

Vědecký výbor výživy zvířat

**In vitro-in vivo účinky komerční
směsi silic na bachorovou fermentaci
a produkci dojnic**

Ing. Miroslav Joch, Ph.D.

Praha, duben 2018



SOUHRN

Rostoucí obavy veřejnosti o rutinní využití antibiotik ve výživě hospodářských zvířat vedly k omezení jejich využití jako stimulatorů růstu. To zvýšilo zájem o nalezení přírodních alternativ, pozornost se zaměřila především na rostlinné látky, jako jsou silice, protože některé z těchto látek prokázaly podobné antimikrobiální účinky jako ionoforová antibiotika. Hlavními cíli využití silic ve výživě zvířat je zvýšení užitkovosti a snížení dopadů produkce potravin na životní prostředí. Předpokládá se, že silice mohou zvýšit efektivitu bachorové fermentace snížením produkce metanu a amoniaku v bachoru. V této studii bylo nejdříve stanoveno složení komerční směsi silic (KSS). Poté byly účinky této KSS na bachorovou fermentaci a užitkovost zvířat ověřovány v jednom *in vitro* a jednom *in vivo* experimentu. S využitím vsádkové 24 hodinové *in vitro* inkubace bylo testováno pět koncentrací (20, 100, 200, 600 a 1000 mg/l) KSS. Produkci metanu a amoniakálního dusíku ($\text{NH}_3\text{-N}$) snižovaly pouze nejvyšší koncentrace KSS (600 a 1000 mg/l), nicméně tyto koncentrace také snížily celkový rozsah fermentace. Do *in vivo* experimentu bylo zařazeno 30 holštýnských dojnic, které byly náhodně rozděleny do dvou stejně velkých skupin, kontrolní (KON) a pokusné s přidavkem komerční směsi silic (KSS; 1,2 g/kus/den). Pokusné období trvalo 15 týdnů. Mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl v příjmu sušiny ani produkci mléka. V mléce skupiny KSS bylo nižší zastoupení tuku ve srovnání se skupinou KON (3,69 proti 4,21 %). Po přidavku KSS bylo zvýšeno pH bachorové tekutiny, což bylo spojeno s významným snížením celkové produkce těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině krav s KSS. Molární podíl jednotlivých těkavých mastných kyselin ani koncentrace amoniakálního dusíku ($\text{NH}_3\text{-N}$) nebyly podáním KSS ovlivněny. Výsledky předkládané studie naznačují, že při použitých koncentracích nemá KSS pozitivní účinky na bachorovou fermentaci ani produkci dojnic.

SUMMARY

With the increase of public concern over the routine use of antibiotics in livestock, the addition of plant extracts, such as essential oils, could become a natural alternative in the diets since it might have similar antimicrobial properties as the ionophores. Main goals regarding the use of essential oils in ruminant nutrition are an improvement of animal performance and a decrease of the environmental impact of food production. It has been hypothesized that essential oils can improve rumen fermentation effectivity through reduction methane and ammonia production. In this study, a composition of one commercial blend of essential oils (KSS) was analyzed. Then *in vitro* and *in vivo* effects of the KSS on rumen fermentation and dairy cow production were evaluated. Five concentrations (20, 100, 200, 600 and 1000 mg/l) of KSS were evaluated using *in vitro* 24 h batch incubation technique. The effects of KSS addition on methane and ammonia nitrogen (NH₃-N) were manifested only at the two highest concentrations. However, these concentrations also inhibit overall fermentation. In the *in vivo* experiment, thirty Holstein cows were randomly assigned to either control (KON) or KSS supplemented (1.2 g/cow/day) total mixed rations. The experiment lasted 15 weeks. There were no significant differences between treatments for dry matter intake and milk production. Milk fat content was lower for cows fed KSS supplemented diet than for cows fed KON diet (3,69 vs. 4,21 %). In KSS group, pH of rumen fluid was increased, which was associated with significantly reduced volatile fatty acid concentrations. Molar proportions of individual volatile fatty acids and ruminal ammonia nitrogen (NH₃-N) concentration were unaffected. Overall, results from the present study suggest no beneficial effects of tested concentrations of KSS on rumen fermentation and production of dairy cows.

Souhrn	1
Summary	3
1 Úvod.....	5
1.2 Vliv chovu přežvýkavých hospodářských zvířat na životní prostředí.....	6
1.3 Snižování dopadů chovu přežvýkavců na životní prostředí	7
1.4 Silice	8
1.5 Produkce metanu v bachoru a možnost snížení této produkce pomocí silic	9
1.6 Produkce amoniaku v bachoru a možnost snížení této produkce pomocí silic	11
1.7 Problematické aspekty využití silic ve výživě zvířat.....	12
1.8 Cíl a hypotézy práce	13
2 Materiál a Metodika	15
2.1 Složení těkavé frakce komerční směsi silic	15
2.2 <i>In vitro</i> experiment	15
2.3 <i>In vivo</i> experiment	19
2.4 Statistická analýza	21
3 Výsledky	22
3.1 Složení komerční směsi silic	22
3.2 <i>In vitro</i> experiment	23
3.3 <i>In vivo</i> experiment	25
4 Diskuze	29
5 Závěr	37
6 Literatura.....	38

1 ÚVOD

Přežvýkavci jsou jednou z neúspěšnějších skupin býložravých savců na planetě. V současné době na světě žije okolo 200 druhů přežvýkavců, kteří jsou řazeni do 73 rodů a šesti čeledí. Z celkového počtu přežvýkavců je asi 75 milionů volně žijících a 3,5 miliardy domestikovaných zvířat (Hackmann a Spain, 2010). Obrovský význam domestikovaných přežvýkavců spočívá v jejich jedinečné schopnosti přeměnit objemná krmiva s nižším zastoupením živin na velmi kvalitní živočišné produkty s vysokým obsahem energie a bílkovin, které hrají nezastupitelnou úlohu ve výživě lidí. S tím jak roste světová lidská populace a zvyšuje se životní úroveň v některých částech světa (Asie, Latinská Amerika), roste také poptávka po těchto živinově bohatých potravinách.

Účinná přeměna méně hodnotných krmiv na vysoce hodnotné potraviny je umožněna jedinečnou spoluprací mikroorganismů v batoru a hostitelským organismem přežvýkavce (Knapp et al., 2014). Z této symbiózy těží obě strany, nicméně pro správný průběh interakce je nezbytné, aby každá ze stran naplňovala své specifické funkce. Hostitelský organismus zajišťuje optimální prostředí pro růst mikroorganismů (teplota, anaerobióza, pH, dostatečný přísun substrátů a vody apod.). Naopak mikroorganismy poskytují enzymatický aparát k rozkladu komplexních polysacharidů, tzn. složek potravy, které by jinak byly pro přežvýkavce nestravitelné (Rodrigues, 2016). Při rozkladu substrátů přicházejících do batoru mikroorganismy produkují těkavé mastné kyseliny a syntetizují mikrobiální protein, tím poskytují hostitelskému organismu energii a proteiny. Nicméně tento proces batorové fermentace není stoprocentně účinný a je doprovázen ztrátami energie (ve formě metanu) a proteinu (ve formě amoniaku), což omezuje užitkovost zvířat a navíc přispívá k uvolňování znečišťujících látek do prostředí. V minulosti byly tyto ztráty velice účinně snižovány s využitím některých – především ionoforových – antibiotik. Avšak nárůst rezistence mikroorganismů k antibiotikům vedl ke zvýšenému zájmu vědců a poté i celé společnosti o nadměrné mimoterapeutické využívání antibiotik ve výživě zvířat. Nižší sociální přijatelnost antibiotik vyústila v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003, kterým bylo od 1. ledna 2006 zakázáno ve všech zemích EU používání antibiotik jako stimulátorů užitkovosti. Po tomto zákazu vzrostlo úsilí o nalezení přírodních látek, které by mohly antibiotika nahradit a zvýšit tak užitkovost zvířat bez negativních vlivů na mikrobiální rezistenci. Mezi látky, jejichž účinkům na zvýšení produktivity přežvýkavců se věnovala v posledních letech významná pozornost, patří sekundární metabolity rostlin (SMR) a mezi nimi především silice (Calsamiglia et al., 2007). Původně byly silice s ohledem na výživu

přežvýkavců považovány za látky antinutriční, protože tyto látky mohou mimo jiné snížit chutnost některých druhů rostlinných krmiv (Benchaar et al., 2008). Až později se začalo uvažovat o potenciálně pozitivních účincích silic. Mezi ty nejdůležitější, které však dosud nejsou jednoznačně potvrzeny, patří schopnost snížit produkci metanu v bachoru, schopnost zpomalit bachorovou degradaci proteinů, a tím snížit obrát dusíku, a schopnost zpomalit bachorovou degradaci škrobu, tzn. snížit riziko acidóz u zvířat krmených vysokými dávkami jaderných krmiv (Duval et al., 2007; Cobellis et al., 2016).

1.2 Vliv chovu přežvýkavých hospodářských zvířat na životní prostředí

Přežvýkavá hospodářská zvířata vysokou produkcí metanu a vylučováním dusíku ve výkalech a moči negativně ovlivňují životní prostředí. Metan je po oxidu uhličitým druhý nejvýznamnější skleníkový plyn, zůstává v atmosféře po velmi dlouhou dobu (uvádí se 9–15 let) a zachycuje teplo v atmosféře s až 21krát větší účinností než oxid uhličitý (FAO, 2006). Přežvýkavci se podílí na celkové světové produkci skleníkových plynů pocházejících z lidské činnosti 16–25 % a okolo 33 % na produkci metanu z lidské činnosti. Produkce metanu pro přežvýkavce znamená ztrátu 2–15 % hrubé přijaté energie, tato ztráta kolísá v závislosti na rozsahu příjmu a složení krmné dávky (Kumar et al., 2009; Eckard et al., 2010; Rooke et al., 2014). Snížení produkce metanu by znamenalo zvýšení dostupnosti energie pro zvíře, která by mohla být využita na růst či produkci mléka (Rooke et al., 2014). Emise metanu u přežvýkavců pocházejí především z trávicích procesů (87 % z bachoru a 13 % z tlustého střeva), ale i z jejich výkalů a moči (Torrent a Johnson, 1994).

Výkaly a moč přežvýkavců jsou také významným zdrojem emisí dusíku. Jednou z důležitých součástí cyklu dusíku ve výkalech a moči představuje amoniak. Ureáza, mikrobiální enzym přítomný ve značném množství v půdě i výkalech, rychle převádí močovinu vylučovanou močí na amoniak, který může být oxidován procesem nitrifikace na dusičnany a dusitany. Nitráty spolu s amoniakem mohou být snadno asimilovány rostlinami, nicméně amoniak je jako plyn převážně uvolňován do atmosféry (Klein a Eckard, 2008), takto uvolněný amoniak představuje asi 30–70 % amoniaku výkalů a moči (Hristov et al., 2013). Amoniak se může do půdy vrátit se srážkami a přispívat tak ke znečištění podzemních vod, nebo mikrobiálním procesem nitrifikace a denitrifikace oxidů dusíku. Oxidy dusíku jsou nejsilnějšími skleníkovými plyny a představují asi 10 % celosvětových emisí skleníkových plynů (Hristov et al., 2013). V průměru přežvýkavci vyloučí mezi 75 až 95 % přijatého dusíku (Cobellis et al., 2016). Snížení emisí metanu a dusíku z chovu přežvýkavců je jednou z důležitých oblastí snižování dopadu živočišné produkce na životní prostředí. Snížení těchto

emisí může významně přispět ke zlepšení udržitelnosti produkce potravin (Cobellis et al., 2016).

1.3 Snižování dopadů chovu přežvýkavců na životní prostředí

Při snižování dopadů chovu přežvýkavců na životní prostředí je v posledních letech hlavní pozornost věnována snižování produkce metanu. Bylo ověřováno poměrně velké množství strategií, ty hlavní spojené s výživou shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1. Strategie snižování produkce metanu u přežvýkavců spojené s výživou, jejich význam, potenciál využití v Evropě a potřeba dalšího vědeckého prověření

Strategie	Význam v Evropě	Potřeba prověření
Krmné dávky bohaté na koncentrovaná krmiva (↑ škrob, ↓ vláknina)	Potenciál téměř vyčerpán	↓
Podávání tuků	Potenciál téměř vyčerpán	(↑)
Doplňkové látky		
Halogeny	Nejsou povoleny v EU	↓
Ionoforová antibiotika	Nejsou povolena v EU	↓
Vyvazovače H ₂ (např. kyselina fumarová)	Bez jasných důkazů účinnosti	↑↑
Probiotika	Bez jasných důkazů účinnosti	↑
Sekundární metabolity rostlin (třísloviny, saponiny, silice)	Bez jasných důkazů účinnosti	↑↑

↓ není; ↑ je; ↑↑ je velmi vysoká (upraveno podle Flachowsky a Lebzien, 2012)

Jak je uvedeno v tabulce 1, sekundární metabolity rostlin jsou látky, u kterých doposud není ve vědecké komunitě konsenzus o jejich pozitivních účincích na produkci metanu a zvýšení účinnosti bachorové fermentace (Flachowsky a Lebzien, 2012), nicméně pokud by se účinnost prokázala, byl by to velmi elegantní způsob manipulace s bachorovou fermentací přežvýkavců, protože SMR jsou přirozenou součástí rostlin a rostliny jsou přirozeným krmivem býložravců, a tedy i přežvýkavců.

1.4 Silice

Z pohledu ovlivnění bachorové fermentace mezi nejperspektivnější sekundární metabolity rostlin patří silice. Silice jsou přírodní, těkavé, často velmi aromatické komplexní rostlinné sloučeniny olejovitého charakteru. V původní sušině rostliny jsou silice pouze malou částí (většinou do 1 %) (Gershenzon a Croteau, 1991). Při pokojové teplotě jsou silice většinou tekuté. Tyto látky jsou hůře rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v tucích, alkoholu a dalších organických rozpouštědlech. Jak bylo uvedeno, silice jsou sloučeniny, mohou obsahovat až okolo 100 jednotlivých látek, většinou to bývá mezi 20 a 60 složkami, převážně se jedná o alkoholy, aldehydy, ketony, uhlovodíky, estery a étery (Benchaar et al., 2007). Účinné látky silic, které jsou v silicích nejčastěji zastoupeny, se řadí do dvou chemických skupin: terpenoidy (monoterpenoidy a seskviterpenoidy) a fenylypropanoidy. Terpenoidy jsou početnější a různorodější skupinou, v literatuře bylo popsáno okolo 15 000 různých látek patřících mezi terpenoidy. Základní struktura terpenoidů sestává z izoprenových jednotek (C_5H_8), v závislosti na počtu těchto jednotek se terpenoidy dále dělí do skupin. Nejdůležitější složky silic patří většinou mezi monoterpenoidy (dvě izoprenové jednotky; obvykle tvoří až 90 % silice) či seskviterpenoidy (tři izoprenové jednotky) (Gershenzon a Croteau, 1991). Fenylypropanoidy nepatří mezi nejběžnější složky silic, avšak v některých rostlinách jsou zastoupeny ve významném množství. Fenylypropanoidy jsou charakterizovány postranním řetězcem s třemi uhlíky, který je navázán na aromatickém kruhu s šesti uhlíky (Sangwan et al., 2001). V silici jsou typicky zastoupeny dvě či tři hlavní složky (většinou terpenoidy; 20–70 %), které určují hlavní biologickou aktivitu, a množství dalších složek ve stopových množstvích (Bakkali et al., 2008; Okoh et al., 2010). Různé složky v každé silici mohou působit aditivně, synergicky či antagonicky (Burt, 2004). Silice jsou obvykle produkovány ve specializovaných buňkách nebo skupinách buněk, které jsou rozesety po celé rostlině, včetně kořenů, kůry, semen, květů, okvětních lístků, listů, plodů a stonků. Složení silice je velice proměnlivé a to v závislosti na druhu rostliny, fázi růstu a části rostliny, která byla použita pro extrakci (tj. listy, kůra, květy, semena, kořeny). Dále je složení ovlivněno podmínkami pěstování (složení půdy, teplota, osvit a vlhkost) (Hart et al., 2008) a metodou extrakce (Okoh et al., 2010). Tradičně se získávají z těkavé frakce rostlin procesem destilace vodní parou (Gershenzon a Croteau, 1991).

Silice mají poměrně široké spektrum pozitivních účinků na zdraví, především na kardiovaskulární nemoci, některé nádory, zánětlivé procesy a obecně na choroby, ve kterých hraje důležitou roli nekontrolovaná produkce volných radikálů. Nicméně mezi nejdůležitější

vlastnosti těchto látek patří jejich antiseptický a antimikrobiální účinek. Přestože antiseptické vlastnosti některých rostlin byly známy (a také využívány) již ve starověku, první vědecký popis antimikrobiálních vlastností se objevil až na začátku dvacátého století (Calsamiglia et al., 2007). Pro vysvětlení antimikrobiálního účinku silic bylo navrženo několik hypotéz. Nicméně heterogenost a komplexnost silic naznačuje, že jejich antimikrobiální působení je spíše spojeno se schopností mířit na více buněčných cílů než pouze s jediným konkrétním mechanismem účinku (Benchaar et al., 2007). Jeden z těchto antimikrobiálních účinků silic (terpenoidů a fenylypropanoidů), může být zprostředkován přes interakci s buněčnou stěnou mikroorganismů (Dorman a Deans, 2000). Přinejmenším část tohoto účinku je způsobena hydrofobní podstatou cyklických uhlovodíků, která jim umožňuje působení na buněčnou membránu a hromadění v její lipidové dvouvrstvě, mezi řetězci mastných kyselin (Ultee et al., 1999). To způsobí konformační změny ve struktuře membrány a její rozvolnění (Griffin et al., 1999). Ztráta stability membrány má za následek únik iontů, který vyústí v pokles transmembránového iontového gradientu. Ve většině případů to neznamena přímo zánik buňky, bakterie dokáží tento únik iontů vyvažovat využitím iontových pump, při této činnosti však spotřebují poměrně velké množství energie, a tím zpomalí svůj růst (Ultee et al., 1999). V kontinuální bakteriální kultuře, která je typická pro bachor, znamená zpomalení růstu změnu v poměru jednotlivých bakteriálních populací a tedy změnu fermentačního profilu (Calsamiglia et al., 2007). Účinek silic by měl být výraznější proti gram-pozitivním bakteriím, kde mohou hydrofobní sloučeniny silic přímo působit na stěnu bakterií. Naopak u gram-negativních bakterií hydrofilní vnější buněčná stěna neumožňuje přímý vstup lipofilních látek. Většina účinných látek silic jsou, podobně jako monensin, látky lipofilní a nemohou tedy proniknout membránou gram-negativních bakterií (Cimanga et al., 2002). Účinky silic na houby, protozoa a viry by měly být zprostředkovány podobnými biologickými mechanismy jako účinky na bakterie (Jouany a Morgavi, 2007).

1.5 Produkce metanu v bachoru a možnost snížení této produkce pomocí silic

Metan je v bachoru produkován metanogeny, tj. skupinou anaerobních metanogenních archeí. Bachorové metanogeny produkují metan biochemickou redukcí oxidu uhličitého vodíkem, který je produkován bakteriemi, houbami a taxonomickou skupinou protozoa v průběhu fermentace krmiva (Bodas et al., 2012). Jedinečný způsob produkce metanu zahrnuje tři klíčové koenzymy: koenzym F₄₂₀ (zapojený do přenosu elektronů), koenzym M (zapojený do přenosu metylové skupiny) a nízkomolekulární, oxidačně labilní a teplotně stabilní koenzym B (zapojený do konečné reakce produkce metanu) (Kumar et al., 2009).

Metanogeneze je klíčová pro udržení nízké koncentrace vodíku (10^{-6} – 10^{-7} mol/l) v bachoru. Pro správný průběh fermentace je nízká koncentrace vodíku klíčová (Bodas et al., 2012). Množství v bachoru vyprodukovaného metanu je ovlivněno několika faktory, jako je typ diety, přítomnost a zastoupení jednotlivých druhů bakterií, protozoí a metanogenů, interakce mezi jednotlivými mikroorganismy a jejich metabolický stav. Metanogenní archea se mohou v bachoru vyskytovat volně v bachorové tekutině, přichycené na částicích krmiva, uvnitř či na povrchu protozoí (jako ekto- a endosymbionti), anebo přichycené na bachorovém epitelu (Patra, 2012). Celkový počet metanogenů kolísá od 10^7 do 10^9 buněk/ml bachorové tekutiny především v závislosti na obsahu vlákniny v krmné dávce. Celkově bylo na zemi určeno 28 rodů a 113 druhů metanogenů, nicméně pouze několik málo druhů bylo izolováno z bachoru (Patra, 2012), konkrétně bylo v bachoru odhaleno 6 rodů a 8 druhů (Knapp et al., 2014). V bachoru hospodářských zvířat patří většina metanogenů do rodů *Methanobrevibacter* and *Methanosarcina*. Převládající nalezené druhy zahrnují *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium bryanti*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* a *Methanoculleus olentangyi* (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010; Patra, 2012). Zastoupení metanogenů koreluje se zastoupením celulolytických bakterií, které v bachoru produkují vodík (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010). Vliv na velikost produkce metanu v bachoru má také zastoupení protozoí z řádu Entodiniomorpha (např. *Entodinium longinucleatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Entodinium bursa* a *Eremoplastron bovis*), toto zastoupení pozitivně koreluje se zastoupením metanogenů (Patra, 2012). Symbiotický vztah mezi metanogeny a taxonomickou skupinou protozoa je zodpovědný až za 37 % celkové produkce metanu v bachoru (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010).

Snížení produkce metanu bez snížení rozsahu fermentace a trávení je v tak komplexním prostředí, jakým je bachor, velice náročné. Jsou tři možné způsoby snížení bachorové produkce metanu: 1) přímou inhibicí metanogeneze (metanogenů), 2) snížením produkce vodíku a 3) nalezení alternativní cesty pro využití vodíku (Patra, 2012). U silic připadají v úvahu všechny tři možnosti. Předpokládá se, že především vyšší koncentrace silic jsou schopny přímo inhibovat metanogeny (Bodas et al., 2012). Snížení produkce vodíku v bachoru může být dosaženo především inhibicí protozoí a také některých skupin, především gram-pozitivních, bakterií. V bachoru představují gram-pozitivní bakterie převážně producenty kyseliny octové a máselné, zatímco gram-negativní bakterie jsou považovány za producenty kyseliny propionové (Stewart et al., 1997). Produkce kyseliny propionové je někdy popisována jako cesta spotřeby vodíku, což není zcela přesné. Spíše bychom mohli říci,

že produkce této kyseliny je alternativou produkce vodíku. V každém případě je ale zvýšená produkce kyseliny propionové velice úzce spojena se sníženou produkcí metanu (Janssen, 2010).

1.6 Produkce amoniaku v bachoru a možnost snížení této produkce pomocí silic

Přiměřený příjem hrubého proteinu, který poskytuje dostatek aminokyselin i dostupného dusíku pro syntézu mikrobiálního proteinu, je pro přežvýkavce i jejich chovatele zásadní. Na druhou stranu nadbytečný příjem proteinu může negativně ovlivnit užitkovost zvířat, tím že sníží účinnost využití dusíku, zároveň se tím zvyšuje cena krmiva, protože proteiny jsou nejdražší složkou krmné dávky (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010). Přežvýkavci využívají aminokyseliny pocházející ze dvou zdrojů, z přijatého krmiva a z buněk mikroorganismů, převážně bakterií. Odhaduje se, že asi 50 a více % aminokyselin strávených přežvýkavcem pochází z mikrobiálního proteinu (Bach et al., 2005). Degradovatelná část proteinu obsažená v krmivu je v bachoru obvykle rychle rozložena mikrobiálními proteázami, produkovanými bakteriemi, taxonomickou skupinou protozoa a houbami, na peptidy a aminokyseliny, které jsou vychytávány mikrobiálními buňkami a využívány pro syntézu mikrobiálního proteinu. Rychlost uvolňování aminokyselin je obvykle vyšší než rychlost jejich využití, přesto je ale koncentrace volných aminokyselin v bachoru nízká, protože nadbytečné aminokyseliny jsou rozloženy na těkavé mastné kyseliny a amoniak, a tím se stávají nejvýznamnějším zdrojem amoniaku v bachoru. Cílem výživy přežvýkavců je maximalizovat množství aminokyselin odcházejících z bachoru. Toho může být dosaženo tím, že se v bachoru sníží degradace proteinů krmiva do té míry, že všechny v bachoru uvolněné aminokyseliny jsou využívány k tvorbě mikrobiálního proteinu (Atasoglu a Wallace, 2003). Ve skutečnosti je v bachoru rozloženo přes 70 % dietárního proteinu, ale pouze malá část tohoto degradovaného proteinu je znovu využita pro syntézu těl mikroorganismů, větší část je rozložena až na amoniak (Bach et al., 2005). Podstatná část v bachoru vytvořeného amoniaku je krevním oběhem transportována do jater, kde je přeměněna na močovinu. Většina vytvořené močoviny je vylučována močí, menší část se dostává zpět do bachoru ve slinách, či přímo z krevního oběhu přes stěnu bachoru (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010). Amoniak se v bachoru nachází převážně v protonované formě amonného iontu (NH_4^+). Protonací a deprotonací amoniaku může být v bachoru regulováno pH a schopnost některých molekul procházet přes buněčné membrány. Proto je amoniak považovaný za důležitý meziprodukt zapojený do regulace acido-bazické rovnováhy a metabolismu dusíku (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010).

Většina amoniaku (až 50 % celkového množství) v bacheru je produkována skupinou bakterií, která je v anglicky psané vědecké literatuře označována „hyper ammonia-producing bacteria“ ve zkratce HAP, tedy bakterie produkující významné množství amoniaku. Tato skupina bakterií představuje pouze malou část (do 1 %) celkové bakteriální populace (Russell et al., 1991) a je charakterizována nejen vysokou deaminační aktivitou, která může být ovlivňována typem a formou krmné dávky, ale také nízkou schopností využívat sacharidy (Eschenlauer et al., 2002). Všechny známé bakterie HAP jsou gram-pozitivní a vysoce citlivé na účinky ionoforových antibiotik, např. monensinu (Eschenlauer et al., 2002). Dodnes bylo identifikováno 14 různých gram-pozitivních bakteriálních druhů HAP, nicméně nejvyšší deaminační kapacita je přisuzována druhům *Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum* a *Prevotella ruminicola* (Szumacher-Strabel a Cieślak, 2010).

Produkce amoniaku v bacheru nepředstavuje pouze ztrátu dusíku, ale také významný zdroj emisí zatěžující životní prostředí. Snížení nadměrného vylučování dusíku přežvýkavými hospodářskými zvířaty by mohlo být dosaženo některými doplňkovými látkami v krmivech, které by ovlivnily metabolismus dusíku v bacheru, především degradaci hrubého proteinu, mikrobiální syntézu proteinu a přechod dusíku krmiva z bacheru do tenkého střeva. Mezi tyto doplňkové látky by mohly patřit i silice, které se ukázaly být slibným zdrojem účinných látek schopných snížit mikrobiální rozklad proteinu krmiva v bacheru. Několik studií prokázalo, že tyto přírodní látky mohou inhibovat proteolýzu, peptidolýzu a deaminaci aminokyselin účinkem na některé skupiny mikroorganismů. Zdá se, že účinky silic mohou být spojeny se selektivním účinkem na bakterie HAP, *Ruminobacter amylophilus* a proteolytické bakterie rodu *Prevotella* (Wallace et al., 2002). Mimoto silice také mohou ovlivnit bakteriální kolonizaci substrátů s vysokým obsahem škrobu. Tyto účinky mohou mít význam především v intenzivních chovech, kde jsou zvířata krmena dávkou s vysokým obsahem proteinu a škrobu (Patra a Saxena, 2009).

1.7 Problematické aspekty využití silic ve výživě zvířat

Přesto, že se silice ukázaly jako přírodní látky, které mají slibný potenciál pozitivně ovlivnit bacherovou fermentaci (snížit produkci metanu a amoniaku), dosud nebylo dosaženo průlomového objevu, který by byl aplikovatelný v praxi (Cieślak et al., 2013; Cobellis et al., 2016). Také zůstávají některé nezodpovězené otázky spojené s využitím silic. Poměrně malá pozornost byla věnována metabolismu silic a jejich složek v trávicí soustavě přežvýkavců. Další otázkou je, zda silice, jako aromatické látky, mohou nepříznivě ovlivnit organoleptické vlastnosti jak krmiva přijímaného zvířetem a snižovat tak jeho příjem, tak živočišných

produktů. U živočišných produktů (maso, mléko) není nebezpečím pouze změna organoleptických vlastností, ale také nebezpečí toxických účinků reziduí silic na člověka. U některých silic, které jsou obecně považovány za bezpečné (Generally Recognized As Safe - GRAS) americkou FDA, byly v pozdějších studiích prokázány toxické účinky (Benchaar a Greathead, 2011). Využití silic v praxi by pochopitelně bylo opodstatněné pouze v případě, že by jejich pozitivní vliv převýšil cenu pořízení. Tato cena úzce souvisí s velikostí účinné dávky. V publikovaných studiích se účinné dávky silic velmi liší, což je ovlivněno jejich složením (tzn. zastoupením jednotlivých účinných látek v silici). Proto je nutné ve studiích uvádět zdroj, extrakční metody, chemické složení, čistotu a dávku silice. Do současnosti byly účinky silic ověřovány především v krátkodobých *in vitro* studiích, pouze v několika studiích byl sledován dlouhodobější účinek silic na bachorovou fermentaci. Tyto práce naznačily určitou schopnost adaptace bachorových mikroorganismů na účinky silic (a dalších sekundárních metabolitů rostlin) (Cobellis et al., 2016).

1.8 Cíl a hypotézy práce

Na trhu s doplňkovými látkami krmiv je dnes dostupných několik směsí silic s uváděným pozitivním účinkem na bachorovou fermentaci a užitkovost zvířat, a to přesto, že pozitivní účinky silic na bachorovou fermentaci nebyly jednoznačně prokázány. Výrobci těchto směsí neuvádí přesné zastoupení účinných látek, pouze rozmezí zastoupení. To problematizuje ověření účinků a srovnání výsledků mezi jednotlivými studii.

Hlavními cíli předkládané studie proto bylo: 1) analytické stanovení množství účinných látek ve vybrané komerční směsi silic (KSS), 2) ověření *in vitro* účinků širokého rozmezí koncentrací KSS a určení nejnižších koncentrací, při kterých se projeví účinek na bachorovou fermentaci s využitím 24 hodinové vsádkové inkubace a 3) ověření účinku doporučené dávky (1,2 g/kus/den; dle výrobce) KSS na příjem krmiva, mléčnou užitkovost a parametry bachorové fermentace holštýnských dojnic ve střední fázi laktace.

Mezi hlavní kritéria příznivých účinků podání KSS na bachorovou fermentaci a užitkovost zvířat patří:

V *in vitro* podmínkách

- Snížení produkce metanu bez negativního vlivu na celkový rozsah fermentace, tzn. bez snížení zdánlivé stravitelnosti sušiny či celkové produkce TMK.
- Snížení relativního zastoupení metanu ve fermentačním plynu bez negativního vlivu na celkový rozsah fermentace.
- Zvýšení zdánlivé stravitelnosti sušiny či celkové produkce TMK.

- Zvýšení koncentrace kyseliny propionové na úkor kyseliny octové.
- Snížení koncentrace amoniakálního dusíku v inkubační tekutině.

U živých zvířat (*in vivo*)

- Zvýšení příjmu sušiny.
- Zvýšení produkce mléka.
- Zvýšení obsahu tuku v mléce.
- Zvýšení produkční účinnosti krmné dávky.
- Zvýšení koncentrace kyseliny propionové na úkor kyseliny octové a máselné. Kyselina propionová je u dojnic hlavním substrátem jaterní glukoneogeneze. Její relativní podíl na čisté produkci glukózy játry představuje asi 60–74 % z glukogenních substrátů (Aschenbach et al., 2010). Zvýšení produkce kyseliny propionové je velmi důležité především v období po porodu, kdy se dojnice musí vyrovnávat s několikanásobně zvýšenou potřebou energie. Nedostatečný přísun energie, především ve formě glukózy, v tomto období zvyšuje riziko nadměrného hubnutí a následného zvýšeného výskytu metabolických poruch (Hausmann et al., 2017).
- Snížení koncentrace amoniakálního dusíku v bachorové tekutině.

2 MATERIÁL A METODIKA

Všechny pokusy byly navrženy a provedeny v souladu s evropskými a českými právními normami. *In vivo* experiment byl proveden na experimentální farmě Výzkumného ústavu živočišné výroby, v. v. i, *in vitro* inkubace a většina analýz v laboratořích Výzkumného ústavu živočišné výroby, v. v. i. Analýza složení KSS byla provedena ve spolupráci s Katedrou kvality zemědělských produktů České zemědělské univerzity v Praze.

2.1 Složení těkavé frakce komerční směsi silic

Sto miligramů KSS bylo extrahováno v 10 ml hexanu (analytické čistoty) spolu s oktadekanem jako vnitřním standardem (koncentrace 0,1 mg/ml) na orbitální třepače (10 minut). Poté byl 1 ml extraktu filtrován přes membránový filtr do chromatografických vialek a okamžitě analyzován na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) a kolonou HP-5MS (30 m × 0,25 mm ID, 0,25 μm tloušťka filmu). Jeden μl vzorku byl nastříknut ve split módu 1:12, při teplotě injektoru 250 °C, teplotní program začínal na 60 °C, teplota byla zvyšována rychlostí 3 °C za minutu až do maximální teploty 231 °C, která byla poté držena po dobu 10 minut. Nosným plynem byl dusík (čistota 99,999 %; konstantní průtok 1 ml/minuta). Teplota detektoru byla 250 °C. Jednotlivé sloučeniny byly také identifikovány pomocí plynové chromatografie následované hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) s kolonou HP-5MS (30 m × 0,25 mm ID, 0,25 μm tloušťka filmu) spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent MSD5975C MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) o elektronové ionizační energii 70 eV. Analýzy byly provedeny v módu SCAN, hmotnostní rozsah byl 40–400 m/z. Byla použita stejná metoda jako u plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Identifikace jednotlivých složek byla založena na porovnání jejich hmotnostního spektra a relativních retenčních časů (RI) s daty z knihovny Národního institutu standardů a technologie (NIST, USA) a na porovnání s analytickými standardy (Adams, 2007).

2.2 *In vitro* experiment

Design experimentu

K ověření účinků KSS v závislosti na použité koncentraci a pro identifikaci nejnižší koncentrace, u které se projeví významný účinek na parametry bachorové fermentace, byla provedena 24 hodinová *in vitro* vsádková inkubace. Byly ověřovány koncentrace 0, 20, 100,

200, 600 a 1000 mg KSS/l inkubačního média. Pro každou koncentraci byl připraven zásobní roztok s etanolem, ve kterém bylo takové množství KSS, aby při dávce 200 µl zásobního roztoku bylo dosaženo požadované koncentrace KSS v médiu. Do kontrolních inkubací (0 mg/l) bylo přidáno 200 µl etanolu bez KSS. Kvůli nerozpustnosti některých částí KSS byly zásobní roztoky homogenizovány v parafínem zakryté zkumavce pomocí homogenizátoru TissueRuptor (Qiagen, Crawley, United Kingdom). Nejnižší použitá koncentrace při *in vitro* inkubaci (20 mg/l) zhruba odpovídala použité *in vivo* dávce 1,2 g/kus/den při předpokládaném minimálním objemu bachorového obsahu dospělé dojnice 60 l (Reynolds et al., 2004) a při zanedbání diluční rychlosti bachorového obsahu. Každá koncentrace KSS měla tři opakování v průběhu jedné inkubace a inkubace byly opakovány třikrát (run), každá samostatný den. Do každé inkubace byly zařazeny také tři lahve bez přidané KSS a bez substrátu (blanky).

Substrát a bachorová tekutina

Substrát použitý při *in vitro* inkubacích se skládal z kukuřičné siláže (30 % ze sušiny substrátu), vojtěškové siláže (30 %) a směsi koncentrovaných krmiv (40 %). Chemické složení substrátu a jednotlivých složek substrátu je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2. Chemické složení kukuřičné siláže, vojtěškové siláže, směsi koncentrovaných krmiv (koncentrátu) a substrátu (% ze sušiny; kromě sušiny: % z původní hmoty)

	Kukuřičná siláž	Vojtěšková siláž	Koncentrát	Substrát
Sušina	29,9	41,1	89,1	100,0
Hrubý protein	7,8	18,1	21,0	16,2
Tuk	3,9	1,6	7,1	4,5
Škrob	37,6	-	30,1	23,3
NDF	41,9	47,3	15,9	33,1
ADF	22,4	40,0	6,9	21,5
Popeloviny	4,2	10,5	10,1	8,5

NDF = neutrálně-detergentní vláknina; ADF = acidodetergentní vláknina

Čerstvý bachorový obsah byl odebírán přes bachorovou kanylu před ranním krmením od dvou holštýnských dojnic v laktaci. Dojnice byly krmeny *ad libitum* směsnou krmnou dávkou (TMR) předkládanou dvakrát denně, která se skládala z kukuřičné siláže (21,0 % ze sušiny), kukuřice CCM (corn cob mix; 20,5 %), vojtěškové siláže (20,0 %), pivovarského

mláta (9,7 %) a směsi koncentrovaných krmiv (28,8 %). Bachorový obsah od každé krávy byl odebrán do predehřáté a oxidem uhličitým (CO₂) propláchnuté termosky o objemu 500 ml tak, aby ve vrchní části termosky nezůstalo žádné volné místo a tím bylo zajištěno anaerobní prostředí. Takto naplněné termosky byly převezeny do laboratoře. Bachorová tekutina byla získána přecezením bachorového obsahu přes síto s velikostí ok 315 µm za neustálého proplachování CO₂. Pro přípravu inokula byla použita směs bachorových tekutin od obou dojnic v poměru 1:1 (V/V). Doba od odběru bachorového obsahu do inokulace nepřekročila 45 minut.

***In vitro* inkubace**

In vitro vsádková bachorová inkubace byla provedena podle metodiky Fievez et al. (2005). Substrát (250 mg; sušina 100 %) byl inkubován ve vzduchotěsných inkubačních lahvích o objemu 120 ml spolu s 25 ml pufrované bachorové tekutiny. Před inokulací byla bachorová tekutina smíchána v poměru 1:4 s fosfátovým pufrem. Pufř obsahoval v jednom litru destilované vody 28,8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 6,9 g NaH₂PO₄ · 2H₂O a 1,4 g NH₄Cl. Pufř byl propláchnut CO₂ a jeho pH bylo upraveno na 6,8 s 5 M NaOH. Inokulační směs bachorové tekutiny a pufřu byla před inokulací držena (10 minut) při teplotě 39 °C, míchána a proplachována CO₂. Vzorek inokulační směsi (0,8 ml) byl okyselen 20 µl 9 M H₂SO₄ a skladován při teplotě -18 °C až do provedení analýzy těkavých mastných kyselin (TMK). Zásobní roztoky s rozpuštěnou KSS byly do lahví přidány těsně před přidáním inokulační směsi. Nakonec bylo do každé lahve přidáno 25 ml inokulační směsi a vrchní část lahve (*headspace*) byla vypláchnuta CO₂. Lahve byly uzavřeny gumovou zátkou a hliníkovým uzávěrem. Inkubace probíhala 24 hodin při 39 °C v inkubátoru s třepačkou (SW 22; Julabo, Germany; 90 rpm).

Odběr a analýza vzorků

Po 24 hodinách byl změřen tlak nahromaděného plynu ve vrchní části lahve (*headspace*) pomocí manometru (Traceable, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Celková produkce plynu v každé lahvi byla vypočítána podle rovnice Mauricio et al. (1999):

$$G_p = \frac{V_h}{P_a} \times P_t$$

kde G_p je celková produkce plynu (ml), V_h je objem *headspace* lahve (ml), P_a je atmosferický tlak (hPa) a P_t je tlak v lahvi (*headspace*) zaznamenaný manometrem (hPa). Theodorou et al.

(1994) doporučují, aby tlak plynu, který se vytvoří v průběhu fermentace a nahromadí se ve vrchní části lahve, nepřesáhl 483 hPa, protože nad touto hranicí se zvyšuje rozptyl dat. Nicméně López et al. (2007) zjistili velice silný vztah ($r^2 = 0,993$) mezi celkovou produkcí plynu a tlakem plynu v *headspace* v rozsahu 0–1082 hPa. My jsme v tomto experimentu naměřili tlaky plynu v *headspace* inkubačních lahví v rozsahu 418–521 hPa (průměr \pm SD = 486 ± 3 hPa) a předpokládáme tedy, že z těchto tlaků bylo možné vypočítat celkovou produkci plynů, a také, že tyto tlaky neovlivňovaly fermentaci v lahvích takovým způsobem, aby změnila účinky jednotlivých koncentrací KSS na produkci metanu. Z vrchní části lahve byl odebrán vzorek plynu (5 ml) do zkumavky s destilovanou vodou metodou s vytlačněním vody (*water displacement*). Lahve byly poté umístěny do ledové tříště a tak schlazeny, tím byla zastavena fermentace. Po otevření lahví bylo změřeno pH fermentační tekutiny pomocí pH metru (pH 700, Eutech Instruments, Singapur). Z lahví byly odebrány vzorky fermentační tekutiny (0,8 ml; okyseleny 20 μ l 9 M H₂SO₄), které byly skladovány při -18 °C až do provedení analýzy těkavých mastných kyselin (TMK) a amoniakálního dusíku (NH₃-N). Koncentrace TMK byly stanovovány s využitím plynové chromatografie (GC 82F, Labio, Česká republika) s plamenově ionizačním detektorem, kapilární kolonou (15 m \times 0,53 mm ID \times 0,5 μ m) a vodíkem jako nosným plynem. Vzorek inkubační tekutiny byl odstředěn při 6625 \times g po dobu jedné minuty. Supernatant (64 μ l) byl smíchán s destilovanou vodou (736 μ l), interním standardem (30 μ l) a kyselinou mravenčí (100 μ l) a opět odstředěn (6625 \times g; 1 min.). Jeden μ l tekutiny byl vstříknut do injektoru (teplota 200 °C; vstupní tlak 50 kPa). Na začátku programu byla teplota v koloně 75 °C, poté za jednu minutu vzrostla o 5 °C na 80 °C, která byla udržována 80 s, dále teplota vzrůstala o 5 °C/min až do teploty 128 °C (držena 4 s) a poté rostla o 20 °C/min až na 160 °C (držena 180 s). Detekční teplota byla 200 °C. Koncentrace amoniakálního dusíku (NH₃-N) v bachorové tekutině byly stanovovány spektrofotometricky s využitím indofenolové metody (Weatherburn, 1967). Čistá produkce TMK byla vypočtena odečtením koncentrace TMK v neinkubovaném vzorku.

Zbýlý obsah každé lahve byl beze zbytku převeden do předvážené centrifugační zkumavky o objemu 50 ml a dvakrát odstředěn (507 \times g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn, precipitát byl sušen 48 hodin při 50 °C a poté zvážen. Zdánlivá stravitelnost sušiny byla stanovena jako rozdíl mezi hmotností sušiny inkubovaného substrátu a hmotností sušiny fermentačního zbytku upraveného odečtením hmotnosti fermentační sušiny blanku.

Koncentrace metanu ve fermentačním plynu byla stanovena s využitím plynového chromatografu (GC 82F, Labio, Czech Republic) vybaveného plamenově ionizačním detektorem, kapilární kolonou (15 m \times 0,53 mm ID \times 0,5 μ m) a vodíkem jako nosným

plynem. Vzorek plynu (200 µl) byl nastříknut pomocí 500µl vzduchotěsné injekční stříkačky se zámkem Pressure-Lok® (Vici Precision Sampling, Baton Rouge, LA, USA). Kalibrace a výpočty byly provedeny podle metodiky Lópeze a Newbolda (2007).

2.3 *In vivo* experiment

Do experimentu, který trval 105 dní, bylo zařazeno 30 (dvě prvotelky a 28 krav na druhé a vyšší laktaci, průměrná parita 3 ± 1) vysokoužitkových dojníc holštýnského skotu. Na začátku pokusu byly krávy ve střední fázi laktace ($102. \pm 30$ dní laktace), vážily v průměru 629 ± 67 kg a dojily v průměru 41 ± 7 kg na den. Krávy byly seřazeny podle parity, mléčné užitkovosti před začátkem pokusu a dne v laktaci a poté náhodně přiřazeny do jedné ze dvou skupin. První skupina, kontrolní (KON), byla krmena bazální krmnou dávkou (tabulka 3), pokusná skupina (KSS) byla krmena stejnou krmnou dávkou s přidavkem komerční směsi silic (1,2 g/kus/den). Kravám byla podávána směsná krmná dávka (TMR). Komerční směs silic (KSS) byla nejdříve zamíchána do koncentrované směsi a ta poté do TMR pokusné skupiny. Směsná krmná dávka byla do stáje zavážena dvakrát denně v 4:00 a v 16:00 h, krmivo bylo do žlabů doplňováno pětkrát denně. Krávy měly adlibitní přístup ke krmivu. Krávy byly ustájeny volně s neomezeným přístupem k vodě, byly dojeny dvakrát denně v 5:30 a v 16:30 h.

Odběr a analýza vzorků

Individuální příjem krmiva byl průběžně zaznamenáván pomocí automatických krmných žlabů s elektronickou identifikací krav, které byly umístěny na tenzometrických vahách (Insentec, B.V., Marknesse, Nizozemí). Každý žlab je vybaven přístupovou bránou, která může být programována tak, aby umožnila přístup pouze vybraným kravám, a dvěma infračervenými senzory, které zaznamenávají přítomnost krávy ve žlabu. Každá kráva v pokusu měla v uchu pasivní transpondér, který jí umožnil přístup do předem určených žlabů. Příjem sušiny byl počítán podle vzorce:

$$P_{sušina}(kg) = P_{TMR}(kg) \times S_{TMR}(kg/kg)$$

kde $P_{sušina}$ je příjem sušiny v kg, P_{TMR} je příjem směsné krmné dávky v kg a S_{TMR} je sušina směsné krmné dávky v kg na kg původní hmoty.

Tabulka 3. Složení (% ze sušiny) bazální krmné dávky

Krmivo		% ze sušiny
Objemná a tekutá krmiva	59,7	
Kukuřičná siláž		27,1
Vojtěšková siláž		16,1
LKS		8,2
Pivovarské mláto		7,4
Pšeničná sláma		2,3
Energie MG		1,7
Promel		1,7
Směs koncentrovaných krmiv	40,3	
Pšenice		10,5
Sójový extrahovaný šrot		6,1
Triticale		5,7
Řepkový extrahovaný šrot		5,6
Premin DO1		3,1
C16		2,2
Aminoplus		2,1
Uhličitan sodný		0,4

Vzorky krve a bachorové tekutiny byly odebírány 7., 37., 67. a 97. den experimentu od 16 krav (n = 8) čtyři hodiny po ranním krmení. Asi 6 ml krve bylo odebíráno z ocasní žíly do heparinizovaných zkumavek, vzorky byly ihned odstředěny při 797 × g (20 minut) a rozděleny do zkumavek o objemu 1 ml. Zkumavky byly poté skladovány při -18 °C až do provedení analýz na obsah neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) a kyseliny β-hydroxymáselné (BHB). Asi 100 ml bachorové tekutiny bylo s využitím podtlaku odebíráno pomocí jícnové sondy. Vzorky byly okamžitě umístěny na led a převezeny do laboratoře, kde byly skladovány při -18 °C až do provedení analýz. Analýzy koncentrací TMK a NH₃-N v bachorové tekutině byly provedeny stejnými metodami jako v pokusu *in vitro*.

Individuální produkce mléka byla zaznamenávána denně v průběhu celého pokusu. Vzorky mléka byly odebírány od všech krav ze dvou po sobě jdoucích dojení (ranního a odpoledního) 7., 21., 35., 49., 63., 77., 91. a 105. den pokusu. Ve vzorcích mléka bylo stanoveno zastoupení tuku, proteinu, laktózy a močoviny s využitím infračervené spektroskopie (Foss FT2, MilkoScan, Foss Electric, Hillerod, Denmark).

2.4 Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny s využitím programu Statistica 9.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Data z *in vitro* experimentu byla vyhodnocena analýzou rozptylu dvojného třídění (two-way ANOVA) se smíšeným modelem, kde koncentrace KSS byla pevným efektem a inkubační den (run) náhodným efektem. Pro srovnání všech použitých koncentrací s kontrolou (0 mg/l) byl použit Dunnettův test. K ověření lineární a kvadratické odpovědi na podání KSS byly spočítány polynomiální kontrasty.

V *in vivo* experimentu byl vliv KSS na vybrané ukazatele ověřován pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s opakovaným měřením. V modelu byl zahrnut vliv ošetření (KSS), času a jejich interakce. Všechny faktory byly považovány za pevné. Hladina významnosti byla určena na $P < 0,05$.

3 VÝSLEDKY

3.1 Složení komerční směsi silic

V KSS byla stanovena těkavá frakce, která dohromady tvořila 255,6 mg/g produktu. V této těkavé frakci bylo identifikováno 13 látek (tabulka 4). Mezi nejvíce zastoupené látky patřily účinné látky silic jako thymol (33,7 % těkavé frakce), *m*-kresol (20,2 %), eugenol (9,0 %), guajakol (8,1 %), benzyl ester kyseliny salicylové (7,6 %) a vanilin (6,6 %). Obsah žádné další látky v těkavé frakci nepřekročil 4 %.

Tabulka 4. Složení těkavé frakce komerční směsi silic

RI	Látka	KSS (mg/g ± SD)	Podíl těkavé frakce (%)
1031	a Limonen	4,10 ± 0,11	1,61
1082	b <i>m</i> -Kresol	51,50 ± 1,67	20,16
1090	a Guajakol	20,79 ± 0,43	8,13
1100	a Linalool	8,30 ± 0,15	3,25
1145	b Kafr	2,34 ± 0,08	0,92
1283	b Anetol	7,00 ± 0,36	2,74
1297	a Thymol	86,19 ± 2,93	33,72
1358	a Eugenol	22,98 ± 0,74	8,99
1395	a Vanilin	16,80 ± 0,59	6,57
1424	b β-Karyofylen	1,71 ± 0,05	0,67
1509	b Butylhydroxytoluen	9,92 ± 0,32	3,88
1529	b Kyselina salicylová, pentylester	4,39 ± 0,11	1,72
1857	b Kyselina salicylová, benzylester	19,52 ± 0,60	7,64
	Celkem	255,57	100,00

RI, retenční index; KSS, komerční směs silic; SD, směrodatná odchylka

^a Identifikace potvrzena pomocí standardu

^b Identifikace založena na Kovatsově retenčním indexu a hmotnostním spektru

3.2 *In vitro* experiment

S jedinou výjimkou pouze dvě nejvyšší koncentrace KSS (600 a 1000 mg/l) významně ovlivnily některý z parametrů *in vitro* bacherové fermentace (tabulka 5). Výjimkou byla koncentrace 100 mg/l, která snížila ($P < 0,05$) zdánlivou stravitelnost sušiny (aDMd). Koncentrace 600 mg/l byla nejnižší koncentrace KSS, která ve srovnání s kontrolou snížila produkci metanu (ml/g sušiny inkubovaného substrátu; DMi), relativní zastoupení metanu ve fermentačním plynu (% fermentačního plynu), celkovou produkci těkavých mastných kyselin (mmol/l), molární podíl kyseliny propionové a kyseliny izomáselné (% TMK). Naopak tato koncentrace zvýšila ($P < 0,05$) molární podíl kyseliny octové a valerové (% TMK). Nejnižší koncentrace KSS, která ve srovnání s kontrolou snížila ($P < 0,05$) celkovou produkci plynu (ml/g DMi), molární podíl kyseliny octové a kyseliny isovalerové (% TMK), koncentraci amoniakálního dusíku (mg/100 ml) a naopak zvýšila ($P < 0,05$) pH a podíl kyseliny octové ke kyselině propionové byla 1000 mg/l. Produkce metanu vyjádřená na zdánlivě strávenou sušinu (ml/g aDMD) ani produkce metanu vyjádřená na produkci TMK (mmol/mol) nebyly přidavkem KSS ovlivněny.

Přídavek KSS v koncentracích 0 až 1000 mg/l kvadraticky ($P < 0,001$) snížil celkovou produkci fermentačního plynu, produkci metanu, relativní zastoupení metanu ve fermentačním plynu, zdánlivou stravitelnost sušiny, produkci TMK, molární podíl kyseliny octové, propionové ($P = 0,011$), izomáselné, izovalerové a koncentraci amoniakálního dusíku. Naopak pH ($P = 0,013$), molární podíly kyseliny máselné ($P < 0,001$) a valerové ($P < 0,001$) byly kvadraticky zvýšeny.

Tabulka 5. Vliv rostoucích koncentrací komerční směsi silic (KSS) na parametry *in vitro* bachorové fermentace

Parametr	KSS (mg/l)						SEM	P	Kontrast	
	0	20	100	200	600	1000			L	K
pH	6,43	6,43	6,44	6,45	6,45	6,47*	0,004	0,008	0,003	0,013
CPP (ml/g DMi)	184,7	187,9	184,7	184,2	181,9	169,2*	1,40	<0,001	<0,001	<0,001
Metan (ml/g DMi)	27,28	27,69	26,73	26,59	25,72*	22,62*	0,268	<0,001	<0,001	<0,001
Metan (%)	14,79	14,75	14,50	14,46	14,16*	13,37*	0,111	<0,001	<0,001	<0,001
Metan (ml/g aDMD)	46,75	48,04	48,55	47,50	47,62	49,38	0,348	0,287	0,128	0,240
Metan/TMK (mmol/mol)	207,42	209,97	208,35	206,51	207,55	208,08	1,188	0,989	0,887	0,916
aDMD (g/g)	0,585	0,577	0,551*	0,561	0,540*	0,459*	0,006	<0,001	<0,001	<0,001
TMK (mmol)	54,64	54,73	53,27	53,48	51,46*	45,11*	0,510	<0,001	<0,001	<0,001
Kyselina octová (% TMK)	57,26	57,30	57,37	57,05	56,63	53,76*	0,216	<0,001	<0,001	<0,001
Kyselina propionová (% TMK)	22,28	22,24	22,09	22,16	21,57*	19,87*	0,288	<0,001	0,004	0,011
Kyselina isomáselná (% TMK)	1,48	1,51	1,51	1,48	1,28*	1,19*	0,026	<0,001	<0,001	<0,001
Kyselina máselná (% TMK)	13,11	13,05	13,08	13,34	14,53*	18,51*	0,314	<0,001	<0,001	<0,001
Kyselina isovalerová (% TMK)	2,96	2,97	3,00	2,99	2,89	2,81*	0,015	<0,001	<0,001	<0,001
Kyselina valerová (% TMK)	2,92	2,93	2,95	2,98	3,10*	3,84*	0,047	<0,001	<0,001	<0,001
O/P	2,59	2,60	2,62	2,59	2,65	2,75*	0,042	<0,001	0,213	0,434
NH ₃ -N (mg/100 ml)	43,09	43,96	43,82	43,19	41,22	38,76*	0,422	<0,001	<0,001	<0,001

KSS, komerční směs silic; SEM, střední chyba průměru; P, pravděpodobnost účinku KSS; L, lineární účinek KSS; K, kvadratický účinek KSS; CPP, celková produkce plynu DMi, sušina inkubovaného substrátu; aDMD, zdánlivě strávená sušina substrátu; TMK, těkavé mastné kyseliny; O/P, poměr kyseliny octové a propionové; NH₃-N, amoniakální dusík. * Statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou (0 mg/l; Dunnettův test; P < 0,05)

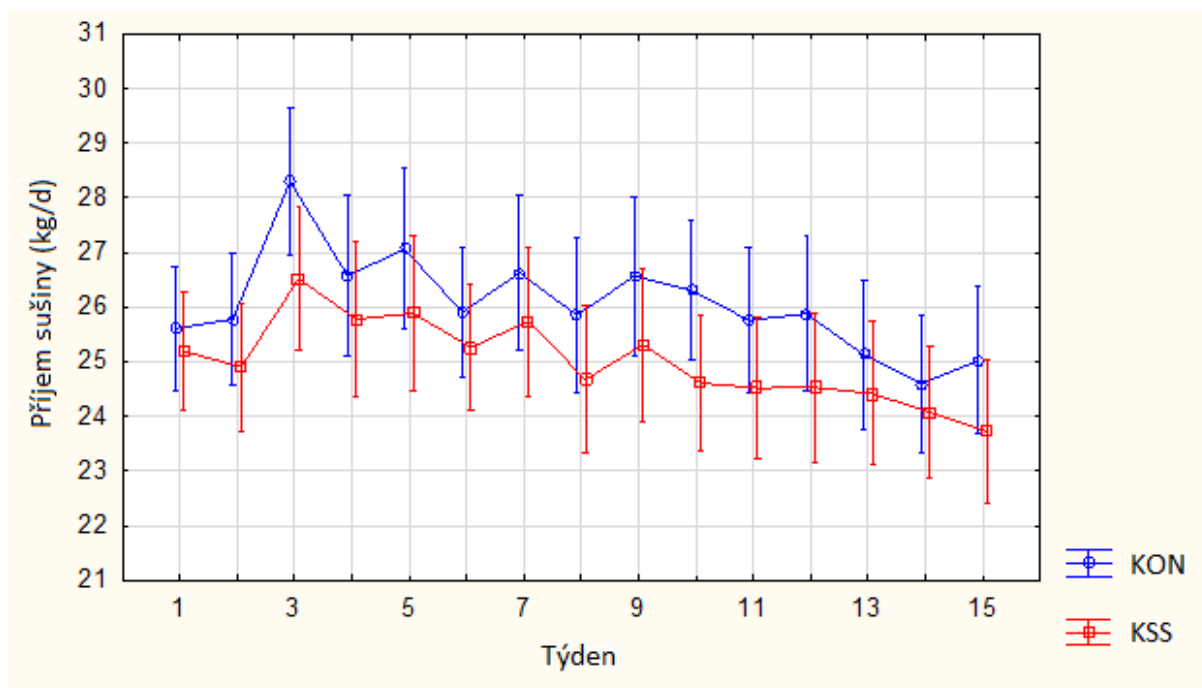
3.3 *In vivo* experiment

Vliv přidavku komerční směsi silic do krmné dávky dojníc na příjem krmiva a sušiny krmiva, mléčnou užitkovost, složení mléka, koncentrace indikátorů negativní energetické bilance v krvi, parametry bachorové fermentace a hmotnost dojníc jsou uvedeny v tabulce 6. Podání KSS nemělo statisticky významný vliv na příjem sušiny krmiva (Graf 1) ani na průměrnou denní produkci mléka (Graf 2), nicméně rozdíl produkcí mléka mezi pokusnou (KSS) a kontrolní skupinou byl značný, dojnice v pokusné skupině dojily méně v průměru o 3,6 kg mléka na den. Mléko skupiny KSS také obsahovalo méně (-0,52 %) tuku ve srovnání se skupinou KON, tento rozdíl byl na hranici statistické významnosti ($P = 0,05$). Rozdíly v zastoupení dalších složek mléka (bílkoviny, laktóza a močovina) nebyly mezi skupinami statisticky významné ($P > 0,05$). Produkční účinnost krmné dávky vyjádřená jako podíl produkce mléka za den v kg a příjem sušiny krmné dávky za den v kg se mezi skupinami nelišila ($P > 0,05$). Průměrné hladiny kyseliny β -hydroxymáselné, jednoho z indikátorů negativní energetické bilance, byly statisticky významně vyšší ve skupině KSS. Celková produkce těkavých mastných kyselin byla v pokusné skupině s KSS významně ($P = 0,001$) nižší ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině KSS bylo statisticky významně zvýšeno ($P = 0,005$) pH bachorové tekutiny. Zastoupení jednotlivých těkavých mastných kyselin, poměr kyseliny octové ke kyselině propionové ani koncentrace $\text{NH}_3\text{-N}$ se mezi skupinami významně nelišily. Statisticky významný rozdíl nebyl mezi skupinami ani v průměrné hmotnosti (Graf 3). Nicméně poměrně značný byl rozdíl, pokud se změna hmotnosti vyjádřila jako průměrný přírůstek na den, kdy pokusná skupina ve srovnání s kontrolní skupinou přibírala o 350 g denně více.

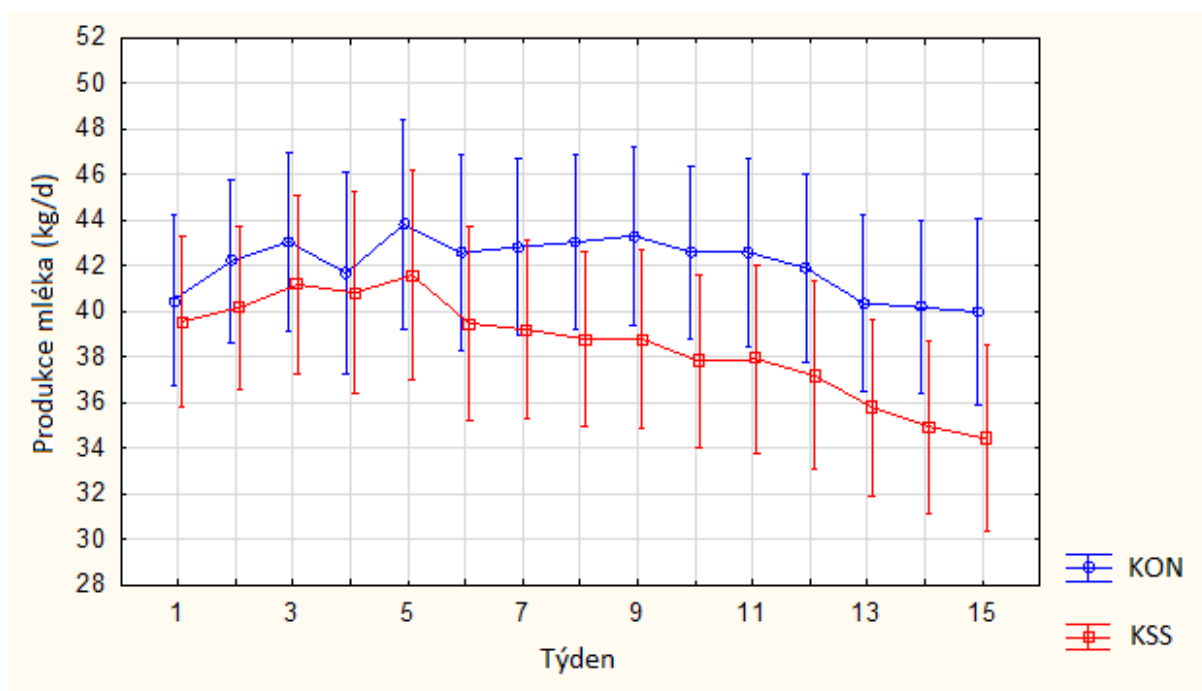
Tabulka 6. Vliv přidavku komerční směsi silic na příjem krmiva, parametry mléčné užitkovosti, hladiny vybraných krevních složek, parametry bachorové fermentace a hmotnost dojnic

Parametr	Skupina		SEM	P
	KON	KSS		
Příjem krmiva				
původní hmota (kg/den)	56,7	54,1	0,13	0,207
sušina (kg/den)	26,2	25,0	0,06	0,207
Mléko				
produkce (kg/d)	42,1	38,5	0,14	0,183
tuk (%)	4,21	3,69	0,06	0,050
bílkoviny (%)	3,19	3,23	0,02	0,769
laktóza (%)	4,96	4,92	0,01	0,512
močovina (mmol/l)	15,7	14,4	0,22	0,262
Produkční účinnost krmné dávky				
kg mléka/kg příjmu sušiny	1,64	1,56	0,01	0,175
Krev				
NEMK (mmol/l)	0,40	0,43	0,02	0,278
BHB (mmol/l)	0,33	0,39	0,01	0,031
Bachorová tekutina				
celkové TMK (mmol/l)	120,1	108,2	2,27	0,001
kyselina octová (%)	65,8	66,2	0,31	0,435
kyselina propionová (%)	19,1	18,9	0,20	0,725
kyselina máselná (%)	14,2	14,0	0,22	0,665
octová/propionová	3,49	3,54	0,05	0,661
NH ₃ -N (mg/100 ml)	12,2	11,9	0,14	0,273
pH	6,54	6,75	0,05	0,005
Hmotnost				
průměr	643	666	1,30	0,355
změna (kg/d)	0,23	0,58		

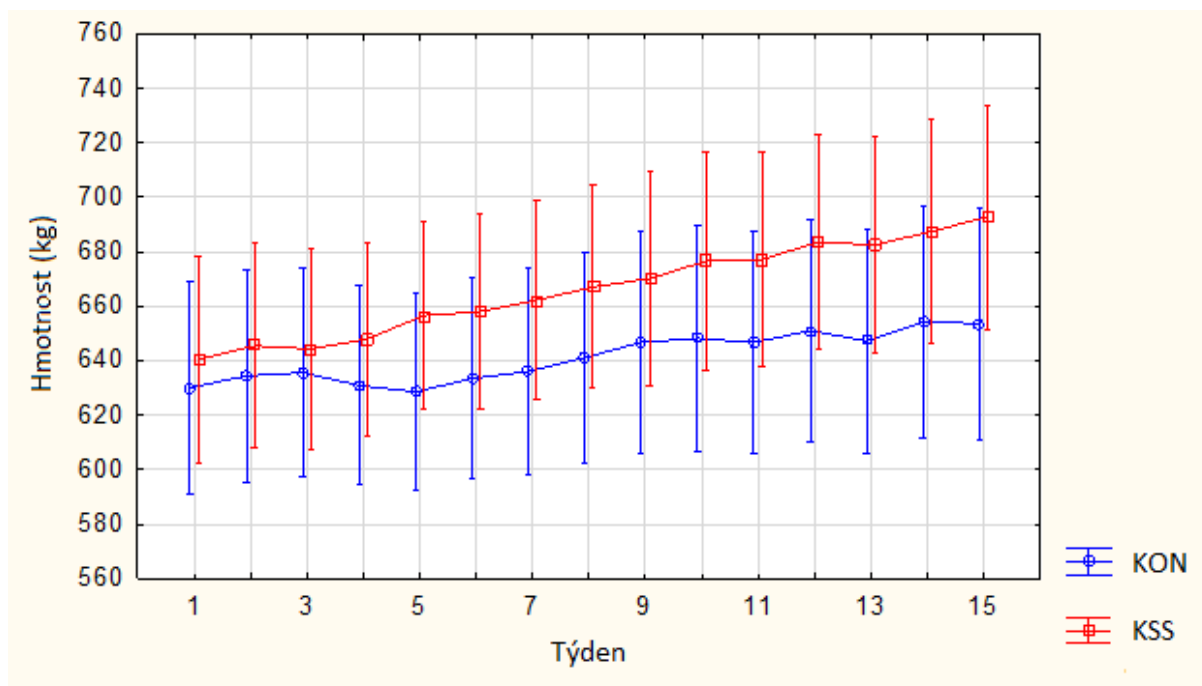
KON, kontrolní skupina; KSS, pokusná skupina s dávkou (1,2 g/kus/den) komerční směsi silic; SEM, střední chyba průměru; NEMK, neesterifikované mastné kyseliny; BHB, kyselina β-hydroxymáselná; TMK, těkavé mastné kyseliny; NH₃-N, amoniakální dusík



Graf 1. Týdenní průměry příjmu sušiny kontrolní (modře) a pokusné skupiny (červeně). KON, kontrola; KSS, komerční směs silic. Vertikální úsečky označují 95% intervaly spolehlivosti.



Graf 2. Týdenní průměry produkce mléka kontrolní (modře) a pokusné skupiny (červeně). KON, kontrola; KSS, komerční směs silic. Vertikální úsečky označují 95% intervaly spolehlivosti.



Graf 3. Průměrná hmotnost dojnic v kontrolní (modře) a pokusné skupině (červeně). KON, kontrola; KSS, komerční směs silic. Vertikální úsečky označují 95% intervaly spolehlivosti.

4 DISKUZE

Využití fyto­genních látek ve výživě zvířat získalo v posledních letech značnou pozornost (Flachowsky a Lebzien, 2012). U přežvýkavců jsou jako manipulátory bachorové fermentace nejčastěji ověřovány třísloviny, saponiny a silice (Patra a Saxena, 2010). Výhodou silic je, že jsou poměrně běžně využívány v potravinářství či kosmetickém a farmaceutickém průmyslu a jsou obecně považovány za bezpečné (Baser a Buchbauer, 2015). Některé studie potvrdily schopnost silic pozitivně ovlivnit bachorovou fermentaci, a to snížením bachorového obratu dusíku (Patra a Yu, 2014), zpomalením rozkladu škrobu (Hart et al., 2008) nebo inhibicí metanogeneze (Patra a Yu, 2012). Nicméně většina pozitivních výsledků byla prokázána v *in vitro* studiích a i v nich nejsou výsledky konzistentní. Podání silic je často doprovázeno snížením stravitelnosti vlákniny nebo snížením produkce TMK. Tyto negativní vlivy mohou být způsobeny poměrně širokým a nespecifickým antimikrobiálním účinkem silic v bachoru (Cobellis et al., 2016). Přesto, že účinnost silic není jednoznačně potvrzena, na trhu se objevují doplňkové látky na bázi silic s deklarovaným příznivým účinkem na bachorovou fermentaci a trávení. Několik těchto produktů, směsí účinných látek silic, bylo testováno a to s poměrně nejednoznačnými výsledky v *in vitro* (Castillejos et al., 2007) a *in vivo* (Tassoul a Shaver, 2009) studiích. Rozdíly mezi výsledky studií mohou být dány rozdíly v zastoupení jednotlivých účinných látek silic (Cobellis et al., 2016). Bohužel v drtivé většině studií, které ověřovaly komerční směsi silic a jejich účinky na bachorovou fermentaci, nebyly účinné látky analyticky identifikovány a kvantifikovány. Většinou autoři produkt popisují jako směs přírodních a přírodně identických silic a vyjmenují hlavní účinné látky (např. Benchaar et al., 2006). Přičemž jak namítají Flachowsky a Lebzien (2012) popsat testované látky pouze jako „směs přírodních a přírodně identických silic“ není z vědeckého pohledu přijatelné.

Těkává frakce, v níž byly zastoupeny převážně účinné látky silic, představovala u ověřované KSS přibližně 25,6 % hmotnosti produktu. Podobné zastoupení těkávé frakce je deklarováno u produktů CRINA® Ruminants (DSM, Švýcarsko) a AGOLIN® Ruminant (AGOLIN SA, Švýcarsko). U dalšího na trhu dostupného produktu, XTRACT® 6965 (Pancosma SA, Švýcarsko), je deklarované zastoupení silic vyšší, a to 45 %. V KSS byly nejvíce zastoupené tyto účinné látky silic: thymol, *m*-kresol, eugenol, guajakol, kyselina salicylová a vanilin (tabulka 4).

Thymol je monoterpenový fenol, derivát cymenu. Přírodním zdrojem thymolu jsou zavinutky (*Monarda fistulosa*, *Monarda didyma*). Velké množství thymolu se nachází v silici dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) (Castillejos et al., 2007) a tymiánu obecného

(*Thymus vulgaris*), v této silici podíl thymolu dosahuje až 70 %. Thymol patří mezi nejlépe prozkoumané účinné látky silic. Byla u něj prokázána silná antimikrobiální aktivita proti širokému spektru gram-pozitivních i gram-negativních bakterií (Burt, 2004). Látky s fenolickou strukturou, jako je thymol, mají vyšší antimikrobiální aktivitu než sekundární metabolity bez této struktury. Navíc malá molekulová hmotnost umožňuje thymolu pronikat do buněčné membrány přes póry v buněčné stěně (Calsamiglia et al., 2007; Dorman a Deans, 2000). Castillejos et al. (2006) zjistili, že nízké koncentrace thymolu (50 mg/l) nemají vliv na *in vitro* bacherovou fermentaci, ale vyšší koncentrace (≥ 500 mg/l) snižují produkci TMK a poměr kyseliny octové ke kyselině propionové. Tito autoři proto předpokládají, že optimální koncentrace thymolu pro ovlivnění bacherové fermentace je v rozmezí 50 až 500 mg/l. Na druhou stranu poměrně silné a široké spektrum aktivity thymolu proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím, úzké rozmezí mezi optimální a toxickou dávkou a další účinky, které nejsou vždy v požadovaném směru (Castillejos et al., 2006) naznačují, že antimikrobiální aktivita thymolu je příliš silná a nespecifická pro ovlivnění tak komplexního mikrobiálního prostředí, které se nachází v bacheru (Calsamiglia et al., 2007).

Kresoly jsou přírodní nebo syntetické methylfenoly, vyskytují se ve třech izomerních formách *o*-kresol, *m*-kresol a *p*-kresol. Kresoly jsou v přírodě široce rozšířeny, mimo jiné se nacházejí v rostlinných silicích, jako je silice máty peprné či eukalyptové silici, *m*-kresol je významná složka tabákového kouře. Kresoly jsou důležité chemické suroviny, např. isopropylací *m*-kresolu vzniká thymol. Původně byly získávány z uhelného dehtu. Dnes jsou vyráběny také synteticky (asi 60 %) (Fiege, 2000). Mnoho z těchto látek se využívá jako biocidy či konzervanty v kosmetickém průmyslu. *m*-Kresol se využívá jako látka zvyrazňující vůni, konzervant a také jako lokální antiseptická látka dutiny ústní. *m*-Kresol je biomarker expozici fenolu a toluenu, prokázal také některé antimikrobiální účinky, inhibuje růst *Escherichia coli* a vykazuje také antifungální aktivitu (Andersen, 2006). Účinky kresolů na bacherovou fermentaci dosud nebyly ověřovány.

Eugenol patří mezi fenylpropanoidy, je hlavní složkou hřebíčkové (až 85 %) a skořicové silice (Davidson a Naidu, 2000). Eugenol má inhibiční vliv na gram-pozitivní i na gram-negativní bakterie (Dorman a Deans, 2000). Eugenol může vázat některé proteiny, a tím inaktivovat enzymy či narušovat a rozkládat buňky (Calsamiglia et al. 2007; Benchaar and Greathead, 2011). Castillejos et al. (2006) uvádějí, že koncentrace eugenolu 500 mg/l mění zastoupení jednotlivých TMK, snižuje zastoupení kyseliny propionové, bez ovlivnění celkové produkce TMK při *in vitro* inkubaci. Podobné výsledky potvrzují také Joch et al. (2016) při koncentraci eugenolu 1067 mg/l. Vyšší koncentrace (300, 3000 a 5000 mg/l) také mohou

významně snížit produkci amoniaku, zatímco nízké koncentrace mají tendenci tuto produkci zvyšovat (Cardozo et al., 2005). Pokud byl čistý eugenol podáván živým zvířatům v koncentraci 50 mg/kg sušiny krmné dávky, při příjmu okolo 20 kg sušiny/dojnici/den, to znamená dávku asi 1000 mg/dojnici/den, neměl prokazatelný vliv na příjem sušiny, bacherovou fermentaci, efektivitu trávení, zastoupení bakterií a protozoí ani na mléčnou užitkovost (Benchaar et al., 2012). Uvedené *in vitro* i *in vivo* výsledky naznačují, že eugenol nemá na bacherovou fermentaci významně pozitivní účinky, a proto jeho potenciál využití jako doplňkové látky v krmivech přežvýkavců je nízký. Z tohoto pohledu je překvapivé, že právě eugenol je účinnou látkou silic, která je obsažena v nejvýznamnějších na trhu dostupných směsích silic určených pro přežvýkavce.

Guajakol je složkou silic z máty peprné (*Mentha piperita*), celeru (*Apium graveolens*), břízy (*Betula alba*), jalovce (*Juniperus communis*) a jiných. V medicíně se guajakol využívá pro uvolnění a odstranění hlenu z dýchací soustavy, tzn. jako expektorans (Magyar et al., 2004). Podle Castillejos et al. (2006) většina koncentrací guajakolu (5, 50, 5000 mg/l) měla inhibiční vliv na *in vitro* bacherovou fermentaci, tyto koncentrace snižovaly především produkci těkavých mastných kyselin. Výjimkou byla koncentrace 500 mg/l, která snížila zastoupení kyseliny octové (-2,5 %) a amoniakálního dusíku (NH₃-N), bez omezení produkce TMK. Autoři nemají jasné vysvětlení proč nižší koncentrace (5 a 50 mg/l) inhibovaly produkci TMK, zatímco vyšší (500 mg/l) ne. Doposud nejsou ve vědecké literatuře žádné další zprávy o účincích guajakolu na bacherovou fermentaci.

Kyselina salicylová, neboli kyselina 2-hydroxybenzoová, je v rostlinné říši široce rozšířena především ve formě esterů. Estery salicylátů se vyskytují v několika rostlinných rodech, mezi ty hlavní patří rody vrba (*Salix*), tavolník (*Spiraea*) a libavka (*Gaultheria*). Významná množství methylesteru kyseliny salicylové se nacházejí v březové kůře. Kyselina salicylová se využívá hlavně k syntéze kyseliny acetylsalicylové, která slouží k léčbě bolesti, horečky a zánětu, a patří mezi nejrozšířenější léky vůbec. Samotná kyselina salicylová se využívá k léčbě revmatických poruch. U kyseliny salicylové byly prokázány také bakteriostatické vlastnosti, a proto je využívána jako desinfekční prostředek a konzervant (Boullard et al., 2000). Jung a Fahey (1983) ověřovali vliv tří koncentrací (167, 833 a 1499 mg/l) kyseliny salicylové na *in vitro* bacherovou fermentaci. Se zvyšující se koncentrací kyselina salicylová lineárně snižovala stravitelnost celulózy. Naopak nejvyšší použitá koncentrace mírně zvýšila stravitelnost škrobu.

Vanilin je hlavní těkavou složkou silice v tobolkách různých druhů orchidejí rodu vanilovník (*Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona*, nebo *Vanilla tahitensis*), tedy koření zvaném

vanilka. Je hlavní složkou přirozené vanilkové příchutě. Proto má vanilin značný komerční význam, především jako ochucovadlo v potravinářském průmyslu a vonná látka v kosmetickém průmyslu. Je to aromatická látka s největší celosvětovou produkcí (Fache et al., 2016; Davidson a Naidu, 2000). Vanilin prokázal silné antimikrobiální účinky proti bakteriím, kvasinkám i plísním. Nejsilnější inhibiční účinky vanilinu byly prokázány proti gram-pozitivním bakteriím a plísním (Davidson a Naidu, 2000). Antimikrobiální aktivita vanilinu je spojována s narušením membrány mikroorganismů. Jak prokázali Castillejos et al. (2006), 500 mg/l byla nejnižší koncentrace vanilinu, která měnila některý z parametrů bachorové fermentace *in vitro*. Nicméně tato koncentrace pouze mírně snížila zastoupení kyseliny octové (-2 %) bez ovlivnění celkové produkce těkavých mastných kyselin. Patra a Yu (2014) ověřovali účinky poměrně vysokých koncentrací (760 a 1520 mg/l) vanilinu na *in vitro* bachorovou mikrobiální fermentaci. Vanilin se zvyšující se koncentrací snižoval zastoupení protozoí a naopak zvyšoval zastoupení některých bakteriálních druhů, např. *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella bryantii*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Clostridium aminophilum* a *Ruminobacter amylophilus*. Rostoucí koncentrace lineárně snižovaly produkci metanu i produkci amoniaku, nicméně stravitelnost sušiny a NDF substrátu byly také sníženy (Patra a Yu, 2014). Z tohoto pohledu se zdá, že dosud prokázané účinky vanilinu na bachorovou fermentaci nemají zásadní význam pro zlepšení efektivity využití krmné dávky u přežvýkavců.

Na trhu je dnes dostupných několik komerčních směsí silic, které jsou určeny pro přežvýkavce a jejichž cílem je zvýšit účinnost bachorové fermentace a zvýšit produkci těchto hospodářských zvířat. Ve studiích *in vitro* a *in vivo* byly nejčastěji testovány tři směsi švýcarských výrobců, jedná se o CRINA® Ruminants, AGOLIN® Ruminant a XTRACT® 6965. CRINA® Ruminants (DSM, Švýcarsko) je patentovaná směs přírodních a přírodně identických účinných látek silic. Deklarovaný podíl silic ve výrobku se pohybuje v rozmezí 20–30 %. Zastoupení jednotlivých účinných látek silic je následující: thymol 25–33 %, limonen 20–35 %, vanilin 10–20 %, guajakol 10–15 %, eugenol 5–10 % a aldehyd kyseliny salicylové 5–10 %. AGOLIN® Ruminant (AGOLIN SA, Švýcarsko) je komerčně vyráběná směs silic obsahující 200 g účinných látek v 1000 g konečného produktu. Hlavní účinné látky jsou geranyl acetát, eugenol a silice koriandru. Doporučené dávkování je 1 g výrobku na dojnici a den. XTRACT® 6965 (Pancosma SA, Švýcarsko) je komerčně vyráběná směs silic obsahující dvě hlavní účinné látky, eugenol (280 g/kg produktu) a cinnamaldehyd (170 g/kg). Účinné látky jsou enkapsulovány v hydrogenované olejové matrici.

V *in vitro* experimentu KSS v koncentraci 100 mg/l snížila ($P < 0,05$) zdánlivou stravitelnost sušiny, nicméně toto snížení bylo poměrně malé a nebylo doprovázeno dalšími účinky na fermentaci. Všechny další změny bachorové fermentace se projeví až při dvou nejvyšších koncentracích KSS, 600 a 1000 mg/l. Při obsahu silic okolo 25 % to znamená koncentraci účinných látek silic okolo 150 a 250 mg/l. To je podobné rozmezí, ve kterém byla prokázána účinnost thymolu (v KSS nejvíce zastoupená účinná látka silic) na bachorovou fermentaci. Při koncentraci KSS 600 mg/l byla snížena produkce metanu, nicméně toto snížení bylo doprovázeno snížením stravitelnosti sušiny a snížením celkové produkce TMK, tedy omezením rozsahu fermentace. Vyšší koncentrace také měnily zastoupení jednotlivých TMK, ale tyto změny by pro hostitelské zvíře nebyly příznivé. Bylo snižováno zastoupení kyseliny propionové a u nejvyšší koncentrace také kyseliny octové. Naopak byl zaznamenán výrazný nárůst koncentrace kyseliny máselné. Zvýšení molárního podílu kyseliny máselné patří mezi nejčastěji prokazované účinky silic nebo účinných látek silic, a to zejména po podání vyšších koncentrací (Busquet et al., 2005; Castillejos et al., 2006). Jedním z hlavních producentů kyseliny máselné v bachoru je bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens* (Stewart et al., 1997), nicméně tato bakterie je velmi citlivá k účinkům silic (McIntosh et al., 2003). Je tedy možné, že nárůst molárního podílu kyseliny máselné po ošetření silicemi je způsoben jinou dosud neodhalenou bakterií, která produkuje kyselinu máselnou ve zvýšené míře. Další možností je, že silice, nebo některý z fermentačních produktů jako např. vodík, mohou inhibovat hlavní bakterie, které využívají kyselinu máselnou jako substrát (Patra a Yu, 2012). Přídavek KSS snižoval hladiny amoniaku v inkubační tekutině až při nejvyšší koncentraci, to naznačuje, že produkce amoniaku byla snížena spíše celkovou inhibicí fermentace než selektivním účinkem KSS na bakterie produkující významná množství dusíku. V předchozích studiích byly ověřovány především nižší koncentrace komerčních směsí silic. Pirondini et al. (2015) s využitím 24 *in vitro* bachorové inkubace zjistili, že CRINA® Ruminants ani AGOLIN® Ruminant při koncentraci 16,7 mg/l neovlivňují produkci metanu. Nicméně CRINA® Ruminants významně snižovala produkci TMK. Naopak Durmic et al. (2014) uvádějí, že CRINA® Ruminants ani AGOLIN® Ruminant při koncentraci 1 mg/l neovlivňují celkovou produkci TMK, ale CRINA® Ruminants při *in vitro* dávkové inkubaci snižuje produkci metanu. Vliv směsi CRINA® Ruminants na bachorovou fermentaci s využitím kontinuálních fermentorů sledovali Castillejos et al. (2007) a zjistili, že koncentrace 5 mg/l zvyšovala produkci TMK a zastoupení kyseliny octové. Koncentrace 50 a 500 mg/l neměly na bachorovou fermentaci žádný prokazatelný vliv (Castillejos et al., 2007). Rozdíly ve výsledcích v jednotlivých studiích i při ověřování stejné komerční směsi silic a při stejných či

podobných koncentracích mohou být způsobeny, mimo jiné, rozdílným zastoupením jednotlivých účinných látek silic, protože silice jsou látky těkavé a tedy málo stabilní (Cobellis et al., 2016). Vystavení těchto látek, např. v průběhu skladování či přípravy krmných dávek, světlu, kyslíku či vysokým teplotám může urychlit přeměnu a degradaci účinných látek v produktu, tím snížit jejich kvalitu a změnit antimikrobiální aktivitu (Turek a Stintzing, 2013). Bohužel v žádné z těchto citovaných studií autoři nestanovovali zastoupení silic v komerčním produktu a proto je přímé srovnání problematické.

Od roku 2008, tzn. za posledních deset let, bylo provedeno více než 15 studií, ve kterých autoři ověřovali účinky komerčních směsí silic na živých přežvýkavcích, většinou na masném a dojném skotu. V provedených studiích se dávky komerčních směsí silic pohybovaly v rozmezí 0,2 až 10 g/kus/den, nejčastěji okolo 1 g/kus/den. V naší studii dávka 1,2 g KSS/kus/den neměla statisticky významný vliv na příjem sušiny, nicméně rozdíl mezi skupinami byl poměrně výrazný, kdy pokusná skupina s KSS přijímala průměrně o 1,2 kg sušiny/den méně ve srovnání s kontrolní skupinou (Graf 1). Možným vysvětlením nižšího příjmu může být snížení chutnosti krmné dávky po přidavku směsi silic. Přirozenou funkcí silic v rostlinách je odradit býložravce spásat tyto rostliny (Calabrò, 2015), je tedy pravděpodobné, že podobným mechanismem mohou ovlivnit také příjem TMR, zvláště v případech, kdy jsou podávány ve vysokých dávkách. Nicméně v předkládané studii nebyla prováděna žádná měření, která by posoudila rozdíly v chutnosti pokusné a kontrolní krmné dávky. Je však možné říci, že, posouzeno lidskými čichem, pach krmné dávky s KSS byl výraznější a méně přirozený. Obecně způsob, jakým zvířata smyslově vnímají a hodnotí předkládané krmivo, je málo prozkoumán, přestože to, jak především hospodářská zvířata přijímají krmiva, má značný ekonomický význam. Některé studie naznačují, že v tom, jak jednotlivá zvířata stejného druhu posuzují krmiva, jsou značné rozdíly (Ginane et al., 2011). Velká variabilita v rozsahu příjmu sušiny krmiva mohla být v předkládané studii důvodem, proč byl rozdíl mezi pokusnou a kontrolní skupinou vyhodnocen jako nevýznamný. Nevýznamný vliv na příjem sušiny potvrzují také další studie s holštýnskými dojnici, ve kterých byly podávány směsi silic (CRINA® Ruminants, AGOLIN®) v dávkách okolo 1 g/kus/den (Drong et al., 2016; Vendramini et al., 2016). Tassoul a Shaver (2009) uvádějí, že dávka 1,2 g/kus/den přípravku CRINA® Ruminants snižovala příjem sušiny, naopak Kung et al. (2008) zjistili při podání stejného přídatku při stejné dávce vliv přesně opačný, příjem sušiny byl zvýšen. Přestože byla průměrná denní produkce mléka ve skupině s KSS výrazně nižší (tabulka 6; graf 2), rozdíl nebyl statisticky významný. Nevýznamný vliv podání směsi silic na produkci mléka u dojnic potvrzují také další autoři (Tassoul a Shaver 2009; Drong et

al., 2016; Vendramini et al., 2016). V pokusně skupině byl snížen obsah tuku v mléce (tabulka 6). Nižší produkce mléka spolu s nižším zastoupením tuku v mléce by měla významný negativní vliv na ekonomiku chovu a to i v případě, že bychom zanedbali zvýšení nákladů pořízení KSS. V bachorové tekutině pokusné skupiny byla významně snížena koncentrace TMK. To může být vysvětleno nižším příjmem sušiny pokusné skupiny. Naopak nižší produkce TMK může vysvětlit nižší zastoupení tuku v mléce, protože kyselina octová, TMK s nejvyšším zastoupením v bachoru, je hlavním substrátem *de novo* syntézy mastných kyselin v mléčné žláze (NRC, 2001). Těkavé mastné kyseliny jsou koncovým produktem mikrobiální fermentace v bachoru a hlavním zdrojem energie přežvýkavců (Van Soest, 1982). U skotu TMK pokrývají více než 70 % celkové potřeby energie (Bergman, 1990). Z tohoto pohledu je snížení produkce TMK v bachoru pro hostitelské zvíře nevýhodné. Se sníženou produkcí TMK v bachoru korespondovalo také statisticky významně vyšší bachorové pH. V průběhu pokusu byly obě skupiny krav v pozitivní energetické bilanci, jak vyplývá z nízkých hladin NEMK a BHB a také z přírůstků hmotnosti obou skupin. Na začátku pokusného období byly dojnice v průměru na 102. dni laktace, takže pozitivní energetická bilance byla předpokládána. Skupina dojnic s KSS přibírala rychleji v porovnání s kontrolní skupinou, přestože příjem sušiny ve skupině KSS byl nižší. Vysvětlení pro tento rozdíl není jasné, nicméně intenzivnější přírůstek hmotnosti po podání směsi silic (CRINA® Ruminants) zjistili také Benchaar et al. (2006).

Simultánní ověřování *in vitro* a *in vivo* účinků bachorových manipulátorů je poměrně vzácné, přestože přímé srovnání umožňuje lepší interpretaci výsledků a zvyšuje robustnost odhadu skutečných účinků. Současné provedení *in vitro* a *in vivo* pokusů může také přispět k rozvoji *in vitro* metod prověřením jejich výsledků na živých zvířatech. *In vitro* inkubační metody jsou levnější a méně pracné. Tyto techniky umožňují provedení i poměrně rozsáhlých screeningových studií s velkým množstvím krmiv a potenciálních doplňkových látek. V předkládané studii provedení *in vitro* experimentu umožnilo prověřit účinky širokého rozpětí koncentrací KSS (0 až 1000 mg/l). Nevýhody *in vitro* technik vycházejí z jejich podstaty, kdy je komplexní proces trávení krmiva zvířetem redukován na pouhou část tohoto procesu. Bachorové *in vitro* inkubační metody simulují pouze bachorovou fermentaci krmiva, a ne produkci látek či stravitelnost u celého zvířete (Storm et al., 2012). Proto automatická extrapolace *in vitro* výsledků na *in vivo* podmínky může být zavádějící (Patra a Yu, 2015) a to hned z několika důvodů. Vsádkové *in vitro* inkubace jsou obvykle využívány ke krátkodobým experimentům (obvykle 24 h), které nedovolují ověřit dlouhodobou adaptaci bachorového mikrobiomu na testované látky. Kromě toho vsádkové *in vitro* metody nezohledňují takové

pro bachor přirozené procesy jako je kontinuální vstřebávání TMK, neutralizaci slinami a diluční rychlost bachorového obsahu (Soto et al., 2012). Dalším velmi důležitým faktorem, který může ovlivnit výsledky *in vitro* inkubací a tedy i jejich vypovídací hodnotu, je použité bachorové inokulum. Nejčastěji se využívá filtrovaná bachorová tekutina (Cobellis et al., 2016), ta ovšem nemusí plně reprezentovat složení bachorového bakteriálního společenství. Bachorové bakterie mohou být podle výskytu v rámci bachoru rozděleny do čtyř hlavních subpopulací: 1) bakterie, které se vyskytují volně v bachorové tekutině; 2) bakterie přichycené na částech krmiva (tvoří až 75 % bakteriální populace; 3) bakterie přichycené na bachorovém epitelu a 4) bakterie přichycené na povrchu eukaryot (protozoí či hub) (McAllister et al., 1994; Zhou et al., 2015). Pokud je tedy pro inkubace použita filtrovaná bachorová tekutina, mohou být změněny poměry jednotlivých subpopulací ve prospěch především první skupiny (bakterie v tekutině). Výše uvedená omezení často, především u inhibitorů produkce metanu, znamenají přecenění inhibičních účinků v podmínkách *in vitro* (Yáñez-Ruiz et al., 2016). To, zdá se, neplatí pro *in vitro* a *in vivo* výsledky této studie. U živých zvířat dávka 1,2 g/kus/den, dávka která po přepočtu odpovídá maximálně 20 mg/l v *in vitro* podmínkách, snížila celkovou produkci TMK a také pH, zatímco podobné účinky v *in vitro* experimentu měly koncentrace 600 mg/l, tzn. koncentrace 30krát vyšší. To naznačuje, že účinky KSS při dávce 1,2 g/kus/den na bachorovou fermentaci nejsou spojeny s přímým ovlivněním bachorové mikrobiální populace. Spíše se zdá, že KSS ovlivňuje bachorovou fermentaci zprostředkovaně, tím že u některých dojníc může snížit příjem krmiva a tím také dostupnost substrátů pro bachorový mikrobiom.

5 ZÁVĚR

Ve studii ověřovaná komerční směs silic (KSS) v *in vitro* podmínkách ani na živých zvířatech neprokázala pozitivní účinky na bachorovou fermentaci a užitkovost. Komerční směs silic obsahovala 25,6 % účinných látek (silice + další těkavé látky). Nižší koncentrace KSS (20–200 mg/l) neměly prokazatelný vliv na *in vitro* inkubace, zatímco vysoké koncentrace (600 a 1000 mg/l) snižovaly produkci metanu i amoniakálního dusíku snížením rozsahu fermentace. Dávka 1,2 g KSS/kus/den u dojnic ve střední fázi laktace prokazatelně snížila obsah tuku v mléce a zastoupení těkavých mastných kyselin v bachorové tekutině. Výsledky naznačují, že účinky KSS u živých zvířat mohou být dány jiným mechanismem, než přímým působením na bachorové mikroorganismy, např. změnou chutnosti krmné dávky. Podání testované KSS dojnícím v dávce 1,2 g kus/den by mělo nepříznivý vliv na ekonomiku chovu.

6 LITERATURA

- Adams, R. P., 2007: *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edn. Allured Publishing Corp, USA.
- Andersen, A., 2006: Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*, **25**, 29–127.
- Aschenbach, J. R.; Kristensen, N. B.; Donkin, S. S.; Hammon, H. M.; Penner, G. B., 2010: Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB life*, **62**, 869–877.
- Atasoglu, C.; Wallace, R. J., 2003: Metabolism and de novo synthesis of amino acids by rumen microbes. In: D'Mello, J. P. F. (ed.), *Amino Acids in Animal Nutrition*, 2nd edn. CABI Publishing, UK, pp. 265–290.
- Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M. D., 2005: Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, **88**, E9–21.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M., 2008: Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- Baser, K. H. C.; Buchbauer, G., 2015: Introduction. In: Baser, K. H. C. & G. Buchbauer (eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, 2nd edn. CRC Press, USA, pp. 1–4.
- Benchaar, C.; Petit, H. V.; Berthiaume, R.; Whyte, T. D.; Chouinard, P. Y., 2006: Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **89**, 4352–4364.
- Benchaar, C.; Chaves, A. V.; Fraser, G. R.; Beauchemin, K. A.; McAllister, T. A., 2007: Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Canadian Journal of Animal Science*, **87**, 413–419.
- Benchaar, C.; Calsamiglia, S.; Chaves, A. V.; Fraser, G. R.; Colombatto, D.; McAllister, T. A.; Beauchemin, K. A., 2008: A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, **145**, 209–228.
- Benchaar, C.; Greathead, H., 2011: Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, **166–167**, 338–355.

- Benchaar, C.; Lettat, A.; Hassanat, F.; Yang, W. Z.; Forster, R. J.; Petit, H. V.; Chouinard, P. Y., 2012: Eugenol for dairy cows fed low or high concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, rumen microbial populations and milk fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology*, **178**, 139–150.
- Bergman, E. N., 1990: Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, **70**, 567–590.
- Bodas, R.; Prieto, N.; García-González, R.; Andrés, S.; Giráldez, F. J.; López, S., 2012: Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, **176**, 78–93.
- Boullard, O.; Leblanc, H.; Besson, B., 2000: Salicylic acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Burt, S., 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Carro, M. D.; Kamel, C., 2005: Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, **88**, 4393–4404.
- Calabrò, S., 2015: Plant secondary metabolites. In: Puniya, A. K., R. Singh & D. N. Kamra (eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India, pp. 153–159.
- Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P. W.; Castillejos, L.; Ferret, A., 2007: Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, **90**, 2580–2595.
- Cardozo, P. W.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C., 2005: Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, **83**, 2572–2579.
- Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Ferret, A., 2006: Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science*, **89**, 2649–2658.
- Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Losa, R., 2007: Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, **132**, 186–201.

- Cieslak, A.; Szumacher-Strabel, M.; Stochmal, A.; Oleszek, W., 2013: Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, **7**, 253–265.
- Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Hermans, N.; Totté, J.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J., 2002: Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 213–220.
- Cobellis, G.; Trabalza-Marinucci, M.; Yu, Z., 2016: Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *The Science of the Total Environment*, **545–546**, 556–568.
- Davidson, P.; Naidu, A., 2000: Phyto-phenols. In: Naidu, A. (ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, USA, pp. 265–293.
- Dorman, H. J.; Deans, S. G., 2000: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308–316.
- Drong, C.; Meyer, U.; von Soosten, D.; Frahm, J.; Rehage, J.; Breves, G.; Dänicke, S., 2016: Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **100**, 537–551.
- Durmic, Z.; Moate, P. J.; Eckard, R.; Revell, D. K.; Williams, R.; Vercoe, P. E., 2014: In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**, 1191–1196.
- Duval, S. M.; McEwan, N. R.; Graham, R. C.; Wallace, R. J.; Newbold, C. J., 2007: Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 2132–2141.
- Eckard, R. J.; Grainger, C.; de Klein, C. A. M., 2010: Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, **130**, 47–56.
- Eschenlauer, S. C. P.; McKain, N.; Walker, N. D.; McEwan, N. R.; Newbold, C. J.; Wallace, R. J., 2002: Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4925–4931.
- FAO, 2006: *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Report of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fache, M.; Boutevin, B.; Caillol, S., 2016: Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**, 35–46.
- Fiege, H., 2000: Cresols and Xylenols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fievez, V.; Babayemi, O. J.; Demeyer, D., 2005: Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, **123–124**, 197–210.
- Flachowsky, G.; Lebzien, P., 2012: Effects of phytogetic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, **176**, 70–77.
- Gershenson, J.; Croteau, R., 1991: Terpenoids. In: Berenbaum, G. A. & R. Rosenthal (eds.), *Herbivores: their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, USA, pp. 165–219.
- Ginane, C.; Baumont, R.; Favreau-Peigné, A., 2011: Perception and hedonic value of basic tastes in domestic ruminants. *Physiology & Behavior*, **104**, 666–674.
- Griffin, S.; Wyllie, S.; Markham, J.; Leach, D., 1999: The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 322–332.
- Hackmann, T. J.; Spain, J. N., 2010: Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. *Journal of Dairy Science*, **93**, 1320–1334.
- Hart, K. J.; Yáñez-Ruiz, D. R.; Duval, S. M.; McEwan, N. R.; Newbold, C. J., 2008: Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, **147**, 8–35.
- Hausmann, J.; Deiner, C.; Immig, I.; Pieper, R.; Starke, A.; Aschenbach, J. R., 2017: Effects of combined supplementation with plant bioactive lipid compounds and biotin on ruminal fermentation, body condition and energy metabolism in transition dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, **225**, 27–37.
- Hristov, A. N.; Ott, T.; Tricarico, J.; Rotz, A.; Waghorn, G.; Adesogan, A.; Dijkstra, J.; Montes, F.; Oh, J.; Kebreab, E.; Oosting, S. J.; Gerber, P. J.; Henderson, B.; Makkar, H. P. S.; Firkins, J. L., 2013: Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. *Journal of Animal Science*, **91**, 5095–5113.

- Janssen, P. H., 2010: Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, **160**, 1–22.
- Joch, M.; Cermak, L.; Hakl, J.; Hucko, B.; Duskova, D.; Marounek, M., 2016: In vitro screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **29**, 952–959.
- Jouany, J. P.; Morgavi, D. P., 2007: Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, **1**, 1443–1466.
- Jung, H. J. G.; Fahey, G. C., 1983: Interactions among phenolic monomers and in vitro fermentation. *Journal of Dairy Science*, **66**, 1255–1263.
- Klein, C. A. M. de; Eckard, R. J., 2008: Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **48**, 14–20.
- Knapp, J. R.; Laur, G. L.; Vadas, P. A.; Weiss, W. P.; Tricarico, J. M., 2014: Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, **97**, 3231–3261.
- Kumar, S.; Puniya, A. K.; Puniya, M.; Dagar, S. S.; Sirohi, S. K.; Singh, K.; Griffith, G. W., 2009: Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 1557–1566.
- Kung, L.; Williams, P.; Schmidt, R. J.; Hu, W., 2008: A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **91**, 4793–4800.
- López, S.; Dhanoa, M. S.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Kebreab, E.; France, J., 2007: Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, **135**, 139–156.
- López, S.; Newbold, C. J., 2007: Analysis of methane. In: Makkar, H. P. S. & P. E. Vercoe (eds.), *Measuring Methane Production from Ruminants*. Springer Netherlands, pp. 1–13.
- Magyar, J.; Szentandrassy, N.; Bányász, T.; Fülöp, L.; Varró, A.; Nánási, P. P., 2004: Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, **487**, 29–36.
- Mauricio, R. M.; Mould, F. L.; Dhanoa, M. S.; Owen, E.; Channa, K. S.; Theodorou, M. K., 1999: A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, **79**, 321–330.

- McAllister, T. A.; Bae, H. D.; Jones, G. A.; Cheng, K. J., 1994: Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*, **72**, 3004–3018.
- McIntosh, F. M.; Williams, P.; Losa, R.; Wallace, R. J.; Beever, D. A.; Newbold, C. J., 2003: Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 5011–5014.
- NRC, 2001: *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy of Sciences (vol. 7), Washington, USA.
- Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P.; Afolayan, A. J., 2010: Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, **120**, 308–312.
- Patra, A. K.; Saxena, J., 2009: Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **96**, 363–375.
- Patra, A. K.; Saxena, J., 2010: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, **71**, 1198–1222.
- Patra, A. K., 2012: Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*, **184**, 1929–1952.
- Patra, A. K.; Yu, Z., 2012: Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 4271–4280.
- Patra, A. K.; Yu, Z., 2014: Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 897–905.
- Patra, A. K.; Yu, Z., 2015: Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 297.
- Pirondini, M.; Colombini, S.; Malagutti, L.; Rapetti, L.; Galassi, G.; Zanchi, R.; Crovetto, G. M., 2015: Effects of a selection of additives on in vitro ruminal methanogenesis and in situ and in vivo NDF digestibility. *Animal Science Journal*, **86**, 59–68.
- Reynolds, C. K.; Dürst, B.; Lupoli, B.; Humphries, D. J.; Beever, D. E., 2004: Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *Journal of Dairy Science*, **87**, 961–971.

- Rodrigues, P. H. M., 2016: Control and manipulation of ruminal fermentation. In: Millen, D. D., M. De Beni Arrigoni & R. D. Lauritano Pacheco (eds.), *Rumenology*. Springer, Switzerland, pp. 157–187.
- Rooke, J. A.; Wallace, R. J.; Duthie, C. A.; McKain, N.; de Souza, S. M.; Hyslop, J. J.; Ross, D. W.; Waterhouse, T.; Roehe, R., 2014: Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *The British Journal of Nutrition*, **112**, 398–407.
- Russell, J. B.; Onodera, R.; Hino, T., 1991: 27 - Ruminal protein fermentation: New perspectives on previous contradictions. In: Tsuda, T., Y. Sasaki & R. Kawashima (eds.), *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Academic Press, USA, pp. 681–697.
- Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F.; Sangwan, R. S., 2001: Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, **34**, 3–21.
- Soto, E. C.; Yáñez-Ruiz, D. R.; Cantalapiedra-Hijar, G.; Vivas, A.; Molina-Alcaide, E., 2012: Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters. *Animal Production Science*, **52**, 813–822.
- Stewart, C. S.; Flint, H. J.; Bryant, M. P., 1997: The rumen bacteria. In: Hobson, P. N. & C. S. Stewart (eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Netherlands, pp. 10–72.
- Storm, I. M. L. D.; Hellwing, A. L. F.; Nielsen, N. I.; Madsen, J., 2012: Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*, **2**, 160–183.
- Szumacher-Strabel, M.; Cieślak, A., 2010: Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **19**, 319–337.
- Tassoul, M. D.; Shaver, R. D., 2009: Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **92**, 1734–1740.
- Theodorou, M. K.; Williams, B. A.; Dhanoa, M. S.; McAllan, A. B.; France, J., 1994: A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, **48**, 185–197.
- Torrent, J.; Johnson, D. E., 1994: Methane production in the large intestine of sheep. In: Aquilera, J. F. (ed.), *Energy Metabolism of Farm Animals EAAP Publication No. 76*. CSIC Publishing Services, Spain, pp. 391–394.

- Turek, C.; Stintzing, F. C., 2013: Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**, 40–53.
- Ultee, A.; Kets, E. P. W.; Smid, E. J., 1999: Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4606–4610.
- Van Soest, P. J., 1982: *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Vendramini, T. H. A.; Takiya, C. S.; Silva, T. H.; Zanferari, F.; Rentas, M. F.; Bertoni, J. C.; Consentini, C. E. C.; Gardinal, R.; Acedo, T. S.; Rennó, F. P., 2016: Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, **214**, 12–21.
- Wallace, R. J.; McEwan, N. R.; McIntosh, F. M.; Teferedegne, B.; Newbold, C. J., 2002: Natural products as manipulators of rumen fermentation, natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **15**, 1458–1468.
- Weatherburn, M. W., 1967: Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, **39**, 971–974.
- Yáñez-Ruiz, D. R.; Bannink, A.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Morgavi, D. P.; O’Kiely, P.; Reynolds, C. K.; Schwarm, A.; Shingfield, K. J.; Yu, Z.; Hristov, A. N., 2016: Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. *Animal Feed Science and Technology*, **216**, 1–18.
- Zhou, M.; Chen, Y.; Guan, L. L., 2015: Rumen bacteria. In: Puniya, A. K., R. Singh & D. N. Kamra (eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India, pp. 79–95.