.*, 1996).

Tabulka 1. Rozdělení frakcí dusíkatých látek u krmiv (Licitra *et al.*, 1996).

Frakce	Popis	Klasifikace
Nebílkovinný dusík	NPN	A
Rychle rozložitelný protein	BSP	B1
Středně rozložitelný protein	IP - NDIP	B2
Pomalu rozložitelný protein	NDIP - ADIP	B3
Vázaný (nestravitelný) protein	ADIP	C

A = nebílkovinný dusík, ADIP = dusík nerozpustný v kyselém detergentu, B1 = rychle rozložitelný protein, B2 = středně rozložitelný protein, B3 = pomalu rozložitelný protein, BSP = v pufru rozpustný protein, C = vázaný (nestravitelný) protein, IP = nerozpustný dusík, NDIP = dusík nerozpustný v neutrálním detergentu, NPN = nebílkovinný dusík.

Určení jednotlivých frakcí je dle jejich rozpustnosti v detergentech (Goering a Van Soest, 1970). Mudřík *et al.* (2006) popisují frakci A jako složku dusíkatých látek, která je v bachoru rychle degradovatelná a vstřebatelná a do tenkého střeva se nedostane. Jak uvádí Sniffen *et al.* (1992), jedná se o nebílkovinný dusík, který je rozpustný ve fosfáto-borátovém pufru a nesráží se v kyselině trichloroctové. Tato frakce se skládá z amoniaku, dusičnanů, aminokyselin a peptidů

(Mudřík *et al.*, 2006). Dále Sniffen *et al.* (1992) popisuje jednotlivé subfrakce frakce B, které jsou rozděleny na základě jejich různé degradovatelnosti v bachoru na frakci B1, B2 a B3. Frakce B1, podobně jako frakce A, je také rozpustná ve fosfáto-borátovém pufru, ale je srážena i v kyselině trichloroctové (Krishnamoorthy *et al.*, 1983). Tato frakce obsahuje globuliny a část albuminů. Tato frakce je v bachoru velmi rychle degradovatelná a do tenkého střeva se dostane pouze v omezeném množství, které je až 100% stravitelné (Mudřík *et al.*, 2006). Frakce B2 představuje potenciálně rozložitelnou frakci proteinu krmiva, která je závislá na relativních rychlostech průchodu a trávení (Sniffen *et al.*, 1992). Frakce je tvořena převážně albuminy a gluteliny a jejich degradace v bachoru je již nižší (Mudřík *et al.*, 2006). Trávení částí, které se dostanou do tenkého střeva, je podobně jako u frakce B1, tedy až 100% (Fox *et al.*, 2004). Frakce B3 je frakce nerozpustná v neutrálním detergentu, ale rozpustná v kyselém detergentu (Sniffen *et al.*, 1992). Tato frakce je v bachoru degradovatelná pomalu, protože je vázaná na buněčnou stěnu (Krishnamoorthy *et al.*, 1983) a v tenkém střevě je trávena z 80 % (Fox *et al.*, 2004). Poslední frakce C je prakticky nevyužitelná, protože v bachoru nedegraduje a ve střevě není stravitelná (Mudřík *et al.*, 2006). Jedná se o část proteinu, která je nerozpustná v kyselém detergentu. Tato frakce obsahuje protein spojený s ligninem, taninem a Maillardovou reakcí (Sniffen *et al.*, 1992). Je-li podíl této frakce vysoký, znamená to, že tento nedegradovatelný protein se nevyužije a objeví se ve výkalech (Navrátil, 2010).

3. Experimentální část metodiky

3.1. Materiál a metodika

K pokusům byly vybrány vzorky objemné píce ($n = 6$) pastevních porostů z lokality Krkonošského národního parku. Vzorky byly vybrány za účelem doplnění nutriční databáze vzorků krmiv a byly odebírány v různé vegetační fázi v průběhu dvou vegetačních období v letech 2007 a 2008. Cílem této práce bylo stanovit nutriční hodnotu vysokohorského pastevního porostu. Pastva zde byla ověřována jako nástroj údržby květnatých luk a zachování bohaté diverzity luk na území Krkonošského národního parku.

Odebrané vzorky byly usušeny v sušárně při teplotě do 50 °C dle metodiky „*Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců*“ (Harazim *et al.*, 1999), poté semlety mlynkem na velikost částic 1 mm a rozborovány na obsah základních živin: neutrálně detergentní vlákninu (NDF), acido detergentní vlákninu (ADF) a acido detergentní lignin (ADL) dle Van Soesta *et al.* (1991); dusíkaté látky (NL) dle Kjeldahlovy metody ($N \times 6,25$), tuk přímou extrakcí dle Soxhleta a hrubou vlákninu (VI) (AOAC, 2005). Popel byl stanoven po 4,5 hodinovém pálení v peci při teplotě 550 °C (AOAC, 2005). Bezduškaté látky výtahové (BNLV) byly vypočteny podle vzorce: $BNLV = \text{sušina} - (\text{NL} + \text{VI} + \text{tuk} + \text{popel})$. Brutto energie (spalné teplo, BE) byla stanovena pomocí přístroje kalorimetr (IKA C 5000 Werke, Germany).

Pro stanovení frakcí dusíkatých látek u krmiv pro přežvýkavce byly použity metody dle Licity *et al.* (1996):

1. stanovení nebílkovinného dusíku (NPN) pomocí kyseliny trichloroctové,
2. stanovení rozpustného dusíku a bílkovin,
3. stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu (ADIP) s využitím přístroje Fibertec,
4. stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (NDIP) s využitím přístroje Fibertec.

Pro tyto metody je potřebný analyzátor Kjeltec 2400 (přístroj pro stanovení zbytkového dusíku a dusíkatých látek dle Kjeldahla) a Fibertec, což je přístroj na stanovení jednotlivých frakcí strukturních sacharidů (acido detergentní vlákniny, neutrálně detergentní vlákniny a ligninu).

Stanovení nebílkovinného dusíku (NPN) pomocí kyseliny trichloroctové

Stanovení nebílkovinného dusíku bylo provedeno pomocí kyseliny trichloroctové ($C_2HCl_3O_2$) a bylo nutné následující laboratorní vybavení: Erlenmeyerovy baňky (125 ml), bezpopelové filtrační papíry, analytické váhy, filtrační Büchnerovy nálevky, mineralizační blok, mineralizační tuby a Kjeldahl přístroj.

Tato metoda vychází z navážky 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) suchého namletého vzorku do 125 ml Erlenmeyerovy baňky. Do baňky bylo přidáno 50 ml destilované vody a takto připravený vzorek se ponechal stát 30 minut. Následně bylo přidáno 10 ml 10% kyseliny trichloroctové (TCA 10% ve vodě) a po dalších 30 minutách se filtrovalo pomocí filtračních papírků s využitím gravitace. Po přefiltrování se dvakrát či podle potřeby promývalo roztokem TCA a filtrační papírek se vzorkem byl kvantitativně přenesen do připraveného mineralizačního bloku (Kjeldahl přístroje) s připravenými tubami pro stanovení zbytkového dusíku.

Odečtením zbytkového dusíku z dusíku celkového byl vypočítán obsah nebílkovinného dusíku. Tato hodnota může být vyjádřena formou dusíkatých látek ($N \times 6,25$) nebo jako procento z celkového dusíku krmiva.

Stanovení rozpustného dusíku a bílkovin

Stanovení rozpustného dusíku a bílkovin je prováděno za pomoci fosfáto-borátového pufru (pH 6,7 až 6,8) a 10% roztoku azidu sodného. Pro toto stanovení bylo zapotřebí laboratorní vybavení: Erlenmeyerovy baňky (150 ml), bezpopelové filtrační papírky, analytické váhy, vodní a membránová vývěva, odsávací baňka s gumovou zátkou (upravená pro nasazení nálevek a pro filtraci pod tlakem), filtrační Büchnerovy nálevky, sklopná pipeta, mineralizační blok, mineralizační tuby a Kjeldahl přístroj.

Metoda vychází z navážky 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) suchého namletého vzorku do 125 ml Erlenmeyerovy baňky. Do baňky bylo k naváženému vzorku přidáno 50 ml fosfáto-borátového pufru (na jeden litr pufru je potřeba 13,79 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 8,91 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 100 ml $C_4H_{10}O$ a doplnit v odměrné baňce do 1 litru destilovanou vodou) a 1 ml roztoku azidu sodného (na 100 ml je potřeba 10 g NaN_3 ; doplnit v odměrné baňce do 100 ml destilovanou vodou) a takto připravený vzorek byl ponechán při pokojové teplotě 3 hodiny. Následovala filtrace pomocí membránové vývěvy; předepsané použití mírného vakua vodní vývěvou nestačilo, neboť docházelo k zanášení pórů filtračního papíru. Usazený zbytek vzorku v baňce byl promýván pomocí 250 ml studené destilované vody. Filtrační papírek s přefiltrovaným vzorkem byl přenesen do připraveného mineralizačního bloku (Kjeldahl přístroje) s připravenými tubami pro stanovení zbytkového dusíku, přičemž stanovený zbytek představoval nerozpustnou frakci bílkovin.

Výsledkem metody stanovení rozpustného dusíku a bílkovin je hodnota nerozpustného dusíku (IP), tzn. SOLP je vypočten rozdílem z celkových dusíkatých látek a IP. Tato hodnota může být vyjádřena formou dusíkatých látek ($N \times 6,25$) nebo jako procento z celkového dusíku krmiva.

Stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu (ADIP) s využitím přístroje Fibertec

Stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu za použití přístroje Fibertec je založeno na použití acido detergentního roztoku (AD) a acetonu. Laboratorní vybavení tohoto stanovení je následující: přístroj Fibertec, fibertec kelímky, analytické váhy, sušárna s aktivní ventilací, bezpopelové filtrační papíry, mnohonásobná filtrace vybavená kónickými nálevkami, mineralizační bloky, mineralizační tuby a Kjeldahl přístroj.

Do předem vysušených a zvážených frit určených do přístroje Fibertec bylo naváženo 0,5 g (\pm 0,0001 g) vzorku. Do frity s naváženým vzorkem krmiva bylo přidáno 100 ml AD roztoku a uvedeno do varu po dobu 1 hodiny v přístroji Fibertec. Poté byly převařené vzorky krmiva promývány horkou destilovanou vodou, dokud nebyla ze skleněných stěn Fibertecu odstraněna veškerá rezidua analyzovaných vzorků. Následovalo vyjmutí frit s rezidui z přístroje a promývání acetonem v intervalech 3 \times 3 minuty. Promyté frity s rezidui byly vloženy do sušárny a sušeny přes noc při teplotě 103 °C. Po usušení byly frity s rezidui zváženy a zaznamenány. Analýza je do této fáze shodná s analýzou ADF. Poté byla rezidua z fibertecových kelímků vymyta pomocí destilované vody na bezpopelový filtrační papírek, přebytečná voda byla vysáta pomocí membránové vývěvy a přenesena do mineralizačních tub připravených v mineralizačních blocích, ve kterých byl stanoven zbytkový dusík standardním postupem podle Kjeldahla.

Bílkovina nerozpustná v kyselém detergentu byla vypočtena z celkových dusíkatých látek. Tato hodnota může být vyjádřena formou dusíkatých látek ($N \times 6,25$) nebo jako procento z celkového dusíku krmiva.

Stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (NDIP) s využitím přístroje Fibertec

Stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (ND) za použití přístroje Fibertec je založeno na použití ND roztoku. Postup a laboratorní vybavení této NDIP metody je stejný jako u stanovení ADIP. Rozdíl metody je pouze v použití ND roztoku místo AD roztoku a postupu určeného pro analýzu NDF.

Bílkovina nerozpustná v neutrálním detergentu byla vypočtena z celkových dusíkatých látek. Tato hodnota může být vyjádřena formou dusíkatých látek ($N \times 6,25$) nebo jako procento z celkového dusíku krmiva.

Výpočty jednotlivých frakcí dusíkatých látek (frakce A, B1, B2, B3 a C) byly dle Ghoorchi a Arbabi (2010)

frakce A (% NL)	= NPN (% SOLP) * 0,01 * SOLP (% NL)
frakce B1 (% NL)	= SOLP (% NL) - frakce A (% NL)
frakce B2 (% NL)	= 100 - A (% NL) - B1 (% NL) - B3 (% NL) - C (% NL)
frakce B3 (% NL)	= NDIP (% NL) - ADIP (% NL)
frakce C (% NL)	= ADIP (% NL)

Kde: frakce A = nebílkovinný dusík, ADIP = dusík nerozpustný v kyselém detergentu, frakce B1 = rychle rozložitelný protein, frakce B2 = středně rozložitelný protein, frakce B3 = pomalu rozložitelný protein, frakce C = vázaný (nestravitelný) protein, NDIP = dusík nerozpustný v neutrálním detergentu, NL = dusíkaté látky, SOLP = rozpustný dusík.

Data byla statisticky vyhodnocena v programu SAS 9.4, procedura GLM (PROC GLM) a pomocí procedury PROC CORR byly vyhodnoceny korelační koeficienty mezi jednotlivými sledovanými proměnnými. Test statisticky významných rozdílů byl hodnocen Scheffého analýzou.

3.2. Výsledky a diskuze

3.2.1. Chemické složení pastevních porostů

V tabulce 2 je uveden základní chemický rozbor živin a energie vzorků krmiv.

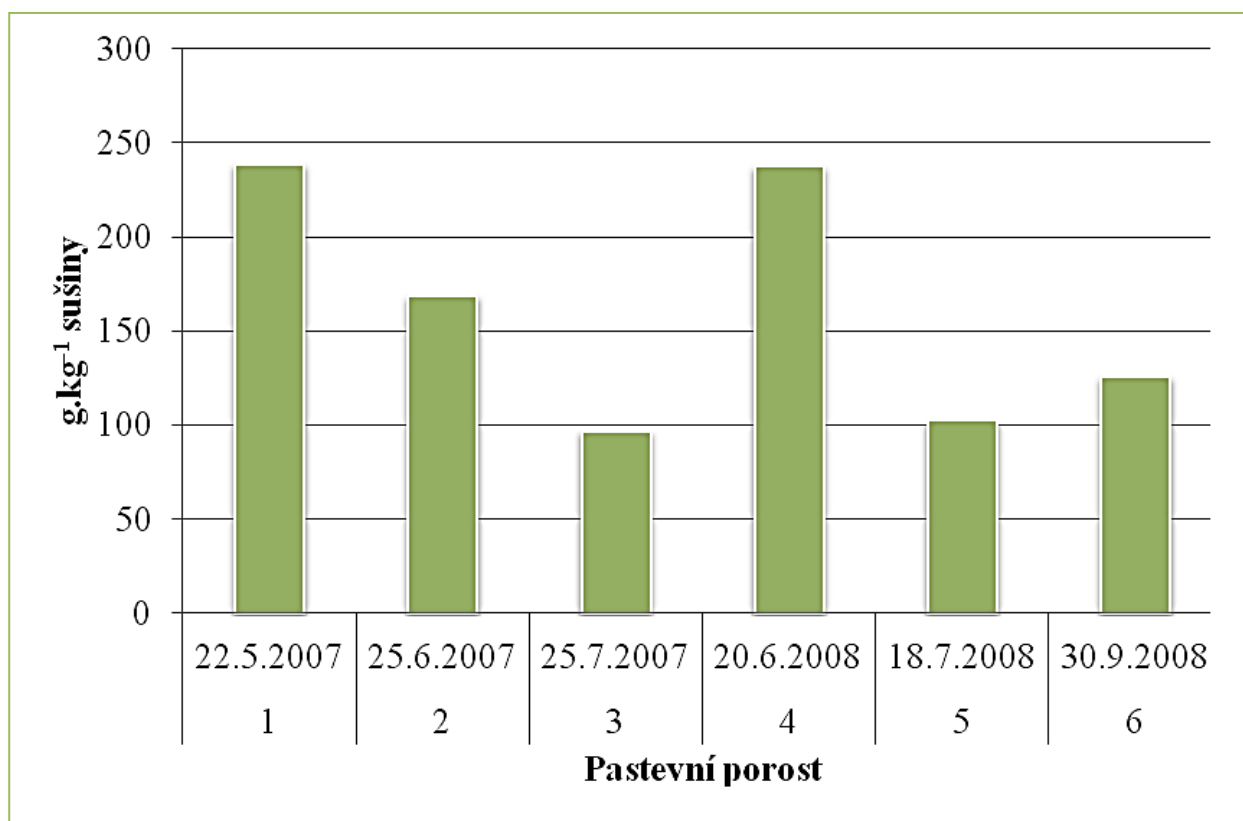
Tabulka 2. Obsah jednotlivých živin (g.kg^{-1} sušiny) a brutto energie (MJ.kg^{-1} sušiny) u sledovaných vzorků krmiv pastevních porostů.

Termín odběru	Číslo vzorku					
	1	2	3	4	5	6
	22. 5. 07	25. 6. 07	25. 7. 07	20. 6. 08	18. 7. 08	30. 9. 08
Sušina původní	191,8	187,4	273,2	202,7	275,4	313,3
NL	238,8	168,8	97,0	237,5	102,6	125,7
Tuk	25,1	28,5	17,8	18,6	17,3	13,8
VI	198,0	244,1	319,4	210,4	312,4	293,2
BNLV	461,2	495,7	513,5	473,5	524,6	509,4
OH	923,2	937,1	947,7	940	956,9	942,2
ADF	332,1	352,5	368,1	308,6	374,0	343,0
NDF	603,4	634,5	685,7	724,4	653,9	366,1
ADL	120,8	81,0	148,3	43,9	63,0	59,5
BE	19,8	19,8	19,2	20,2	19,4	19,3

ADF = acido detergentní vláknina, ADL = acido detergentní lignin, BE = brutto energie, BNLV = bezdusíkaté látky výtahové, NDF = neutrálně detergentní vláknina, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota, VI = hrubá vláknina.

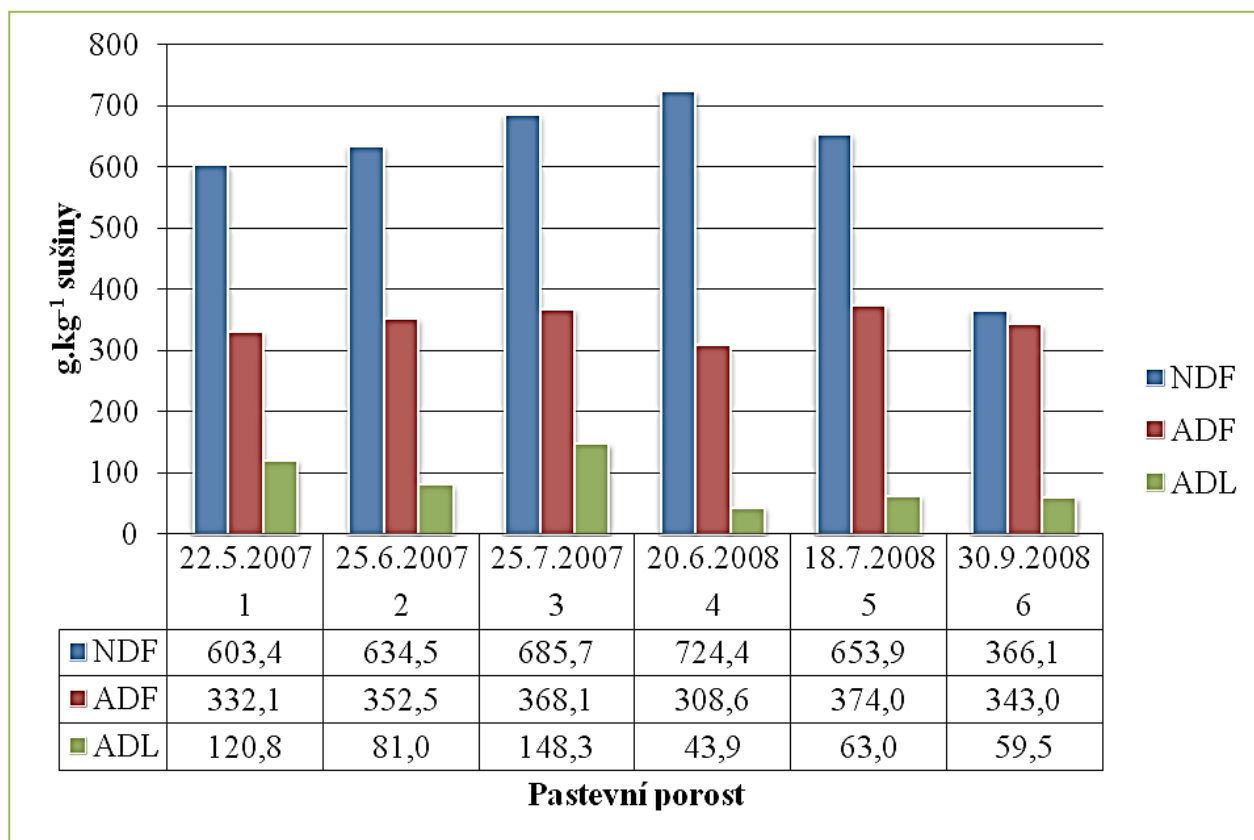
Hodnoty dusíkatých látek se pohybovaly od 97 do $237,5 \text{ g.kg}^{-1}$ sušiny (tabulka 2). Pastevní porosty, které byly sklizeny v letech 2007 a 2008 vykazují vyšší hodnoty dusíkatých látek na začátku vegetační sezóny, oproti pastevnímu porostu sklizeného na konci vegetační sezóny. Obecně lze říci, že píče odebíraná v různých sečích vykazuje se stárnutím porostu nižší hodnoty dusíkatých látek. Pokles obsahu dusíkatých látek s postupující vegetační fází porostu též potvrzují Rinne a Nykänen (2000), Arthington a Brown (2005) a Koukolová a Homolka (2010). Pastevní porost (graf 1) vykazuje podobnou tendenci s postupující vegetační fází porostu, tj. mladý obrůstající porost (vzorek 1) měl obsah NL $238,8 \text{ g.kg}^{-1}$ sušiny oproti staršímu odkvétajícímu porostu (vzorek 3), který vykazoval obsah NL $97,0 \text{ g.kg}^{-1}$ sušiny.

Graf 1. Obsah (g.kg^{-1} sušiny) dusíkatých látek (NL) u pastevního porostu.



Obsah jednotlivých frakcí vlákniny (NDF, ADF, ADL) souvisí s celou řadou faktorů, např. vegetační fáze, klimatické podmínky, agronomické podmínky a způsob ošetření a úpravy krmiv (Písaříková *et al.*, 2007; Pozdíšek a Vaculová, 2008; Tyrolová a Výborná, 2008, Jančík *et al.*, 2009). Coblentz *et al.* (1998), Elizalde *et al.* (1999) a Koukolová *et al.* (2010) potvrzují narůstající obsah NDF, ADF, ADL v závislosti na stárnutí porostu. Zvyšující se obsah NDF, ADF částečně ADL se stářím porostu je patrný (graf 2) u pastevního porostu sklizeného v roce 2007. Rok 2008 vykazuje hodnoty neodpovídající tomuto trendu, což lze vysvětlit možností vlivu klimatických podmínek (množství srážek, teplotní režim).

Graf 2. Obsah ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ sušiny) neutrálně detergentní vlákniny (NDF), acido detergentní vlákniny (ADF) a acido detergentního ligninu (ADL) u pastevního porostu.



3.2.2. Chemické složení dusíkatých látek pastevních porostů

Laboratorními postupy dle Licitry *et al.* (1996) byly zjištěny hodnoty nebílkovinného dusíku (NPN), nerozpustného dusíku (IP), rozpustného dusíku (SOLP), dusíku nerozpustného v kyselém detergentu (ADIP) a dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (NDIP) (tabulka 3).

Tabulka 3. Chemické složení dusíkatých látek ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ sušiny) u pastevního porostu.

Číslo vzorku	Termín odběru	NPN	IP	SOLP	ADIP	NDIP
1	22.5.2007	53,3	173,0	65,8	51,7	112,0
2	25.6.2007	26,5	137,3	31,6	35,6	101,7
3	25.7.2007	20,2	72,1	24,9	8,9	29,5
4	20.6.2008	70,5	160,9	76,6	12,3	76,1
5	18.7.2008	24,9	70,2	32,4	8,3	31,8
6	30.9.2008	18,0	98,3	27,4	14,0	40,8

ADIP = dusík nerozpustný v kyselém detergentu, IP = nerozpustný dusík, NDIP = dusík nerozpustný v neutrálním detergentu, NPN = nebílkovinný dusík, SOLP = rozpustný dusík.

V chemickém složení dusíkatých látek u sledovaných krmiv byly vykazovány nejnížší hodnoty pokaždé u stejných vzorků, tj. vzorku číslo 3 a vzorku číslo 5. Tyto vzorky měly ze všech

sledovaných vzorků krmiv nejnižší obsah dusíkatých látek, což se odrazilo na výsledných analýzách dle Licitry *et al.* (1996). Výjimku představoval rok 2008, kde hodnoty nejstaršího porostu vždy mírně stouply. Toto můžeme připočítat rozdílným klimatickým podmínkám, při kterých byl vzorek sklizen (množství srážek, teplotní režim) (Dubbs *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006).

Hodnoty NPN kolísaly od 18,0 (vzorek číslo 6) do 70,5 (vzorek číslo 4) g.kg⁻¹ sušiny. Nejvyšší hodnoty v roce 2007 vykazoval pastervní porost sklizený v první seči. Podobně tomu bylo v roce 2008, kde první seč vykazovala vysoké NPN, se stárnutím porostu se NPN snižovalo. Podobný klesající trend se stárnutím porostu byl zaznamenán též u IP, SOLP, ADIP a NDIP. Dosažené výsledky IP se pohybovaly od 70,2 (vzorek číslo 5) do 173,0 (vzorek číslo 1) g.kg⁻¹ sušiny a rozpustného dusíku (SOLP) od 24,9 (vzorek číslo 3) do 76,6 (vzorek číslo 4) g.kg⁻¹ sušiny. Proměnná ADIP se pohybovala v rozmezí od 8,3 (vzorek číslo 5) do 51,7 (vzorek číslo 1) g.kg⁻¹ sušiny a NDIP od 29,5 (vzorek číslo 3) do 112,0 (vzorek číslo 1) g.kg⁻¹ sušiny.

3.2.3. Frakce dusíkatých látek pastervních porostů

V tabulce 4 jsou uvedené frakce dusíkatých látek (A, B1, B2, B3 a C), které byly vypočítány dle rovnic Ghoorchi a Arbabi (2010).

Tabulka 4. Stanovení jednotlivých frakcí dusíkatých látek u pastervního porostu.

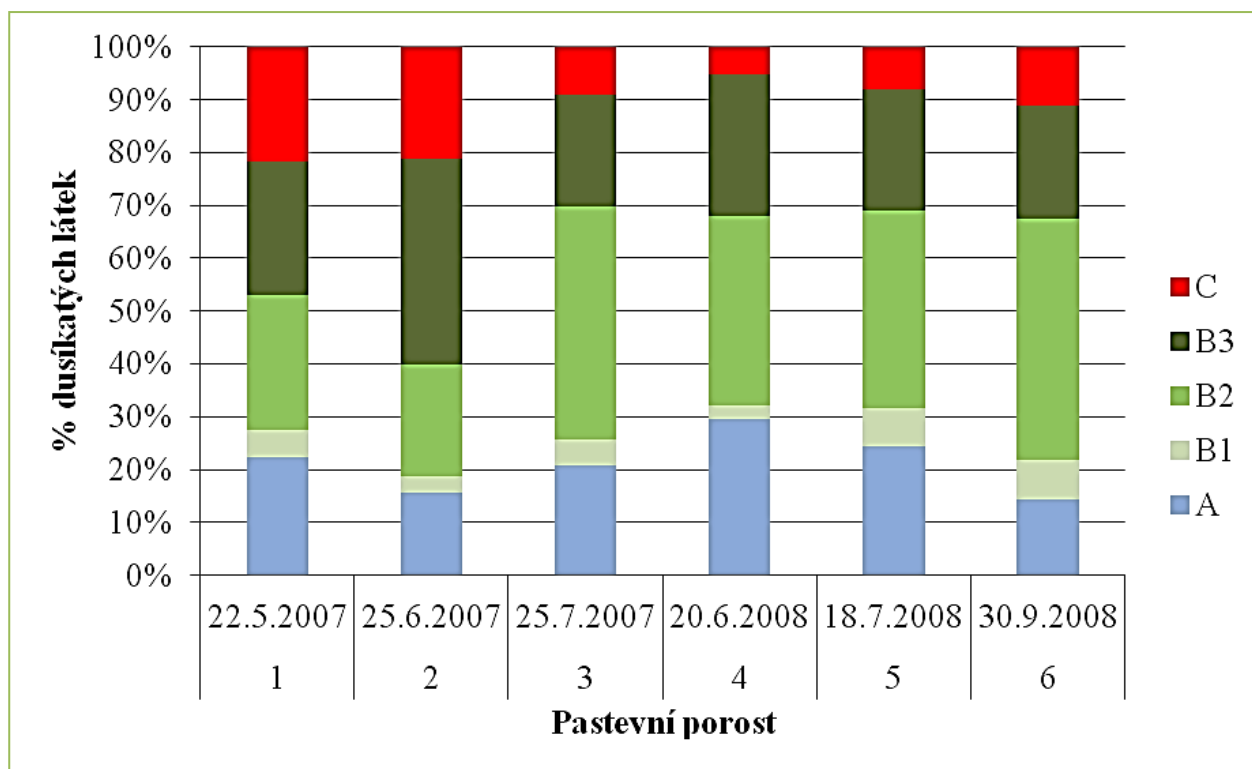
Číslo vzorku	Termín odběru	A	B1	B2	B3	C
		(% dusíkatých látek)				
1	22.5.2007	22,3	5,3	25,5	25,3	21,6
2	25.6.2007	15,7	3,0	21,1	39,2	21,1
3	25.7.2007	20,8	4,9	44,0	21,2	9,1
4	20.6.2008	29,7	2,6	35,7	26,9	5,2
5	18.7.2008	24,3	7,3	37,4	22,9	8,1
6	30.9.2008	14,3	7,5	45,8	21,3	11,2

A = nebílkovinný dusík, B1 = rychle rozložitelný protein, B2 = středně rozložitelný protein, B3 = pomalu rozložitelný protein, C = vázaný (nestravitelný) protein.

Frakce A, která je v bacheru rychle degradovatelná a do tenkého střeva se vůbec nedostane, se pohybovala v rozmezí od 14,3 do 29,7 % dusíkatých látek. Tato frakce zahrnuje peptidy, volné aminokyseliny, anomiak, amidy, aminy, močovinu, nukleotidy a dusičnany (Lanzas *et al.*, 2008). Oproti této frakci jsou hodnoty frakce B1 nižší, pohybují se od 2,6 do 7,5 % dusíkatých látek. Tato dusíkatá část krmiva (B1) je velmi rychle degradovatelná (200 až 300 %/hod) a dostává se do tenkého střeva (Mudřík *et al.*, 2006). Frakce B2 vykazuje nejvyšší hodnoty, v průměru 34,9 % dusíkatých látek (od 21,1 do 45,8 % dusíkatých látek). Tato frakce (B2) je v bacheru trávena středně rychle (5 až 15 %/hod) a dostává se do tenkého střeva (Mudřík *et al.*, 2006). Hodnoty frakce B3, která je v bacheru pomalu degradovatelná (0,1 až 0,5 %/hod) (Mudřík *et al.*, 2006), jsou od 21,2 do 39,2 % dusíkatých látek. Poslední částí dusíkatých látek je frakce C, která v bacheru nedegraduje a ve střevě není stravitelná. Hodnoty frakce C se pohybují v rozmezí od 5,2 do 21,6 % dusíkatých látek.

Podíl jednotlivých frakcí dusíkatých látek (v % dusíkatých látek) je znázorněn v grafu 3. Konečná hodnota by měla být 100 % a odchylky od 100 % se pohybují v rozmezí 0 až 0,1 %. To je dáno zaokrouhlením hodnot při stanovení jednotlivých frakcí dusíkatých látek.

Graf 3. Vyjádření podílu jednotlivých frakcí dusíkatých látek u pastevního porostu.



3.2.4. Statistické vyhodnocení

V tabulce 5 jsou uvedeny korelační koeficienty vyjadřující závislost mezi chemickými rozbory základních živin a jednotlivými frakcemi dusíkatých látek u sledovaných vzorků objemné píče. Vysoká negativní závislost ($P < 0,05$) byla potvrzena mezi obsahem dusíkatých látek (NL) a hrubou vlákninou ($r = -0,990$), NL a BNLV ($r = -0,973$), NL a organickou hmotou ($r = -0,799$) a NL a acido detergentní vlákninou ($r = -0,880$). Dále jednotlivé frakce dusíkatých látek byly ve významném korelačním vztahu ($P < 0,05$) s obsahem dusíkatých látek (NL) a frakcí A ($r = 0,903$), NL a frakcí B2 ($r = 0,714$), NL a frakcí B3 ($r = 0,886$) a NL a frakcí C ($r = 0,628$). Hrubá vláknina (VI) a acido detergentní vláknina (ADF) signifikantně ($P < 0,05$) korelovala s frakcemi dusíkatých látek, tj. s VI korelovala frakce A ($r = -0,842$), B2 ($r = -0,619$), B3 ($r = -0,928$) a C ($r = -0,711$); s ADF frakce A ($r = -0,853$), B2 ($r = -0,921$) a B3 ($r = -0,702$). Dále byla zaznamenána vysoká závislost mezi jednotlivými frakcemi dusíkatých látek a jejich chemickým složením. Konkrétně mezi NPN a frakcí A ($r = 1,000$), NPN a frakcí B2 ($r = 0,830$), NPN a frakcí B3 ($r = 0,709$); dále mezi SOLP a frakcí A ($r = 0,989$), SOLP a frakcí B2 ($r = 0,833$), SOLP a frakcí B3 ($r = 0,693$), mezi ADIP a frakcí B1 ($r = 0,514$), ADIP a frakcí B3 ($r = 0,674$), ADIP a frakcí C ($r = 1,000$) a mezi NDIP a frakcí A ($r = 0,568$), NDIP a frakcí B3 ($r = 0,933$), NDIP a frakcí C ($r = 0,895$).

Tabulka 5: Korelační koeficienty vybraných proměnných (chemické rozborů základních živin a jednotlivé frakce dusíkatých látek).

	Sušina původní	NL	Tuk	VI	BNLV	OH	ADF	NDF	ADL	BE	TIP	NPN	IP	SOLP	ADIP	NDIP	A	B1	B2	B3	
Sušina původní																					
NL	-0,804																				
Tuk	-0,864	0,494																			
VI	0,849	-0,990	-0,597																		
BNLV	0,780	-0,973	-0,516	0,966																	
OH	0,658	-0,799	-0,609	0,838	0,891																
ADF	0,501	-0,880	-0,105	0,831	0,832	0,625															
NDF	-0,562	0,235	0,355	-0,208	-0,195	0,115	-0,026														
ADL	-0,050	-0,174	0,256	0,153	-0,037	-0,237	0,384	0,195													
BE	-0,835	0,902	0,491	-0,893	-0,795	-0,521	-0,814	0,438	-0,412												
TIP	-0,810	0,980	0,583	-0,994	-0,970	-0,883	-0,835	0,113	-0,130	0,849											
NPN	-0,678	0,902	0,232	-0,842	-0,841	-0,506	-0,851	0,466	-0,246	0,889	0,798										
IP	-0,832	0,981	0,599	-0,996	-0,967	-0,870	-0,840	0,149	-0,136	0,870	0,998	0,807									
SOLP	-0,654	0,921	0,225	-0,863	-0,870	-0,563	-0,857	0,381	-0,230	0,860	0,829	0,989	0,828								
ADIP	-0,693	0,628	0,810	-0,711	-0,707	-0,886	-0,285	-0,055	0,300	0,390	0,745	0,289	0,726	0,357							
NDIP	-0,900	0,841	0,854	-0,908	-0,848	-0,873	-0,563	0,155	0,023	0,741	0,913	0,568	0,916	0,592	0,895						
A	-0,676	0,903	0,230	-0,842	-0,841	-0,506	-0,853	0,463	-0,247	0,889	0,798	1,000	0,807	0,989	0,288	0,568					
B1	-0,012	0,343	0,008	-0,341	-0,398	-0,500	-0,246	-0,436	0,035	0,029	0,400	0,172	0,335	0,318	0,514	0,296	0,174				
B2	-0,238	0,714	-0,233	-0,619	-0,669	-0,385	-0,921	0,053	-0,374	0,644	0,614	0,830	0,613	0,833	-0,006	0,245	0,832	0,226			
B3	-0,931	0,886	0,759	-0,928	-0,832	-0,729	-0,702	0,303	-0,205	0,912	0,910	0,709	0,930	0,693	0,674	0,933	0,708	0,075	0,411		
C	-0,693	0,628	0,810	-0,711	-0,707	-0,886	-0,285	-0,055	0,300	0,390	0,745	0,289	0,726	0,357	1,000	0,895	0,288	0,514	-0,006	0,674	

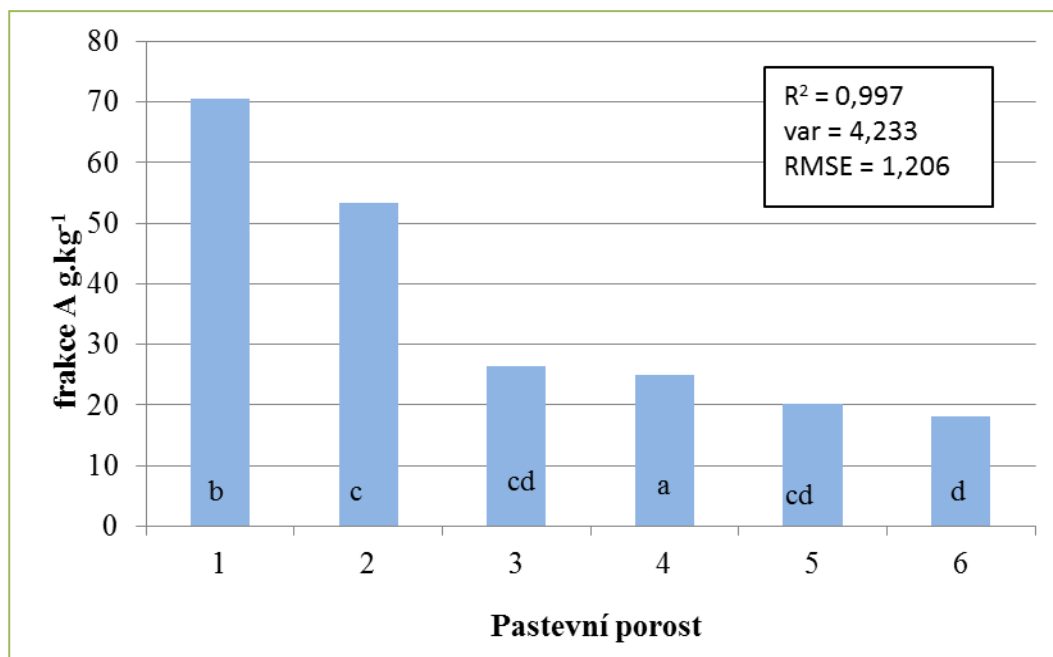
A = nebílkovinný dusík, ADF = acido detergentní vláknina, ADIP = dusík nerozpustný v kyselém detergentu, ADL = acido detergentní lignin, B1 = rychle rozložitelný protein, B2 = středně rozložitelný protein, B3 = pomalu rozložitelný protein, BE = brutto energie, C = vázaný (nestravitelný) protein, IP = nerozpustný dusík, NDF = neutrálně detergentní vláknina, NDIP = dusík nerozpustný v neutrálním detergentu, NL = dusíkaté látky, OH = organická hmota, TIP = dusík nerozpustný v kyselině trichloroctové, VI = hrubá vláknina.

„**Tučně**“ zvýrazněné korelační koeficienty byly stanoveny na hladině statistické významnosti $P < 0,05$.

Metodou mnohonásobného srovnávání (Scheffého test) byl proveden test statisticky významných rozdílů ($P < 0,05$). Mezi sledovanými krmivy byly zjištěny pro konkrétní frakce dusíkatých látek (A, B1, B2, B3 a C) statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). Významnost rozdílů mezi krmivy je zaznamenána v grafech 4, 5, 6 a 7.

U frakce A (graf 4) nebyl zaznamenán rozdíl ($P < 0,05$) pouze mezi krmivy 2, 3 a 5 a také 3, 5 a 6. Ostatní krmiva se lišila ($P < 0,05$).

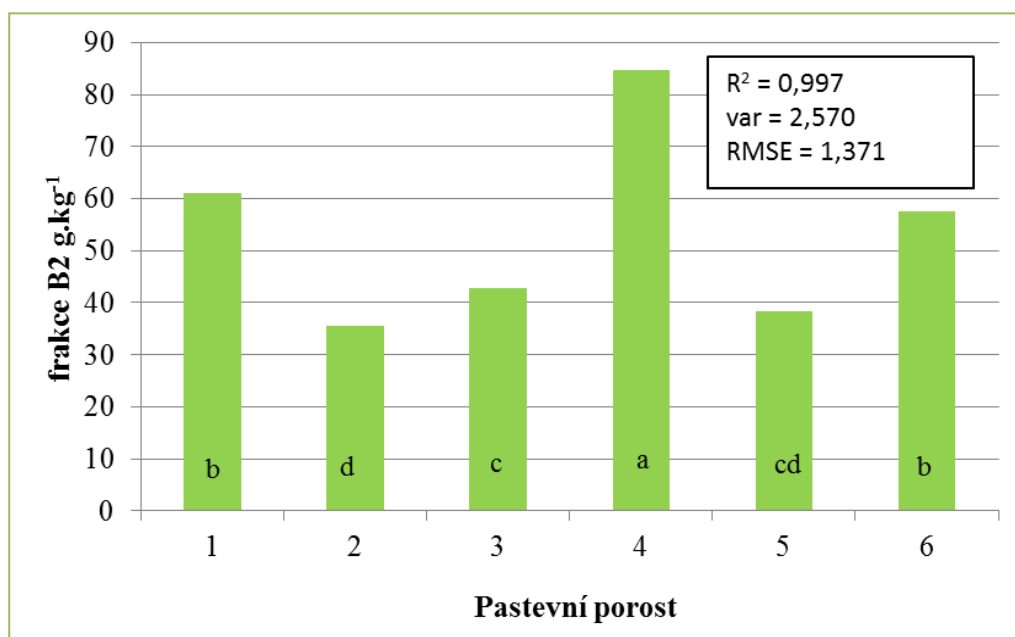
Graf 4. Podíl nebilkovinného dusíku (frakce A) na obsahu dusíkatých látek.



a, b, c, d různá písmena uvádějí statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými krmivy ($P < 0,05$; Scheffe test). R^2 = koeficient determinace, RMSE = středně kvadratická odchylka, var = koeficient variability.

Ve vztahu k frakci B2 jsou v grafu 5 uvedeny pro jednotlivá krmiva vzájemné statistické rozdíly ($P < 0,05$). Průkaznost rozdílů ($P < 0,05$) nebyla potvrzena mezi krmivy 3 a 5 a dále mezi 2 a 5 a mezi 1 a 6.

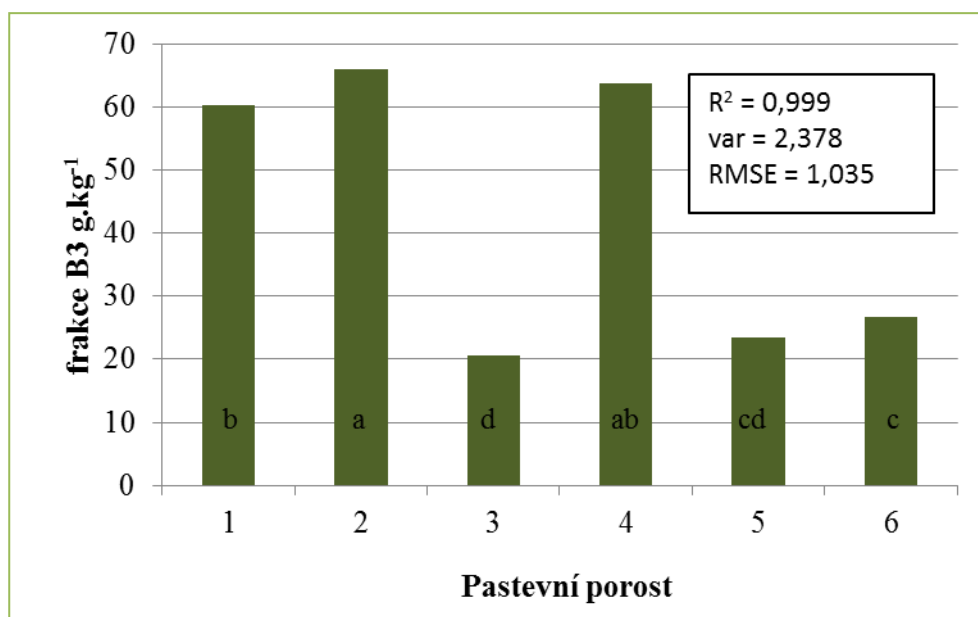
Graf 5. Podíl středně rozložitelného proteinu (frakce B2) na obsahu dusíkatých látek.



a, b, c, d různá písmena uvádějí statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými krmivy ($P < 0,05$; Scheffe test). R^2 = koeficient determinace, RMSE = středně kvadratická odchylka, var = koeficient variability.

Statistický rozdíl ($P < 0,05$) frakce B3 (graf 6) nebyl zaznamenán mezi krmivem 4 a krmivy 2 a 1 a dále krmivem 5 a krmivy 3 a 6.

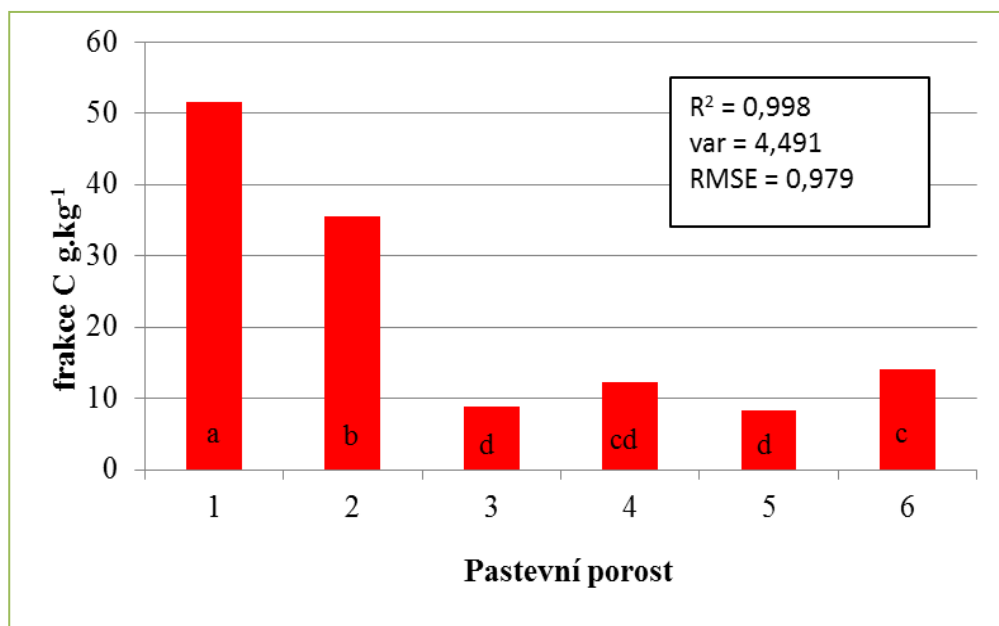
Graf 6. Podíl pomalu rozložitelného proteinu (frakce B3) na obsahu dusíkatých látek.



a, b, c, d různá písmena uvádějí statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými krmivy ($P < 0,05$; Scheffe test). R^2 = koeficient determinace, RMSE = středně kvadratická odchylka, var = koeficient variability.

Statistický rozdíl ($P < 0,05$) nebyl prokázán u frakce C (graf 7) mezi krmivy 3, 4 a 5 a dále 4 a 6.

Graf 7. Podíl vázaného (nestravitelného) proteinu (frakce C) na obsahu dusíkatých látek.



a, b, c, d různá písmena uvádějí statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými krmivy ($P < 0,05$; Scheffe test). R^2 = koeficient determinace, RMSE = středně kvadratická odchylka, var = koeficient variability.

3.3. Závěr

V metodice je uvedena nutriční hodnota pastevního porostu. Bylo stanoveno základní chemické složení krmiv a jednotlivé frakce dusíkatých látek. Frakce dusíkatých látek byly charakterizovány hodnotami NPN, SOLP, IP, NDIP, ADIP, A, B1, B2, B3 a C. Výsledky těchto stanovení popisují rozdílné zastoupení těchto frakcí v různých krmivech.

- Byl potvrzen vliv ($P < 0,05$) acido detergentní vlákniny a hrubé vlákniny na obsah dusíkatých látek a na jednotlivé frakce dusíkatých látek.
- Mezi sledovanými krmivy byly zjištěny pro konkrétní frakce dusíkatých látek statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) pro frakce A, B2, B3 a C a nebyla potvrzena pouze pro frakci B1.
- Jednotlivé seče a rok sklizně pastevního porostu významně ovlivňují obsah dusíkatých látek a jednotlivé frakce dusíkatých látek.

Hodnocení jednotlivých frakcí dusíkatých látek pomocí detergentních analýz zohledňuje požadavky zvířete na živinové složení krmiv a umožňuje získat širší pohled na proces trávení přijatých krmiv i krmné dávky v trávicím traktu přežvýkavců. Vyvážený poměr jednotlivých složek krmiva významně ovlivňuje využitelnost celé krmné dávky, která je základem dobrého zdravotního stavu, pohody a užitkovosti zvířete.

Vedle toho, že výsledky této práce přispívají ke zlepšení pravidelných laboratorních analýz a aktualizaci stávajících systémů, jsou cenným zdrojem hodnot do databáze krmivářských tabulek, které umožňují formulaci krmné dávky odpovídající nutričním požadavkům hospodářských zvířat. Kolísající nutriční hodnota pastevní píče by měla být vzata v úvahu při optimalizaci nejen konvenčních pastevních systémů. Tyto poznatky lze pak aplikovat při sestavování krmných dávek pro hospodářská zvířata, ale i jako součást ochrany biodiverzity spásaných oblastí.

III. Srovnání „novosti postupů“

Správnou výživou a krmáním lze do značné míry ovlivnit produkční potenciál přežvýkavců, který úzce souvisí se správným fungováním bachorové mikroflóry. Aby byla zajištěna správná potřeba proteinu, je důležité co nejpřesněji predikovat vstup a využitelnost (utilizaci) jednotlivých proteinových frakcí do trávicího traktu přežvýkavců.

Tato metodika objasňuje význam Cornellského systému, který zahrnuje výživu a trávení přežvýkavců v celém rozsahu, tj. zohledňuje dynamiku trávicího traktu přežvýkavců a požadavky zvířete na živinové složení krmiv. Pomocí detergentních analýz se zjistí zastoupení jednotlivých frakcí dusíkatých látek a lze tak získat širší pohled na trávení přijatých krmiv i krmné dávky v trávicím traktu přežvýkavců. Tyto postupy umožňují správné vybalancování živin, jejich vzájemných poměrů a koncentrací pro správnou funkci bachoru i pro zvíře samotné.

Výsledky této metodiky jsou dále použitelné pro doplnění nutriční databáze vzorků krmiv, jsou cenným zdrojem dat do krmivářských tabulek, pomocí kterých se formulují krmné dávky pro hospodářská zvířata.

IV. Popis uplatnění metodiky

Předložená metodika poskytuje základní informace o využívání a aplikaci Cornellského systému ve výživě přežvýkavců. Vzhledem k rozvoji používání tohoto systému u nás budou české zemědělské laboratoře častěji nuceny poskytovat tyto analýzy nejen pro zemědělské poradce a podniky zabývající se nutriční hodnotou a distribucí krmiv či krmných směsí, ale také pro samotné chovatele skotu. Přínosem této metodiky je přesnější charakteristika nutriční hodnoty krmiva, podrobný popis laboratorních postupů a snaha o aplikaci tohoto systému do rutinní praxe.

V. Ekonomické aspekty

Ekonomická náročnost celého experimentu vychází z nákladů na chemikálie potřebné pro laboratorní analýzy. Následná kalkulace je možná pouze za předpokladu dostatečného laboratorního vybavení, které je uvedeno v experimentální části metodiky (3.1. Materiál a metodika) a odvíjí se od množství analyzovaných vzorků. V tomto případě je vyčíslení nákladů vypracováno pro 10 vzorků a cena se odvíjí od výběru dodavatele a momentálního ocenění dané chemikálie.

Při stanovení nebílkovinného dusíku pomocí kyseliny trichloroctové ($C_2HCl_3O_2$) se vychází z předpokladu, že je k dispozici laboratorní vybavení vyjmenované v kapitole 3.1. Materiál a metodika. Potřeba kyseliny trichloroctové na 10 vzorků je stanovena na 70 Kč.

Při stanovení rozpustného dusíku a bílkovin je potřeba následujících chemikálií: dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), tetraboritan sodný dekahydrát ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), terc-Butylalkohol ($C_4H_{10}O$) a azid sodný (NaN_3). Při spotřebě chemikálií na 10 vzorků při dostatečném laboratorním vybavení (vyjmenováno v kapitole 3.1. Materiál a metodika) jsou náklady vyčísleny na 30 Kč.

U stanovení acido detergentního nerozpustného dusíku (ADIN) s využitím přístroje Fibertec a stanovení neutrálně detergentního nerozpustného dusíku (NDIN) s využitím přístroje Fibertec je cena odvislá rovněž od laboratorního vybavení. Dále je zde možné kalkulovat s náklady, které jsou potřebné pro ADF a NDF analýzu. Náklady na tyto rozborů jsou různé, pro jeden vzorek se pohybují od 200 Kč do 400 Kč za analýzu ADF a od 180 Kč do 400 Kč za analýzu NDF jednoho vzorku.

Dále je pro konečný výpočet frakcí dusíkatých látek znát celkový obsah dusíkatých látek, v našem případě metodou dle Kjeldahla. Toto stanovení se pro 10 vzorků dle ceníků laboratoří pohybuje od 200 Kč do 450 Kč.

Celkové náklady na stanovení frakcí dusíkatých látek (A, B1, B2,B3 a C) pro 10 vzorků se při potřebném vybavení laboratoře (viz. Kapitola 3.1. Materiál a metodika) pohybují od 4100 Kč do 8550 Kč.

V závěru studie došlo ke zhodnocení ekonomických aspektů celé práce, postavené na Cornellském systému, který využívá laboratorních analýz. Výhodou těchto čistě laboratorních analýz je to, že není nutný chov zvířat pro pokusné účely, čímž odpadají veškeré náklady spojené s jejich chovem (ustájení, krmení, potřeba pracovních sil,...). Ekonomická náročnost vychází pouze z nákladů na chemikálie potřebné pro laboratorní analýzy a z nákladů na poskytnutí služeb v rámci těchto analýz.

VI. Seznam použité literatury

1. AOAC. Official Methods of Analysis, AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, USA. 2005.
2. Arthington J.H., Brown W.F. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *Journal of Animal Science*. 2005. 83, 1726–1731 p.
3. Coblenz W.K., Fritz J.O., Fick W.H., Cochran R.C., Shirley J.E. *In situ* dry matter, nitrogen, and fiber degradation of alfalfa, red clover, and eastern gamagrass at four maturities. *Journal of Dairy Science*. 1998. 81, 150–161 p.
4. Cornell University, Department of Animal Science: Cornell Net Carbohydrate and Protein System [online]. [cit. 2014-06-15]. Dostupné z: <http://www.cncps.cornell.edu/>
5. Dubbs T.M., Vanzant E.S, Kitts S.E., Bapst R.F., Fieser B.G., Hewlett C.M. Characterization of season and sampling method effects on measurement of forage duality in fescue-based pastures. *Journal of Animal Science*. 2003. 81, 1308–1315 p.
6. Elizalde J.C., Merchen N.R., Faulkner D.B. *In situ* dry matter and crude protein degradation of fresh forages during the spring growth. *Journal of Dairy Science*. 1999. 82, 1978–1990 p.
7. Fox D.G., Tedeschi L.O., Tylutki T.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E. The cornell net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science Technology*. 2004. 112, 29–78 p.
8. Ghoorchi T., Arbabi A. Study of protein characteristic of five feeds by CNCPS model. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010. 5, 584–591 p.
9. Goering H.K., Van Soest P.J. *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agriculture handbook no. 379. Washington: U. S. Agricultural Research Service. 1970. 20 p.

10. Harazim J., Pavelek L., Čerešňáková Z., Homolka P., Třináctý J., Jambor V., Pozdíšek J., Zeman L. *Metodika pro stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek a aminokyselin krmiv v bachoru přežvýkavců (Metoda „in situ, nylon bag“)*. Sborník mezinárodní vědecké konference „Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců“. Opava: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně. 1999. 115–118 p.
11. Homolka P., Tománková, O., Komprda, T., Frydrych, Z. *Hodnocení dusíkatých látek krmiv pro přežvýkavce podle systému PDI*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 1996. 36 p.
12. Jančík F., Koukolová V., Kubelková P., Čermák B. Effect of grass species on ruminal degradability of silages and prediction of dry matter effective degradability. *Czech Journal of Animal Science*. 2009. 54, 315–323 p.
13. Jelínek P., Koudela K., Doskočil J., Illek J., Kotrbáček V., Kovářů F., Kroupová V., Kučera M., Kudláč E., Trávníček J. Valent M. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 2003. 414 p.
14. Koukolová V., Homolka P. *Krmná hodnota horských trvalých travních porostů v průběhu vegetační sezóny*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby. 2010. 36 p.
15. Koukolová V., Homolka P., Koukol O., Jančík F. Nutritive value of *Trifolium pretense* L. for ruminants estimated from *in situ* ruminal degradation of neutral detergent fibre and *in vivo* digestibility of organic matter and energy. *Czech Journal of Animal Science*. 2010. 55, 372–381 p.
16. Krishnamoorthy U., Sniffen C. J., Stern M. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an *in vitro* simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen undegraded nitrogen content of feedstuffs. *British Journal of Nutrition*. 1983. 50, 555–568 p.
17. Kudrna V., Čermák B., Doležal O., Frydrych Z., Hermann H., Homolka P., Illek J., Loučka R., Macháčová E., Martínek V., Mikyska F., Mrkvička J., Mudřík Z., Pindík J., Poděbradský Z., Pulkrábek J., Skřivanová V., Šantrůček J., Šimek M., Veselá M., Vrzal J., Zelenka J., Zemanová D. *Produkce krmiv a výživa skotu*. Praha: Agrospoj. 1998. 362 p.
18. Lanzas C., Broderick G.A., Fox D.G. Improved feed protein fractionation schemes for formulating rations with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. *Journal of Dairy Science*. 2008. 91, 4881–4891 p.
19. Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology*. 1996. 57, 347–358 p.
20. Mudřík Z., Doležal P., Koukal P. *Základy moderní výživy skotu*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 2006. 270 p.
21. Navrátil P. Hodnocení kvality proteinu v bílkovinných silážích aneb Není protein jako protein. *Náš chov*. 2010. 4, 52–54 p.
22. NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. *National Research Council*. Washington, USA. 2001. 381 p.
23. Písaříková B., Peterka J., Trčková M., Moudrý J., Zralý Z., Herzig I. The content of insoluble fibre and crude protein value of the aboveground biomass of *Amaranthus cruentus* and *A. Hypochondriacus*. *Czech Journal of Animal Science*. 2007. 52, 348–353 p.
24. Pozdíšek J., Vaculová K. Study of wheat (*Triticum aestivum* L.) quality for feeding ruminants using *in vitro* and *in vivo* methods. *Czech Journal of Animal Science*. 2008. 53, 253–264 p.

25. Richter M., Třináctý J. *Použití systému NRC 2001 v oblasti hodnocení proteinu krmiv pro dojnice*. Rapotín: Agrovýzkum Rapotín s.r.o. 2009. 34 p.
26. Rinne M., Nykänen A. Timing of primary growth harvest affects the yield and nutritive value of timothy-rec clover mixtures. *Agricultural and Food Science*. 2000. 9, 121–134 p.
27. Rulquin H. Protected lysine and methionine in dairy cows rations. *Feed Mix*. 1994. 11 (4), 24–27 p.
28. Schwab C.G., Tylutki T.P., Ordway R.S., Sheaffer C., Stern M.D. Characterization of proteins in feeds. *Journal of Dairy Science*. 2003. 83, E88–E103 p.
29. Sniffen C.J., Conner J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russell J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. carbohydrate and protein availability. *Journal of Dairy Science*. 1992. 70, 3562–3577 p.
30. Statistical Analysis Systems Inc. SAS; Statistic's Version 9.4 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2013.
31. Tang S., Tan Z., Zhou C., Jiang H., Jiang Y., Sheng L. A comparison of *in vitro* fermentation characteristics of different botanical fractions of mature maize stover. *Journal of Animal Feed Science*. 2006. 15, 505–515 p.
32. Třináctý J., Richter M., Pozdíšek J. Hodnocení degradovatelnosti proteinu u krmiv pro skot. *Krmivářství*. 2004. 5, 5–8 p.
33. Tyrolová Y., Výborná A. Effect of the stage of maturity on the leaf percentage of lucerne and the effect of additives on silage characteristics. *Czech Journal of Animal Science*. 2008. 53, 330–335 p.
34. Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 1991. 74, 3583–3597 p.
35. Zeman L., Doležal P., Kopřiva A., Mrkvicová E., Procházková J., Ryant P., Skládanka J., Straková E., Suchý P., Veselý P., Zelenka J. *Výživa a krmění hospodářských zvířat*. Praha: Profi Press, s.r.o. 2006. 360 p.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Konferenční sdělení:

Koukolová M., Koukolová V., Homolka P. Hodnocení frakcí dusíkatých látek ve výživě přežvýkavců. In *X. Kábrtovy dietetické dny*. Brno: VFU. 2013. 184–189 p.

Koukolová M., Koukolová V., Homolka P. Evaluation of Nitrogen Fractions in Ruminant Nutrition. In *NutriNET 2013*. Nitra: *Slovak University of Agriculture*. 2013. 57–62 p.

Odborné publikace:

Koukolová M., Koukolová V., Homolka P. Výživa založená na chemické frakcionaci a nutričních požadavcích přežvýkavců. *Krmivářství*. 2014. 18/4, 31–33 p.

Vědecká publikace:

Manuscript bude odeslán k oponentnímu řízení do IF vědeckého časopisu.

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: Hodnocení dusíkatých látek horských pastevních porostů dle Cornellského systému

Autoři: Ing. Marie Koukolová (40 %)
Ing. Veronika Koukolová, Ph.D. (30 %)
doc. Ing. Petr Homolka, CSc., Ph.D. (30 %)

Oponenti: prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.
Mendelova univerzita v Brně

Ing. Juraj Saksún
Ministerstvo zemědělství České republiky

ISBN 978-80-7403-136-6

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika vznikla jako součást řešení institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR MZERO0715.