

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

Ústav hygieny a technologie mléka

***XIV. konference mladých vědeckých
pracovníků s mezinárodní účastí***

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ



VFU Brno 29. 5. 2012

Editace: Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.
doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.
MVDr. Šárka Cupáková, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-612-4

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají autoři.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Zmeny koncentrácie kyseliny mliečnej a pH mäsa pštrosov počas chladiarenského skladovania a ich vplyv na mikrobiálnu kvalitu	
Mačanga J., Koréneková B., Brenesselová M., Jevinová P., Pipová M.	11
Chemické zloženie a porovnanie sensorických vlastností pštrosieho mäsa v závislosti od spôsobu skladovania	
Brenesselová M., Koréneková B., Mačanga J., Marcinčák S., Bača M.	14
The application of transglutaminase in dry fermented meat products technology	
Pavlík Z., Saláková, A., Kameník, J., Steinhauserová, I.	17
The iodine and sodium content in selected meat products	
Steinhauserová P., Řehůrková I., Ruprich J.	20
Významné mastné kyseliny a jejich obsah v kozím mléce v průběhu laktace	
Králíčková Š., Kuchtík J., Filipčík R., Fojtová J.	22
Zhodnocení obsahu cholesterolu, retinolu a tokoferolu v kozím mléce v závislosti na suplementaci krmné dávky mědi a chlorelou	
Hodulová L., Kostrhounová R., Borkovcová I., Vorlová L., Pechová A.	25
HPLC determination of lipophilic vitamins in sheep's milk	
Gregorová L.	28
Determination of proteins in cheeses	
Ruprichová L., Dračková M., Borkovcová I., Vorlová L.	31
Aromaticky aktivní látky v tavených sýrových analogích	
Sklenářová K., Vítová E., Buňka F., Divišová R.	34
Vliv teploty a vodní aktivity na sorpční izotermy sušené syrovátky	
Langová J., Vlášek V.	37
Vliv MAP na vybrané parametry chlebu	
Vlášek V., Langová J.	40
Hungarian honey	
Vlkovič D., Czipa N., Vorlová L.	43
Stanovenie antioxidačnej aktivity vybraných etanolových rastlinných extraktov	
Bača M., Marcinčák S., Marcinčáková D., Maté D.	46
Porovnanie citlivosti metódy STAR a NAT testu na stanovenie beta-laktámových a aminoglykozidových antibiotík	
Gondová Z., Kožárová I.	49
Faktory ovlivňující <i>qac</i> geny zprostředkovanou rezistenci vůči kvartérním amoniovým sloučeninám	
Červinková D., Jaglič Z., Babák V.	52

Useful tools in revealing <i>Salmonella</i> outbreaks	
Pospíšilová P., Karpíšková R., Dědičová D., Jakubcová L.	55
Bakterie rodu <i>Arcobacter</i> a jejich přežívání v nápojích	
Šilha D., Vytrasová J., Beňová B.,	58
Výskyt <i>Escherichia coli</i> v syrové zelenině z tržní sítě České republiky	
Skočková A., Cupáková, Š., Karpíšková, R.	61
Bezpečnost mléka a mléčných výrobků z pohledu termostability stafylokokových enterotoxinů	
Janštová B. ml., Necidová L., Lačanin, I., Janštová, B.	64
SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETABILÍ	
Determining sulfur dioxide levels in selected samples of South Moravian wines	
Pažout V., Staňková L.	69
Determination of anthocyanins in blue aleurone species of wheat	
Bartl P., Tremlová B., Ošťádalová M.	72
Nutritional value of selected legumes species	
Rusníková L., Straková E., Suchý P.	75
Průkaz sójového proteinu fluorescenční mikroskopií	
Talandová M., Pospiech M., Tremlová B.	78
Differences in growth performance and chemical body composition of two ROSS 308 and COBB 500 hybrids at the end of the fattening period	
Vopálenký J., Macháček M., Suchý P., Straková E.	81
Rozdíl v chemickém složení prsní a stehenní svaloviny orebice chukar (<i>Alectoris chukar</i>)	
Jůzl R., Rusníková L., Suchý P., Straková E.	84
A comparison of the chemical composition of dry matter of breast and thigh muscles in fattened pheasant males and females at the age of 90 days	
Karásková K., Straková E., Suchý P., Jámboř M.	87
Effect of soybean and rapeseed components in the ration of dairy cows to milk fat profile of fatty acids	
Ryšavý J., Křížová L., Janštová B.	90
Vplyv parenterálnej aplikácie selénu a vitamínu E na zdravotný stav mliečnej žľazy jalovic počas peripartálneho obdobia	
Zigo F., Vasiľ M., Elečko J., Farkašová Z., Lešková L.	93
Zmeny zloženia kolostra prasnic v prvých hodinách postpartálneho obdobia	
Ševčík P., Ruzsíková E., Kuruc M., Bučko O., Petrák J.	97
Chemical composition of antlers of Red Deer (<i>Cervus elaphus</i>) and differences in their particular parts	
Jámboř M., Suchý P., Straková E.	100

SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE**Stanovení syntetických vonných látek ve vodě**

Komárková P., Vávrová M. 105

Determination of abiotic and biotic samples from the environment

Štilárková E., Vávrová M., Charvátová M. 108

Stanovení bisfenolů ve vodě

Tesařová S., Charvátová, M., Vávrová, M. 111

Extraction procedures and their optimization for isolation of sulfonamide antibiotics from environmental matrices

Járová K., Vávrová, M., Charvátová, M. 114

Determination of methylmercury and total mercury in water ecosystem

Králová Z., Vávrová M., Charvátová M, Zúfalá M. 117

Detekce druhu *Mycobacterium avium* v sedimentech nádrží s pitnou vodou, v úpravných vod a v domácnostech v ČR

Klanicová B., Sed'a J., Slaná I., Kantorová K., Slaný M., Pavlík I. 120

Rezistencia mikroorganizmov na dezinfekčné prostriedky

Kachnič J., Ondrašovič M., Gregová G., Holičková M., Koščo J. 123

Porovnání účinků platiny, paladia a rhodia na vegetativní růst okřehku menšího (*Lemna minor*)

Němcová B., Bednářová I., Mikulášková H., Straková L., Beklová M. 126

Vliv vybraných platinových kovů na antioxidační aktivitu u rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.) a kukuřice (*Zea mays* L.)

Mikulášková H., Bednářová I., Němcová B., Beklová M. 129

Hodnotenie pôsobenia nízkých dávok ionizujúceho žiarenia a glyfosatu na *Artemia franciscana*

Špalková M., Falis M., Žďárský M., Renčko A. 132

Spolupůsobení arsénu a sinic na hematologické parametry *Oncorhynchus mykiss*

Navrátil L., Palíková S., Navrátil S. 136

Vliv kombinované expozice cyanotoxiny, inhibitory acetylcholinesterázy a antikoagulanty na biochemické parametry krve ptáků

Ondráček K., Pikula J., Band'ouchová H., Damková V., Král J., Osičková J. 139

Vliv olova a nesteroidních antiflogistik na ptáky

Osičková J., Král J., Ondráček K., Band'ouchová H., Pikula J. 142

Pilotná studia hniezdnej ornitofauny univerzitného parku Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Korytár Ľ., Ondrejka, R., Ondrejková, A., Prokeš, M., Slepecká, E., Čechvala, P. 145

SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA**Leukogram po účinku gama žiarenia u *Poecilia reticulata***

Renčko A., Daňová D., Falis M., Ondrašovičová S., Vankúšová M., Špalková M.. 151

SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN

Stanovení 5-nitroimidazolů v krevním séru za použití polymerů s molekulovými otisky	
Zelníčková H.	157
Riziká neuváženého použití warfarínu	
Harkabus J., Hromada R., Sasáková N., Veszelits-Laktičová K., Kachnič J., Kišová J., Ondrašovičová O.	160
Vliv vybraných rozpouštědel na embryonální stádia <i>Danio rerio</i>	
Chromcová L., Štěpánová S., Plhalová L., Prášková E., Svobodová Z.	162
Effects of subchronic exposure to diclofenac on <i>Danio rerio</i>	
Prášková E., Voslářová E., Chromcová L., Plhalová L., Štěpánová S., Bedáňová I., Maršálek P., Škorič M., Svobodová Z.	165
Metalothioneiny a obsah kovů ve tkáních ryb z nádrží Skalka a Želivka	
Ševčíková M., Modrá H., Kružíková K., Svobodová Z., Čelechovská O., Kizek R.	168
Speciace rtuť ve svalovině ryb z významných řek České republiky a hodnocení zdravotního rizika	
Gajdová L., Kružíková K., Svobodová Z.	171
Biomarkery oxidativního stresu u ryb	
Hostovský M., Svobodová Z.	174
Zvěř jako indikátor kontaminace životního prostředí	
Zelníčková L., Maršálek P., Mikuláštková J.	177
Activities of hepatic microsomal cytochrome P450 3A and 2C in pigs in relation to castration	
Tománková J., Zamaratskaia G.	180
SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD	
Presence of emerging pathogen <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> in wild amphibian species in the Czech Republic	
Baláž V., Civiš P., Vojar J., Literák I.	185
Presence of parasitic fungus <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> in wild amphibians of Cameroon	
Baláž V., Literák I., Gvoždík V.	188
Can ticks parasitizing on reptiles play a role in natural cycle of SFG rickettsiae?	
Kubelová M., Bělohávek T., Široký P.	191
<i>Myrsidea povedai</i> (Phthiraptera: Menoponidae), a new species of chewing louse from <i>Phainoptila melanoxantha</i> (Passeriformes: Bombycillidae)	
Lipková A., Sychra O., Kounek F., Čapek M., Literák I.	194

Chewing lice of the genus <i>Myrsidea</i> (Phthiraptera: Menoponidae) from New World warbles (Passeriformes: Parulidae) from Costa Rica	
Kounek F., Sychra O., Čapek M., Literák I.	197
Účinky mikrocytinů na ptáky	
Král J., Pikula J., Bandouchová H., Damková V., Ondráček K., Osičková J., Škochová H.	200
Seroprevalence <i>Toxoplasma gondii</i> u oslů domácích v jižní Itálii	
Machačová T.	203

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Zmeny koncentrácie kyseliny mliečnej a pH mäsa pštrosov počas chladiarenského skladovania a ich vplyv na mikrobiálnu kvalitu

Changes of lactic acid concentration and pH value of ostrich meat during refrigerated storage and their effect on microbial quality

Mačanga Ján, Koréneková Beáta, Brenesselová Martina, Jevinová Paulína, Pipová Monika

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

Summary

The aim of this study was monitored concentration of lactic acid and pH value of the ostrich meat and their effect on microbial quality. Thigh muscles of 3 ostrich (age of 15 months) were stored at 2 - 3 °C in different package conditions during 14 days. Thigh muscle of the first one was stored in plastic bag in vacuum; of the second one was stored two days in normal atmosphere packed in the plastic bag and then in vacuum and muscle of third ostrich was stored only in normal atmosphere in plastic bag. Analyzes were carried out into first 24 hours after slaughter and on the 7th and 14th day of storage. Concentration of lactic acid was measured by capillary electrophoresis and pH value was determined in water extract of meat. Dynamic of lactic acid concentration was same in all group. On the 7th day increasing was detected and subsequently on the 14th day concentration of lactic acid was decreased. Dynamic of pH value was opposite. Total bacteria counts reached on the 14th day 10^7 cfu.g⁻¹ in meat stored in normal atmosphere and 10^5 cfu.g⁻¹ in meat of other two groups stored in vacuum.

Keywords: lactic acid; pH; meat; ostrich; microbial quality

Úvod

Spotreba pštrosieho mäsa zatiaľ nie je príliš rozšírená, ale jeho popularita sa v európskych krajinách zvyšuje vďaka jeho dobrým vlastnostiam ako je nízky obsah tuku, krehkosť a podobná štruktúra ako u hovädzieho mäsa (Alonso-Calleja a kol., 2002). Senzorické a technologické vlastnosti mäsa sa zlepšujú počas skladovania mäsa pri nízkych teplotách po určitú dobu (Ouali a kol., 2006). Zrenie mäsa je jedným z hlavných faktorov, ktorý ovplyvňuje jeho výslednú kvalitu (Atanassová a kol., 2008). Počas zrenia dochádza ku kvantitatívnym zmenám metabolitov ako sú glykogén, kyselina mliečna, fosfáty a taktiež k zmene fyzikálnych vlastností, ako je napríklad pH (Dalle Zotte, 2002). Z pohľadu pH je pštrosie mäso klasifikované ako prechodný typ mäsa medzi normálnym; pH < 5,8 a DFD mäsom; pH > 6,2 (Sales a Mellett, 1996). Hodnota pH je považovaná za základný parameter mikrobiálnej kvality mäsa (Blixt a Borch, 2002). Cieľom tejto práce bolo počas zrecieho procesu sledovať zmeny vybraných fyzikálno-chemických ukazovateľov a ich vplyv na mikrobiálnu kvalitu pštrosieho mäsa v závislosti od spôsobu uskladnenia.

Materiál a metódika

Na tento pokus bola použitá stehenná svalovina (*M. ilioprochantericus cranialis*, *M. iliofemoralis*, *M. ilioprochantericus caudalis*, *M. pubo-ischio-femoralis*) odobratá z 3 pštrosov afrických (*Struthio camelus*) vo veku 16 mesiacov. Vzorky svaloviny boli rozdelené do troch skupín: stehenná svalovina z prvého pštrosa bola skladovaná vo vákuu, stehno z druhého pštrosa bolo skladované prvé tri dni v neupravenej atmosfére a následne vo vákuu a stehno tretieho pštrosa bolo skladované po celú dobu

v neupravenej atmosfére pre teplotu 2 °C po dobu 14 dní. Analýzy boli vykonávané na 1., 7. a 14. deň po zabití. Sledovaný analyt (kyselina mliečna) sa získal extrakciou z vodného výluhu. Po zmeraní pH (pH-meter - InoLab WTW 720) sa výluh 100 násobne zriedil. Takto nariadené vzorky sa aplikovali do elektroforetického analyzátoru EA102 (Villa Labeco, SR). Ako vodiaci elektrolyt bol použitý roztok 10 mM HCL, β -alanín a 0,1% mHEC a zakončujúci elektrolyt roztok 5 mM kyselina kaprónová a 5 mM TRIS. Počty mikroorganizmov sa stanovovali podľa noriem STN EN ISO 4833, STN EN ISO 6888-1 a STN ISO 21528-2.

Výsledky a diskusia

Priebeh zrecieho procesu z pohľadu tvorby kyseliny mliečnej a zmeny pH znázorňuje tabuľka 1. Výsledky poukazujú na skutočnosť, že dynamika zmien koncentrácie kyseliny mliečnej bola rovnaká pri všetkých spôsoboch skladovania. To znamená, že do 7. dňa koncentrácie kyseliny mliečnej stúpali a na 14. deň sme už pozorovali ich pokles. Množstvo kyseliny mliečnej sa na 7. deň najvýraznejšie ($p \leq 0,001$) zvýšilo u svaloviny skladovanej vo vákuu od tretieho dňa. Na 14. deň bol najvýraznejší pokles ($p \leq 0,001$) danej kyseliny vo svalovine skladovanej v neupravenej atmosfére.

Hodnoty pH vo svalovine skladovanej voľne a vo svalovine skladovanej od 3. dňa vo vákuu sa na 7. deň znížili a následne na deň 14. sa zvýšili. U svaloviny skladovanej vo vákuu bol pozorovaný iba vzostup hodnoty pH. Fernández-López a kol. (2008) zaznamenali iba postupné znižovanie hodnoty pH počas rôznych podmienok skladovania z hodnoty 6,04 až pod hodnotu 5,6 na 18. deň. Na druhej strane Bohta a kol. (2006) zistili, že pH svaloviny pštrosov do 14. dňa stúpa z pôvodnej hodnoty $\pm 5,8$ až na hodnotu pohybujúcu sa tesne pod 6,0.

Tabuľka 1: Zmeny koncentrácie kyseliny mliečnej a hodnoty pH v pštrosoch mäsa počas skladovania v závislosti od spôsobu balenia

Sledované parametre	Spôsob balenia	Deň skladovania		
		1. deň	7. deň	14. deň
Kys. mliečna (g.100g ⁻¹)	VB	1,65 \pm 0,05	1,75 \pm 0,45	1,43 \pm 0,12
	VB od 3. dňa	1,13 \pm 0,07	1,36 \pm 0,06***	1,22 \pm 0,12*
	Neupravená atmosféra	1,47 \pm 0,13	1,51 \pm 0,09	1,13 \pm 0,03***
pH	VB	6,20 \pm 0,15	6,25 \pm 0,07	6,37 \pm 0,06*
	VB od 3. dňa	6,36 \pm 0,07	6,18 \pm 0,05**	6,22 \pm 0,06
	Neupravená atmosféra	6,15 \pm 0,10	6,07 \pm 0,14	6,56 \pm 0,07**

Štatistika: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$

Spôsob balenia mal vplyv aj na mikrobiologickú kvalitu skladovanej svaloviny (tabuľka 2). Počty mikroorganizmov počas skladovania stúpali a na 14. deň boli najvyššie hodnoty zaznamenané u svaloviny balenej v neupravenej atmosfére a naopak najnižšie počty boli vo svalovine balenej vo vákuu od tretieho dňa.

Tabuľka 2: Zmeny počtov mikroorganizmov vo svalovine pštrosov počas 14-dňového skladovania

Sledované parametre	Spôsob balenia	Deň skladovania		
		1. deň	7. deň	14. deň
Celkový počet mikroorganizmov	VB	$1,9 \times 10^4$	$6,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$
	VB od 3. dňa	$6,5 \times 10^1$	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
	Neupravená atmosféra	$3,9 \times 10^2$	$2,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^7$
<i>Enterobacteriaceae</i>	VB	< 10	7×10^1	$1,4 \times 10^3$
	VB od 3. dňa	< 10	2×10^1	4×10^2
	Neupravená atmosféra	< 10	$1,6 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$
Koaguláza pozitívne stafylokoky	VB	< 100	< 100	9×10^2
	VB od 3. dňa	< 100	< 100	2×10^2
	Neupravená atmosféra	< 100	< 100	$> 1,5 \times 10^4$

Záver

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že spôsob balenia pštrosieho mäsa ovplyvňuje na jednej strane priebeh zrecieho procesu a na strane druhej mikrobiálnu kvalitu. Kyselina mliečna sa najvýraznejšie tvorila vo svalovine skladovanej vo vákuu od tretieho dňa skladovania, čomu zodpovedalo aj najnižšie pH na 14. deň. Najlepšia mikrobiálna kvalita bola po 14-tich dňoch dosiahnutá u svaloviny skladovanej od tretieho dňa vo vákuu, preto odporúčame tento spôsob balenia a skladovania.

Literatúra

ALONSO-CALLEJA, C.; MARTINEZ-FERNÁNDEZ, B.; CAPITA, R.; PRIETO, M. La carne de avestruz: valor nutritivo y calidad higiénica. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Octubre 2002, 57-62.

ATANASSOVA, V.; APELT, J.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*, 2008, 78, 414-419.

BLIXT, Y.; BORCH, E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Science*, 2002, 60, 371-378.

BOTHA, S.St.C.; HOFFMAN, L.C.; BRITZ, T.J. Effect of hot-deboning on the physical quality characteristics of ostrich meat. *South African Journal of Animal Science*. 2006, 36, 197-208.

DALLE ZOTTE, A. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*. 2002, 75, 11-32.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; MUNOZ, T.; SENDRA, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks. *Meat Science*. 2008, 70, 143-152.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 2006, 74, 44-58.

SALES, J.; MELLETT, F.D. Post-mortem pH decline in different ostrich muscles. Research note. *Meat Science*. 1996, 42, 235-238

Kontaktná adresa: Ján Mačanga, MVDr., Ústav hygieny a technológie mäsa, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81, Košice, Slovenská republika, jan.macanga@gmail.com

Chemické zloženie a porovnanie senzorických vlastností pštrosieho mäsa v závislosti od spôsobu skladovania

Chemical composition and comparison sensory properties of ostrich meat depending of the storage

Brenesselová Martina, Koréneková Beáta, Mačanga Ján, Marcinčák Slavomír, Bača Martin

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Summary

The aim of our work was monitoring chemical composition and comparison sensory properties of ostrich thigh meat depending of 3 variants of the storage. Meat samples were divided into 3 groups, placed in a refrigerator and held at 2-3°C. The first group consisted of chilled meat placed in a plastic bag (with normal atmosphere), the second group consisted of meat stored in vacuum from the second day, and third group consisted of vacuum-packed meat. Analysis was performed at 1th, 7th and 14th day after slaughter. We found that thigh meat of ostrich consists of 25.3 % dry matter, 74.7 % water, 2.3 % fat and 21.0 % total proteins. Sensory examination of quality of ostrich meat (aroma, flavor, juiciness, tenderness) was performed by six evaluators using five-point rating scale. We found that sensory quality of chilled meat stored in a plastic bag was gradually decreased and the lowest value was recorded on the 14th day (12 points). Quality of the meat samples in vacuum and in vacuum from the second day were gradually increasing and the highest value (vacuum packed 16.67 points) was recorded on the 14th day of storage.

Keywords: *ostrich; meat; chemical composition; sensory; quality*

Úvod

Chov pštrosov vo svete má dlhoročnú tradíciu. Pred viac ako 200 rokmi bol chov pštrosov zameraný iba na perie, neskôr sa chov pštrosov zameril na ich kvalitné mäso, ktoré sa stalo vyhľadávanou pochúťkou po celom svete. Mäso pštrosa je neobyčajne chudé, má vyššie percento polynenasýtených mastných kyselín, nižší pomer n6:n3 a nižší obsah mononenasýtených mastných kyselín (Girolami a kol., 2003).

Zloženie mäsa kolíše v závislosti od druhu zvierat'a, plemena, pohlavia, veku a spôsobu výživy (Hrabě a kol., 2006). Pštrosie mäso je označované ako červené, má podobnú štruktúru a chuťové vlastnosti ako mäso hovädzie, oproti ktorému má však o 40% menej tuku. Červené mäso je bohaté na železo a bielkoviny, má nižší obsah tuku a cholesterolu ako mäso kuracie alebo morčacie zbavené kože, ktoré sú prezentované ako tradičné náhrady červeného mäsa (Polawska a kol., 2011).

Cieľom našej práce bolo sledovanie chemického zloženia a porovnanie senzorických vlastností pštrosieho mäsa v závislosti od troch spôsobov uskladnenia, a to: 1. mäso skladované v neupravenej atmosfére, 2. mäso vákuovo balené od 1. dňa, 3. mäso vákuovo balené od 3. dňa.

Materiál a metódy

Do experimentu boli zaradené 3 pštrosy africké dvojprsté (*Struthio camelus*) vo veku 16 mesiacov. Pštrosy pochádzali z farmy zameranej na chov pštrosov. Po zabití

pštrosov na bitúнку bolo mäso v ten istý deň v chladiacom boxe privezené na Ústav hygieny a technológie mäsa UVLF v Košiciach.

Vzorky mäsa, ktoré tvorila stehenná svalovina (*M. ilioprochantericus cranialis*, *M. iliofemoralis*, *M. ilioprochantericus caudalis*, *M. pubo-ischio-femoralis*) boli rozdelené do troch skupín: stehenná svalovina z prvého pštroša bola skladovaná vo vákuu, stehno z druhého pštroša bolo skladované prvé tri dni v neupravenej atmosfére a následne vo vákuu a stehno tretieho pštroša bolo skladované po celú dobu v neupravenej atmosfére pri teplote 2 °C po dobu 14 dní. Analýzy boli vykonávané na 1., 7. a 14. deň po zabití.

Chemické zloženie mäsa (sušina, voda, tuk, bielkoviny) bolo vykonané zo zmesnej vzorky podľa Popelku a kol. (2009). Všetky analýzy boli vykonané štyrikrát pre lepšiu interpretáciu výsledkov.

Senzorická analýza pštrosieho mäsa bola vykonaná šiestimi hodnotiteľmi za použitia 5 bodového hodnotiaceho systému. Jednotlivé vzorky mäsa boli tepelne upravené (uvarené pri 70°C). Hodnotila sa chuť, vôňa, šťavnatosť a krehkosť postupne na 1., 7. a 14. deň. Najvyšší možný počet dosiahnutých bodov bol 20.

Výsledky a diskusia

Chemické zloženie stehennej svaloviny pštrosov je znázornené v tabuľke 1. Priemerný obsah vody v pštrošom mäse bol podľa našich stanovení 74,69 %. Obsah dusíkatých látok bol 20,95 % a obsah tuku 2,29 %. Podobné výsledky obsahu vody a dusíkatých látok dosiahli Majewska a kol. (2009) a takisto Sales (2002). Obsah tuku nameraný týmito autormi bol v porovnaní s našimi výsledkami nižší (0,9 – 1,2 resp. 0,4 – 0,6).

Tabuľka 1: Hodnoty chemického zloženia svaloviny mäsa pštrosov

Meranie	sušina	voda	tuk	dusíkaté látky
X	25,31	74,69	2,29	20,95
Sd	0,72	0,72	0,19	0,02
X max	26,26	75,49	2,52	20,97
X min	24,51	73,74	2,07	20,93

Vo vákuovo balenom mäse od 1. dňa sa senzorická kvalita počas pokusu postupne zvyšovala, vo vzorkách mäsa vákuovo balenom od 3. dňa kvalita mäsa na 7. deň klesla, avšak na 14. deň sa opäť zvýšila. Kvalita mäsa, ktoré bolo uskladnené v obale s neupravenou atmosférou sa postupne od 1. ku 14. dňu znižovala. Najvyššia kvalita pštrosieho mäsa z celkového pohľadu senzorickej analýzy počas experimentu bola zaznamenaná na 14. deň pokusu (16,67 bodov) vo vákuovo balenom mäse od 1. dňa, avšak vo vzorkách mäsa vákuovo balenom od 3. dňa bola hodnota na 14. deň experimentu taktiež vysoká (tabuľka 2).

Tabuľka 2: Priemerný počet bodov (suma 4 vlastností) celkovej senzorickej analýzy počas jednotlivých spôsobov uskladnenia

Deň pokusu	Vákuovo balené od 1. dňa	Vákuovo balené od 3. dňa	Neupravená atmosféra
1.	14,9	15,3	15,0
7.	15,7	14,5	14,0
14.	16,7	16,2	12,0

Tabuľka 3: Priemerný počet bodov podľa jednotlivých vlastností mäsa

Vlastnosti Mäsa	Deň	Vo vákuu od 1. dňa	Vo vákuu od 3. dňa	Bez upravenej atmosféry
Chuť	1.	4,00	4,17	4,17
	7.	4,33	4,17	3,67
	14.	5,00	4,00	3,00
Vôňa	1.	4,67	4,83	4,67
	7.	4,33	4,33	4,00
	14.	4,50	3,83	3,33
Šťavnatosť	1.	3,00	3,17	3,00
	7.	3,50	3,00	3,33
	14.	3,50	4,17	2,83
Krehkosť	1.	3,20	3,17	3,17
	7.	3,50	3,00	3,00
	14.	3,67	4,17	2,83

Záver

Z výsledkov vyplýva, že pštrosie mäso je nutrične hodnotné vďaka nízkemu obsahu tuku a vyváženému obsahu bielkovín. Z pohľadu senzorickej analýzy boli zaznamenané len minimálne rozdiely medzi vákuovo baleným mäsom od 1. dňa a mäsom vákuovo baleným od 3. dňa. Najvyššia kvalita bola zaznamenaná na 14. deň vo vákuovo balenom mäse od 1. dňa. Môžeme konštatovať, že uskladnenie mäsa vo vákuu malo pozitívny vplyv na jeho vlastnosti na rozdiel od mäsa skladovaného v neupravenej atmosfére, ktoré bolo na 14. deň z pohľadu senzorickej analýzy najmenej kvalitné.

Literatúra

GIROLAMI, A. et al.: Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of ostrich meat as influenced by age at slaughter and muscle type, *Meat Science*, 64, 3, 2003, 309–315.

HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P.: *Technologie výroby potravin živočišného pôvodu*, UTB ve Zlíně 2006, ISBN 80-7318-405-2.

MAJEWSKA, D. et al.: Physicochemical characteristics, proximate analysis and mineral composition of ostrich meat as influenced by muscle, *Food Chemistry*, 117, 2009, 207–211.

POLAWSKA, E., et al.: The ostrich meat-an updated review, II. Nutritive value, *Animal Science Papers and Report*, 29, 2, 2011, 89–97.

POPELKA, P. a kol.: *Laboratorne vyšetrenie mäsa a mäsových výrobkov*, Košice, 2009, 200s.

SALES J.: Ostrich meat research: an update. *Proceedings of World Ostrich Congress*, Warsaw, Poland, September 26-29, 2002, 148–160.

Kontaktná adresa: Martina Brenesselová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, martinkabre@hotmail.com

The application of transglutaminase in dry fermented meat products technology

Pavlík Zdeněk, Saláková Alena, Kameník Josef, Steinhauserová Iva

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie masa, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of transglutaminase application into dry fermented sausages on its quality parameters. Eight batches of dry fermented sausages were made: sausage with 35 % and with 45 % of fat, both in 55 mm and 75 mm diameter and each with and without addition of transglutaminase. Physical-chemical and instrumental analysis of quality parameters were performed and the differences between samples were monitored during ripening and storage of dry fermented sausages. There were found differences between samples according to content of transglutaminase in texture parameters during ripening, which shows functionality of preparation used. Though overall character of the dry fermented sausages remained maintain.

Keywords: *transglutaminase; dry fermented sausage; texture*

Introduction

Transglutaminase is an enzyme, which can be naturally found in nature and has been also found in various animal tissues. This enzyme creates a connection between residual content of glutamine and lysine in proteins (Ramírez-Suárez and Xiong, 2003). This connection is created by covalent bond. Transglutaminase can be used in meat technology, for production of reconstituted meat (Kuraishi et al., 1997), for improving consistency and facilitate slicing and also as replacement of phosphates in terms of improved cohesion, water retention and reduction of losses by cooking (Jong and Koppelman, 2002). The aim of this study was to evaluate the effect of transglutaminase application into dry fermented sausages on its quality parameters.

Material and Methods

Eight batches of dry fermented sausages were made: sausage with 35 % and with 45 % of fat, both in 55 mm and 75 mm diameter and each with and without addition of transglutaminase. Samples were marked: TP1 – 45 % fat, 55 mm; TP2 – 45 % fat, 75 mm; TP3 – 35 % fat, 55 mm; TP4 – 35 % fat, 75 mm – each without transglutaminase; TP5 – 35 % fat, 55 mm; TP6 – 35 % fat, 75 mm; TP7 – 45 % fat, 55 mm. TP8 – 45 % fat, 75 mm – each with transglutaminase.

Analysis of basic physical-chemical and texture parameters were performed: water activity (aw) was measured with a Novasina LabMaster instrument (Novasina AG, Switzerland) and pH measurements using a Double Pore needle probe (Hamilton Bonaduz AG, Switzerland) and a 340i WTW pH-meter (WTW, Germany). Amount of chlorides (Volhard method, ČSN ISO 1841-1), collagen (spectrophotometry at 550 nm, equalised to 4-hydroxyproline content) and pure muscle protein (after elimination of non-protein N-compounds by hot tannine, protein content was measured on a KJEHLTEC from TECATOR, pure muscle protein was calculated as the protein content reduced by the amount of collagen). Nitrogen was converted to crude protein using a factor of 6.25.

Samples were tested by a texture profile analysis (TPA) using an Instron Universal Testing Machine (model 5544) (Instron Corporation, England). Parameters were obtained using available computer software (Merlin). Cylinder samples (1 cm height, 1.25 cm diameter) were compressed twice to 50 % of their original height with a compression platen of 36 mm in diameter. Force time curves were recorded at a crosshead speed of 50 mm/min. Hardness (N) – the peak force required for the first compression, and cohesiveness – the ratio of the positive force area during the second compression to that in the first compression, were evaluated (Szczesniak, 2002; Desmond & Kenny, 2005).

Results and Discussion

No significant differences were recorded in physical-chemical parameters of dry fermented sausages. It means that the characteristics of this product were not affected by addition of transglutaminase. Results of physical-chemical analysis are shown in table 1.

Certain differences were recorded by the instrumental analysis of texture. An instrumental assessment of texture was performed by means of a texture profile analysis (TPA). The parameter assessed was the maximum force required for initial compression of the sample (hardness). Different development of textural properties during ripening is shown in graph 1.

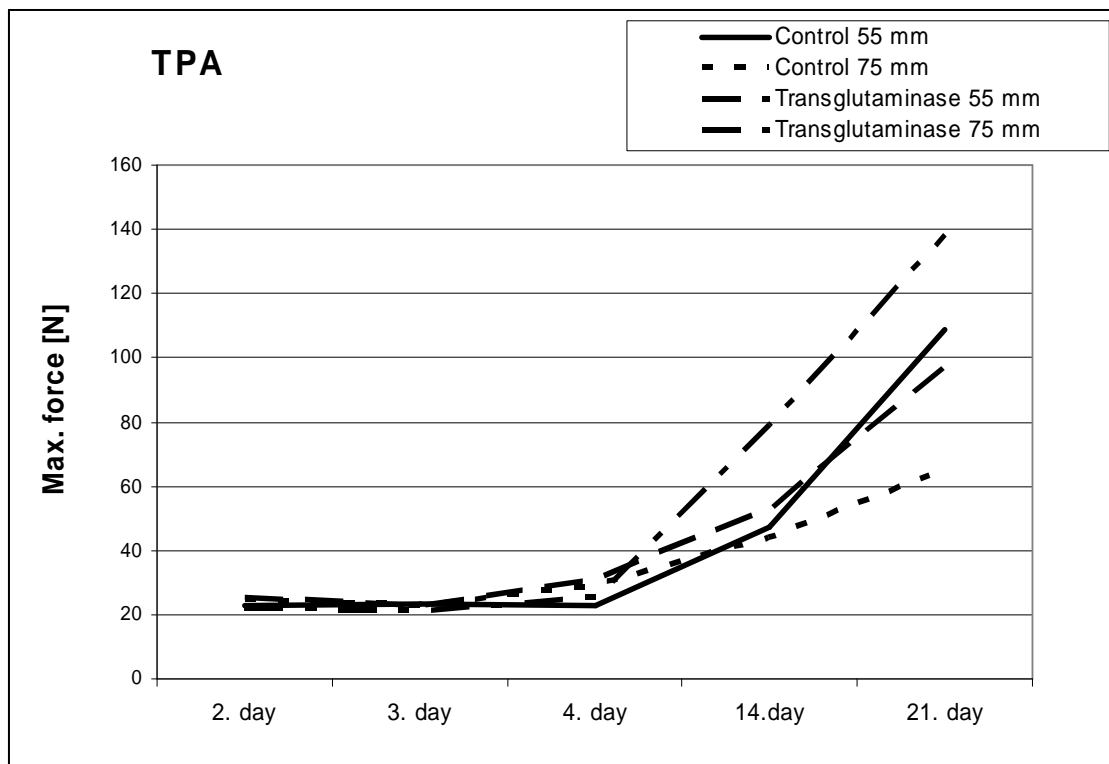
Table 1: Physical-chemical parameters of dry fermented sausages

Sample	pH	aw	fat [%]	NaCl [%]	PMP [%]
TP1	4.659 ± 0.002	0.882 ± 0.002	45.115 ± 0.825	3.393 ± 0.038	16.299 ± 0.636
TP2	4.643 ± 0.001	0.913 ± 0.001	40.515 ± 2.205	3.220 ± 0.005	16.031 ± 0.570
TP3	4.752 ± 0.002	0.873 ± 0.000	32.175 ± 0.895	3.335 ± 0.060	15.437 ± 0.080
TP4	4.724 ± 0.003	0.908 ± 0.002	30.535 ± 1.395	3.593 ± 0.063	16.422 ± 1.218
TP5	4.637 ± 0.002	0.883 ± 0.000	32.115 ± 3.405	3.258 ± 0.008	23.162 ± 0.529
TP6	4.649 ± 0.002	0.895 ± 0.002	29.275 ± 2.655	3.460 ± 0.040	21.594 ± 0.906
TP7	4.500 ± 0.004	0.867 ± 0.001	44.045 ± 1.885	3.505 ± 0.045	19.622 ± 0.937
TP8	4.461 ± 0.001	0.889 ± 0.000	41.155 ± 1.135	3.623 ± 0.108	15.137 ± 0.577

PMP – pure muscle protein

Conclusions

The effect of transglutaminase application into dry fermented sausages on its quality parameters was monitored. No significant differences were recorded in physical-chemical parameters, so the overall character of the dry fermented sausages remained maintain. Differences were recorded by the instrumental analysis of texture. Samples enriched with transglutaminase began to form typical structure of dry fermented sausage quickly than control samples. In the end of ripening maximum force (hardness) was also higher in these samples. Similar effect had a different diameter. Hardness in the end of ripening was higher in samples with thinner diameter in both control and transglutaminase enriched samples. The effect of transglutaminase on improving texture parameters was confirmed and results shows possibility of using transglutaminase in meat products with improved recipe – as replacement of phosphates or in products with lower salt content.



Graph 1: Texture profile analysis

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Grant No. MSM6215712402, Veterinary Aspects of Food Safety and Quality.

References

- DESMOND, E.M.; KENNY, T. A. Effect of pelvic suspension and cooking method on the processing and sensory properties of hams prepared from two pork muscles. *Meat Science*, 2005, 69, 425-431.
- JONG, G.A.H.; KOPPELMAN, S.J. Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science*, 2002, 67, 2798-2806.
- KURAIISHI, C. et al. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 1997, 62, 488-490.
- RAMÍREZ-SUAÍREZ, J.C.; XIONG, Y.L. Effect of transglutaminase induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures, *Meat Science*, 2003, 65, 899 – 907
- SZCZESNIAK, A. S. Texture is sensory property. *Food Quality and Preferences*, 2002, 13, 215-225.

Contact address: Zdeněk Pavlík, Mgr., Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: zpavlik.vfu@seznam.cz

The iodine and sodium content in selected meat products

¹Steinhauserová Pavla, ²Řehůrková Irena, ^{1,2}Ruprich Jiří

¹ Department of Milk Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

²National Institute of Public Health, Center for Health, Nutrition and Food, Palackého 3a, 612 42 Brno

Summary

Iodine deficiency is an intensively solved global public problem throughout the entire world. Even though a progress in controlling its deficiency has been made, this issue is still acute. The most widespread and the best strategy to ensure the required amount of iodine in the population is the salt fortification with potassium iodate. Despite its advantages - table salt is cheap and commonly consumed; it also brings some disadvantages. The European population sodium daily intake ranges between 3-5 g, where meat products represent about 26 % of this intake. Due to the risk of hypertension resulting in coronary heart disease, restriction of sodium intake is necessary. Food industry could play an important role in reducing sodium intake or on the other side eradicating iodine deficiency. Using iodinated salt in meat production is not mandatory in the Czech Republic; it depends on the produce's decision. The aim of this study was to observe selected type of meat products in the Czech market, to analyze its salt and iodine content and to describe possible differences between production country and health benefit.

Keywords: iodine; sodium; dried meat; meat products

Introduction

In meat industry, the salt fortification with iodate or the use of wheat fiber and soy isolate fortified with iodine (I) to improve the nutritional quality of products is already known. Some type of meat products are next to milk, bread and egg the most important exposition source of I in the Czech population diet [1]. The concentration of iodine in salt is given by the Czech legislation to 27 ± 7 mg/kg, but its use is not mandatory in the food industry [2]. Also, a big variability of I content in used marine salt, must be taken into account. Traditionally, the salt without I had been used in the Czech Republic (CR). This was changed by the manufacture of new types of meat products and raising consumer's demand for nutritionally more beneficial products. Due to high saltiness, popularity among consumers and special production technology; dried meats were selected for this pilot study. These products are manufactured in many countries differing in pig breed, type of feed, meat weight, and processing conditions, like the use of iodinated salt [3]. These factors could give them various compositions and so could have different nutritional aspect to human health. In this pilot study, the I and sodium (Na) content of dried meats from CR were compared to those, made in Italy and Spain.

Material and Methods

Totally 24 samples of dried meats were purchased in 7 major retail chains in the CR. Products from CR (5) were compared to those manufactured in Italy (9) and Spain (10). Samples were transported to the National Institute of Public Health - Center for Health, Nutrition and Food in Brno and homogenized by Grindomix (120 s, 3000 rpm).

Na analysis: Homogenised sample was mixed with 6 ml of HNO₃ and 1 ml of hydrogen peroxide and undergone the pressure decomposition in closed microwave system ETHOS (Milestone, Italy). The atomic emission spectrophotometry was used subsequently. After the sample digestion and blending with 0,2% KCl (FIAS 400,

Perkin-Elmer), it was fogged into the acetylene-air flame. The emission was measured on AAS 3300 Perkin-Elmer spectrometer at 589,6 nm.

I analysis: Homogenized sample was mixed with 1 ml of water, 2 ml of 2 M KOH, 1 ml 10% ZnSO₄ and KCl₂O₅, dried in the oven (105 °C) and burned out in the muffle furnace. The white ash was mixed with 6 ml of water and centrifuged (10 min, 2 500 rpm). The absorbance was measured on spectrometer Lambda 25 (Perkin-Elmer) with FIAS 400 system and autosampler S10 (Perkin-Elmer) at 430 nm. Results were expressed as I and Na content per 1 kg of edible part (= arithmetic mean value of 3 parallel measurements with the standard deviation).

Discussion and Conclusions

Dried meats produced in the CR had the highest average amount of measured I in the samples (707 µg/kg) in comparison to Italian products (in average 86 µg/kg) and Spanish products (41 µg/kg). Just one Spanish product (Jamón Curado Bodega) had a quite similar I content as in the CR products. None of CR dried meats had an under detection limit content of I (>15 µg/kg) as from Italy and Spain. From these results, the use of iodinated salt among Czech meat producers is obvious, but not in Italy nor in Spain. On the other side, the average Na contents in all three countries were very similar (16 g/kg from Spain; 17 g/kg from Italy and 17 g/kg from CR). The different amount of I in dried meat from Italy and Spain could be due to traditional technology of their production in these countries. On the other side, in the CR this production is quite new; so is more open to new manufacture approaches and consumer's demands. Based on results of European Food Consumption Validation Project, 16 % of men and 40 % of women (45-65 years old people) are below recommended daily dose of I intake in the CR [4]. So as we can see this problem is still acute and food industry plays a very important role in solving it.

Acknowledgments

This work was supported by the IGA VFU; project no IGA VFU 69/2011/FVHE.

References

- [1] RUPRICH, J. et al: IV Dietární expozice člověka – CHEMON, SZÚ, 2009. Staženo 24.03.2012, <http://czvp.szu.cz/monitor/tds09c/CHEMON/5-27%20I%2009.pdf>.
- [2] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 331/1997 Sb. pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici.
- [3] COLMENERO, F.J.; VENTANAS, J.; TOLDRÁ, F. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in healthy diet. *Meat Sci.* 2010, vol. 84, p. 585-593
- [4] ŘEHŮRKOVÁ, I.; RUPRICH, J.; DOFKOVÁ, M. a kol. Jód a dietární expozice populace ČR. In *IX. Konference u příležitosti dne jódu „Zásobení jódem a prevence tyreopatií e zaměřením na období těhotenství a kojení“*. Praha, 2010, p. 7-10.

Contact address: Pavla Steinhauserová, MVDr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, steinhauserova@chpr.szu.cz.

Významné mastné kyseliny a jejich obsah v kozím mléce v průběhu laktace

The content of significant fatty acids in goat milk during the lactation period

¹Králíčková Šárka, ¹Kuchtík Jan, ¹Filipčík Radek, ²Fojtová Jitka

¹Ústav chovu a šlechtění zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of stage of lactation on the content of fatty acids in goat milk. The study was carried out on organic farm Olešenka during the year 2011. The experiment involved 9 goats of Brown short-haired breed. Daily feeding ration was based on pasture with the addition of organic oat (0.5 kg per goat). Fatty acids were determined using gas chromatography. Under the study it was found that the stage of lactation had a significant effect on contents of all monitored fatty acids. In goat milk fat were the most represented palmitic acid (34,49 %) and oleic acid (26,24 %). CLA content was highest (1,01 %) in the middle of monitoring, in July.

Keywords: goat milk; fatty acids; stage of lactation

Úvod

V České Republice je chov koz stále minoritní, nicméně se zvyšujícím se zájmem spotřebitelů o kvalitní kozí výrobky, se v posledních letech zvyšují i stavy dojných plemen. Významnou složkou kozího mléka je tuk, který je nejen nositelem chuti, ale také zdrojem zdraví prospěšných mastných kyselin. Mezi tyto řadíme zejména esenciální kyselinu linolovou a α -linolenovou a dále, v poslední době často sledovanou, konjugovanou kyselinu linolovou (CLA), které je přisuzován pozitivní význam zejména v prevenci vzniku kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a cukrovky a přispívá k celkovému tělesnému zdraví člověka.

Materiál a metodika

Sledování bylo realizováno v průběhu roku 2011 na eko-farmě Olešenka na 9 kozách plemene hnědá krátkosrstá. Denní krmná dávka koz se skládala z pastvy, sena, minerální soli (vše *ad libitum*) a mačkaného ovsa cca 0,5 kg/kus. Odběry vzorků byly realizovány z ranního dojení v průměrném 61., 89., 124., 160., 187., 222. a 257. dni laktace. Analýza jednotlivých MK proběhla po převedení vyextrahovaného tuku (50 mg) na FAMEs (fatty acid methyl esters), po přidávku NaCl byly FAMEs vytřepány do isooktanu a analyzovány metodou kapilární plynové chromatografie.

Po skončení analýz byly následně dopočítány celkové obsahy jednotlivých skupin MK: nasycené MK Σ SFA (C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C18:0); mononenasyčené MK Σ MUFA (C14:1 + C16:1 + C18:1n9t + C18:1n9c); Σ PUFA (C18:2n6t + C18:2n6c + C18:3n3 + C18:2/9,11/ + C18:2/10,12/); n3 kyseliny Σ PUFAn3 (C18:3n3), n6 kyseliny Σ PUFAn6 (C18:2n6t + C18:2n6c), Σ UFA (Σ MUFA + Σ PUFA); Σ CLA (C18:2/9,11/ + C18:2/10,12/).

Zjištěné údaje byly statisticky analyzovány s pomocí metody nejmenších čtverců (SAS; PROC GLM variant ss4), přičemž byl zohledněn systematický efekt fáze laktace (7 tříd).

Výsledky a diskuse

Tabulka 1: Vliv fáze laktace na obsahy vybraných MK v kozím mléce v % veškerých MK

	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	Celkový průměr	S.E.M.	F test
C16:0	31,58 ^A	32,90 ^{AC}	38,30 ^B	29,35 ^A	31,75 ^A	40,30 ^B	37,26 ^{BC}	34,49	0,608	**
C18:0	16,70 ^A	15,79 ^A	11,63 ^B	18,34 ^A	15,91 ^A	8,75 ^B	9,27 ^B	13,77	0,550	**
C18:1n9c	25,79 ^{ac}	27,13 ^{abe}	22,78 ^c	30,57 ^{bd}	30,04 ^{ad}	21,68 ^c	25,68 ^{ce}	26,24	0,534	*
C18:2n6c	5,76 ^A	4,54 ^{AC}	3,70 ^{BC}	3,69 ^{BC}	3,10 ^{BD}	2,56 ^{BD}	1,94 ^D	3,61	0,189	**
C18:2/9,11/	0,62 ^{abc}	0,51 ^{bc}	0,39 ^{bc}	0,98 ^a	0,70 ^{ac}	0,50 ^{bc}	0,19 ^b	0,56	0,048	*
C18:2/10,12/	0,05 ^A	0,01 ^{BC}	0,01 ^{BC}	0,03 ^{AB}	0,01 ^{BC}	0,01 ^{BC}	0,00 ^C	0,02	0,003	**
ΣSFA	63,65 ^A	64,52 ^A	70,48 ^B	61,41 ^A	63,49 ^A	72,34 ^B	68,98 ^B	66,41	0,592	**
ΣMUFA	27,64 ^{ac}	28,86 ^{bc}	24,63 ^{ae}	32,60 ^b	31,88 ^{bd}	23,82 ^a	28,06 ^{cde}	28,21	0,520	*
ΣPUFA	8,72 ^a	6,62 ^b	4,90 ^{cd}	5,99 ^{bc}	4,63 ^{cd}	3,84 ^{de}	2,96 ^e	5,38	0,263	*
ΣPUFAn3	1,66 ^A	1,12 ^B	0,54 ^C	0,67 ^C	0,45 ^C	0,54 ^C	0,62 ^C	0,80	0,057	**
ΣPUFAn6	6,39 ^A	4,99 ^{AC}	3,95 ^{BC}	4,31 ^{BC}	3,46 ^{BD}	2,79 ^{BD}	2,15 ^D	4,01	0,176	**
ΣUFA	36,35 ^A	35,48 ^A	29,52 ^B	38,59 ^A	36,51 ^A	27,66 ^B	31,02 ^B	33,59	0,592	**
ΣCLA	0,67 ^{ab}	0,52 ^{ac}	0,39 ^{ac}	1,01 ^b	0,71 ^{ab}	0,51 ^{ac}	0,19 ^c	0,57	0,049	*

Mezi hodnotami v řádcích s rozdílnými písmeny (A, B, C, D) je statisticky vysoce průkazný ($P \leq 0,01$) rozdíl; (a, b, c, d, e) statisticky průkazný ($P \leq 0,05$) rozdíl, ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; NS nesignifikantní.

Z výsledků naší studie (viz Tabulka 1) především vyplývá, že fáze laktace měla statisticky průkazný vliv na obsahy sledovaných MK, což je v souladu s výsledky studie Talpura *et al.* (2008) a Nuddy *et al.* (2003).

Obsahy kyseliny stearové (C18:0), elaidové (C18:1n9t) a olejové (C18:1n9c) vykazovaly velmi podobný trend. Průměrné obsahy těchto MK v průběhu laktace klesaly s výjimkou 4. a 5. odběru, kdy byl zaznamenán jejich výraznější nárůst. Poměrně vyrovnaný trend v průběhu celé laktace byl zaznamenán v případě kyseliny oktadeka-10,12-dienové (C18:2/10,12/).

Dopočtený celkový obsah SFA byl nejnižší ve 4. a nejvyšší v 6. odběru. Celkový obsah MUFA kolísal v průběhu celého sledování. Co se týká obsahu PUFA, zde byl zaznamenán podobně klesající trend jako u kyselin C18:2n6t, C18:2n6c a C18:2/10,12/. Park *et al.* (2007) uvádějí nejvyšší obsah veškerých UFA v letních měsících, což potvrdila také naše studie, kdy byl jejich obsah nejvyšší ve 4. odběru (tedy v červenci) a nejnižší v 6. odběru, zatímco obsah všech SFA byl naopak nejnižší ve 4. odběru a nejvyšší v 6. odběru.

Kyselina linolová (C18:2n6c) vykazovala v průběhu laktace klesající trend, naproti tomu Talpur *et al.* (2008) uvádějí opačný trend. V rámci naší studie byl zaznamenán vyšší obsah C18:2n6c v porovnání s údaji Nuddy *et al.* (2003). Tudisco *et al.* (2010)

zjistili, že mléko koz z ekochovu má vyšší průměrný obsah kyseliny linolové (2,77 %) oproti mléku koz získaného z konvenčního chovu (2,07 %).

Dopočtený obsah celkové CLA byl poměrně variabilní v průběhu sledování. Nejvyšší obsah (1,01 %) byl zaznamenán uprostřed laktace, naproti tomu Ataşođlu *et al.* (2009) uvádějí nejvyšší obsah CLA až na konci laktace.

Závěr

Ze studie především vyplývá, že fáze laktace měla vysoce průkazný vliv na obsahy všech sledovaných mastných kyselin. Živočišné tuky obsahují velké množství nasycených mastných kyselin a mnohem méně zdraví prospěšných nenasycených mastných kyselin, což potvrdila také naše studie. Celkový obsah SFA v kozím mléce činil 66 %. Nadbytečný příjem těchto kyselin ve stravě negativně působí zejména na ukládání cholesterolu v tepnách. Na druhou stranu byl v rámci naší studie zjištěn vyšší obsah kyseliny linolové.

Poděkování

Sledování bylo realizováno s podporou interního grantového projektu AF MENDELU, TP 1/2012 a s podporou projektu MZe QH91271.

Literatura

ATAŞOĐLU, C.; ÇIĐDEM, U.; YONCA, K. Changes in milk fatty acid composition of goats during lactation in a semi-intensive production system. *Archiv Tierzucht*. 2009, vol. 52, no. 6, s. 627-636.

NUDDA, A.; MELE, M.; BATTACONE, G.; USAI, M.G.; MACCIOTTA, N.P.P. Comparasion of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. *Italian Journal of Animal Science*. 2003, vol. 2, no. 1, s. 515-517.

PARK, Y.W.; JUARÉZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2007, 68, s. 88-113.

TALPUR, F.N.; BHANGER, M.I.; KHOOHARO, A.A.; ZUHRA MEMON, G. Seasonal variation in fatty acid composition of milk from ruminants reared under the traditional feeding system of Sindh, Pakistan. *Livestock Science*. 2008, 118, s. 166-172.

TUDISCO, R.; CUTRIGNELLI, M.I.; CALABRÓ, S.; PICCOLO, G.; BOVERA, F.; GUGLIELMELLI, A.; MONIELLO, G.; INFASCELLI, F. Influence of organic systems on milk fatty acid profile and CLA in goats. *Small Ruminant Research*. 2010, 88, s. 151-155.

Kontaktní adresa: Šárka Králíčková, Ing., Ústav chovu a šlechtění zvířat, AF Mendelu Brno, Zemědělská 1, 603 00 Brno, xkralic@mendelu.cz.

Zhodnocení obsahu cholesterolu, retinolu a tokoferolu v kozím mléce v závislosti na suplementaci krmné dávky mědí a chlorelou

Evaluation of cholesterol, retinol and tocopherol content in caprine milk after supplementation the fodder with copper and chlorella

¹Hodulová Lucia, ¹Kostrhounová Romana, ¹Borkovcová Ivana, ¹Vorlová Lenka, ²Pechová Alena

¹Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno

²Klinika chorob přežvýkavců, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Summary

The aim of this study was to evaluate the total content of cholesterol and fat soluble vitamins – retinol and tocopherol in caprine milk by means of HPLC method with isocratic elution and UV detection. Milk samples were collected from dairy breed, white shorthaired goat feeding at the VFU, Ruminant and Swine Clinic. The fodder was enriched with organic and inorganic copper from parturition till ablactation with lower content of copper and after ablactation with twice dose and than with chlorella during 6 weeks period. The samples were prepared by liquid-liquid extraction for chromatography analysis. The results vary a lot and hadn't shown statistical significant differences between control and experimental samples of milk. The individuality, genetic potential and feeding has the highest influence on the milk composition. The cholesterol range vary from 55 – 103 mg/kg, retinol content 181 – 501 µg/100g and tocopherol content was 135 – 342 µg/100g.

Keywords: goat/caprine milk; cholesterol; retinol; tocopherol; HPLC

Úvod

Studie byla zaměřena na stanovení celkového obsahu cholesterolu a vybraných liposolubilních vitaminů – retinolu a tokoferolu v kozím mléce. Krmná dávka koz byla suplementována měďnatými přípravky ve formě síranu měďnatého a chelátem mědi. Následně byly měďnaté přípravky nahrazeny chlorelou. Na analýzu jednotlivých kozích mlék byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí při vlnových délkách 205 a 325 nm.

Kozí mléko se v dnešní době dostává do popředí zájmu spotřebitelů z důvodu nutričně významných a bioaktivních složek v něm obsažených. Pro zvýšení koncentrací těchto prvků a tím i látek, jejichž obsah ve tkáních tyto prvky ovlivňují, se chovatelé snaží přidávat do krmných dávek přežvýkavců různé mikro- a makroelementy. Nutriční a zdravotní význam cholesterolu a lipofilních vitaminů je zařadil do komponent, které je třeba analyzovat a rozvíjet metody pro jejich analýzu. V případě příslušných výživových tvrzení je nezbytná deklarace obsahu na obalu výrobku.

Liposolubilní vitaminy jsou dodávány do organismu hlavně různými druhy potravin. Jejich obsah závisí na druhu potravin a technologickém zpracování. Doporučená denní dávka pro dospělého člověka se udává pro vitamin A 800 µg a pro vitamin E 10 µg. Vitamin A je důležitý pro zrak a společně s vitaminem E jsou potřebné pro fyziologickou funkci reprodukčního a imunitního systému. Organismus novorozence vyžaduje vitamin E na ochranu proti oxidativnímu stresu, chrání polynenasycené mastné kyseliny buněčné membrány a lipoproteiny proti oxidaci. Vitamin E zahrnuje 2 skupiny: tokoferoly a tokotrienoly, ale jen tokoferoly plní většinu fyziologických

funkcí. Vitamin A je skupinou různých forem (vitamerů) a zahrnuje retinol, retinal, kyselinu retinovou, retinyl estery a provitamin A, karotenoidy a β -karoten

Cholesterol, steroidní sloučenina, která je klíčovou komponentou řady biochemických procesů v organismu je prekurzorem veškerých steroidů v těle, kortikosteroidů, pohlavních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D. Je typickým produktem živočišného metabolismu a je spojován je hlavně se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Znalost obsahu cholesterolu v potravinách je proto významná při řešení zdravotních problémů v oblasti výživy.

Materiál a metodika

Odběr vzorků mléka: Vzorky kozího mléka byly odebírány od koz bílých krátkosrstých z chovu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Celkový počet vzorků v jednom odběru byl 22. Vzorky mléka byly rozděleny v případě mědi do 3 skupin. První skupinu tvořily kontrolní vzorky, druhou skupinu vzorky od koz, do jejichž krmné směsi byla přidávána anorganická měď ve formě síranu měďnatého. U třetí skupiny byla krmná směs suplementována organickou mědí – chelátem. Přídavky mědi byly podávány perorálně od doby porodu až do odstavení mláďat v dávce 15 mg/den a po odstavení po dobu 8 týdnů v dávce 30 mg/den. Vzorky byly odebírány 2., 6. a 8. týden po odstavení. Přídavky chlorelly byly podávány perorálně po dobu 6 týdnů v období od 30. 6. do 11. 8. 2011.

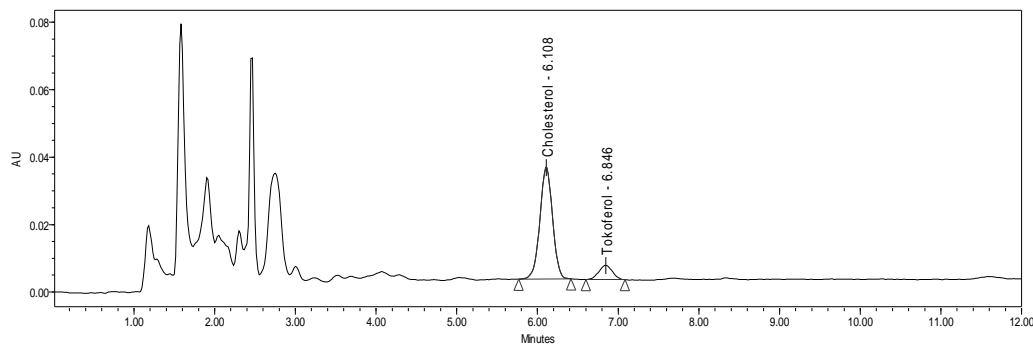
Pracovní postup: K navážce vzorku 1 g bylo přidáno malé množství antioxidantů (hydrochinon a kyselina askorbová). Vzorek byl saponifikován methanolickým roztokem KOH po dobu 30 minut. Následně byly analyty extrahovány do hexanu po dobu 10 min třepáním. Hexanová vrstva byla oddělena, promyta destilovanou vodou do neutrální reakce a vysušena síranem sodným. Extrakt byl odpařen a odparek byl rozpuštěn v methanolu, zfiltrován a převeden do vialky. Kvantifikace byla prováděna metodou vnější kalibrace. Každý vzorek byl analyzován minimálně ve dvou paralelních stanoveních a s každou sérií byl měřen slepý vzorek.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: methanol/voda (95:5), isokratická eluce na reverzní fázi, průtok $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nástřik $20 \mu\text{l}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, detekce při $\lambda = 205 \text{ nm}$ (cholesterol, tokoferol), $\lambda = 325 \text{ nm}$ (retinol). Doba analýzy 12 min.

Výsledky

Tabulka 1: Minimální a maximální koncentrace cholesterolu, retinolu a tokoferolu a medián.

	Cholesterol (mg/kg)			Retinol ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)			Tokoferol ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)		
	min	max	Me	min	max	Me	min	max	Me
Kontrola Cu	55,15	104,04	78,91	181	342	220	146	282	176
Chelát mědi	54,65	125,69	83,27	179	505	251	135	303	182
Síran měďnatý	52,92	126,93	86,46	181	343	222	135	204	166
Kontrola chlorela	67,72	122,85	84,19	185	292	235	145	268	182
Chlorela	62,27	133,96	84,71	193	286	234	154	342	191



Graf 1: Chromatogram cholesterolu a tokoferolu při $\lambda = 205$ nm.

Diskuse a závěr

Jednotlivé složky kozího mléka ovlivňuje mnoho faktorů, jako jsou individualita jedince, pořadí laktace a věk, genetický potenciál, prostředí a podmínky, ve kterém žije a v neposlední řadě krmení a další exogenní a endogenní vlivy, což je viditelné z tabulky číslo 1. Vliv suplementace krmné dávky měďnatými přípravky a chlorelou na obsah analyzovaných nutrientů nebyl statisticky významný.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena z výzkumného záměru MSM6215712402.

Literatura

- ALBALÁ-HURTADO, S.; NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997, vol. 778, no. 1-2, s.243-246.
- KONDYLI, E.; KATSIARI, M.C.; VOUSINAS, L.P. Variation of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chemistry*. 2007, vol. 100, s. 226-230.
- LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; RÍOS-VÁZQUEZ, N.J.: High-performance chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, α -tocopherol and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1105, s. 135-139.
- PARK, Y.W.; JU'AREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2007, vol. 68, s. 88-113.
- RAYNAL-LJUTOVACA, K.; LAGRIFFOUL, G.; P. PACCARD, P.; GUILLET, I. Y.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. 2008, vol. 79, no 1, s. 57-72.
- DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H.J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid – liquid microextraction followed by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*. 2009, vol. 877, s. 456-460.
- FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods (review). *Journal Chromatography A*. 1992, vol. 624, no.1-2, s. 369-388.
- PARK, Y.W. Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA. *Small Ruminant Research*.2000, vol. 37, s. 115-124.
- PIIRONEN, V.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. New Data for Cholesterol Contents in Meat, Fish, Milk, Eggs and Their Products Consumed in Finland: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002, vol. 15, s. 705-713.
- VYHLÁŠKA 450/2004 Sb. ve znění vyhlášky 330/2009.

Kontaktní adresa: Lucia Hodulová, MVDr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11012@vfu.cz

HPLC determination of lipophilic vitamins in sheep's milk

Gregorová Lucie

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The aim of this work was the determination of retinol and α -tocopherol in sheep's milk. Vitamin's content was compared with the fat content of samples. 25 samples of ovine milk from the farm in Valašská Bystřice were analyzed. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection was used. Mobile phase consisted of methanol - water (95:5), in isocratic mode and flow rate of 1 ml/min was applied. Amount of vitamins was ranging between 0,831 - 6,684 mg/L and 0,046 - 3,808 mg/L for vitamin E and vitamin A respectively.

Keywords: RP-HPLC/UV; vitamins; ovine milk

Introduction

Ovine milk can provide a profitable alternative to cow milk. Information of composition and physico-chemical characteristic of sheep's milk is essential for successful development of dairy sheep industries as well as for the marketing the products. All the factors can be influenced by several factors, such as breed, genetic, physiology, feed, environment and technology. (Raynal-Ljutovac, 2008; Pandya, 2007) Fat content is the more quantitatively and qualitatively variable component in milk. There is higher amount of fat in ovine milk (7,9 g/100g) than in bovine milk (3,6 g/100g) (Pandya, 2007, Park, 2007; Raynal-Ljutovac, 2008).

Sheep's milk contains higher levels of total solids and major nutrients than goat's and cow's milk. In recent decades much research has been performed on vitamins A and E, because of their biological activity and their possible use for prevention and treatment of different diseases (Citová, 2007).

Table 1: Vitamin content of ovine and bovine raw whole milk

Fat soluble vitamins	Ovine milk	Bovine milk	References
A – Retinol	0,08 mg/100g	0,04 mg/100g	Raynal-Ljutovac, 2008
A	146 IU	126 IU	Park, 2007
A	-	156 IU	Pandya, 2007
E – Tocopherol	0,11 mg/100g	0,11 mg/100g	Raynal-Ljutovac, 2008

Material and Methods

25 samples of ovine milk from the farm in Valašská Bystřice were analyzed by the RP-HPLC/UV. The samples were delivered from the farm during lactation and kept in the freezer until analysis. Parallel analysis of the samples was performed.

Sample preparation:

1 ml of each sample was saponificated 30 minutes with KOH and methanol. Ascorbic acid and BHT were added as antioxidants. After cooling 5 ml of HPLC water and 10 ml of hexane were added and the samples were shaken 10 minutes. Then the upper hexan layer was separated and washed with HPLC water until neutral pH to phenolphthalein. The hexan extract was dried with anhydrous Na_2SO_4 . Aliquot amount of the hexan was evaporated in rotary evaporator (60°C). The residue was dissolved in 2 ml of methanol.

The samples were filtered through filters with a pore size of 0,45 μm and injected into the chromatograph.

Chromatographic conditions

RP-HPLC/UV was used as a proven method for the analysis of retinol and α -tocopherol in milk samples. Eclipse XDB-C8 column (4,6mm x 250mm, Agilent, USA) was used. The UV detection used 2 wavelengths in order to increase the sensitivity and selectivity of the detection. 325nm for retinol and 205 nm for tocopherol was used. Methanol-water (95:5, v/v) in isocratic mode as the mobile phase was applied at the flow rate of 1 ml/min and injection volume was 20 μl . Total analysis time was 12 minutes.

Evaluation:

Collection and evaluation processing of data were performed in the Breeze software, version 3.30 SPA (Waters, USA). Basic statistical characteristics were calculated computed using Microsoft Excel.

Validation of the method:

Validation of RP-HPLC/UV analysis was performed using retinyl acetate and tocopherol acetate as external standards.

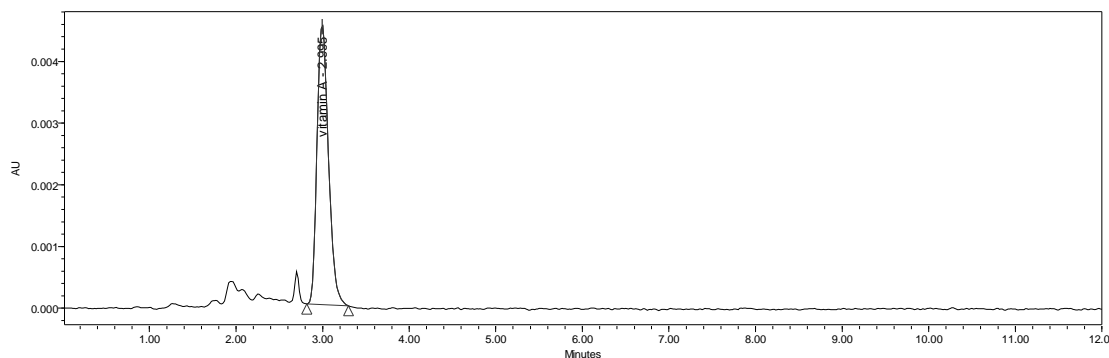


Figure 1: Chromatogram of vitamin A in the sample of ovine milk

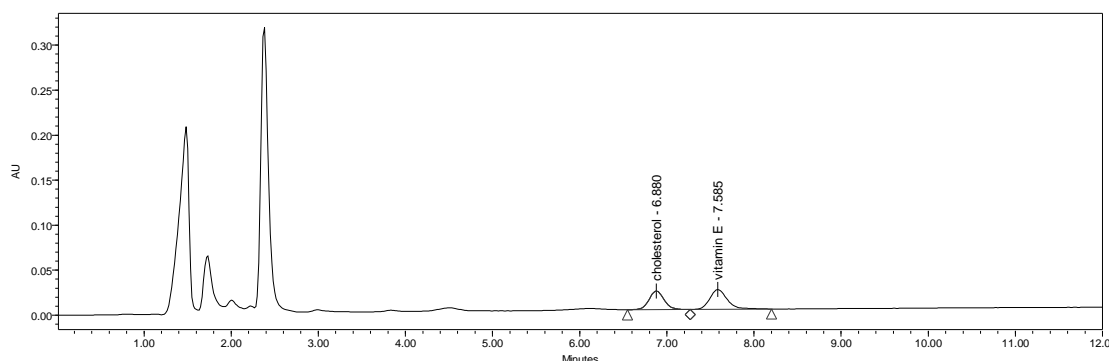
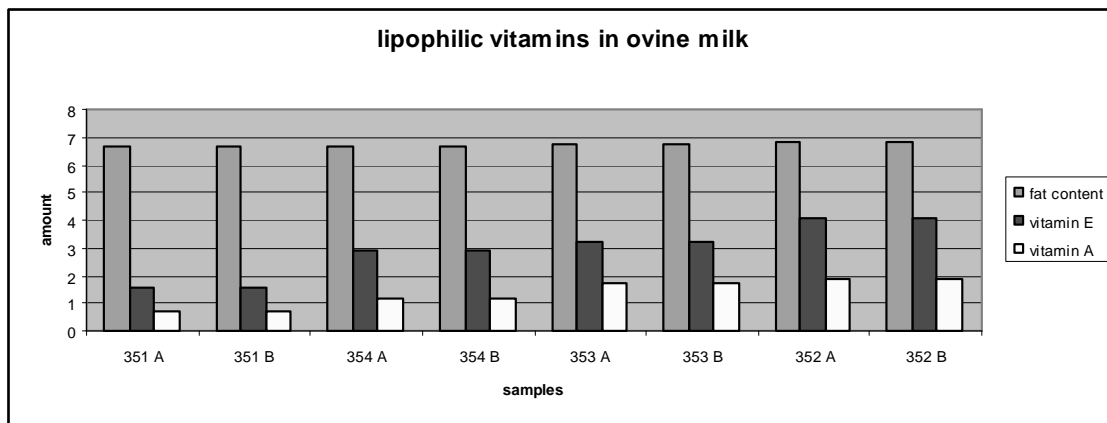


Figure 2: Chromatogram of vitamin E in sample of ovine milk

Results and Discussion

Table 1: Average of vitamins and fat content

Sample	350	351	354	353	352	403	407	406	404	405
Fat content (g/100g)	6,63	6,68	6,69	6,74	6,79	6,63	6,81	6,93	7,25	7,28
Vitamin E (mg/L)	3,164	1,563	2,871	3,218	4,085	4,332	3,684	3,917	2,505	5,982
Vitamin A (mg/L)	1,689	0,698	1,169	1,715	1,863	0,786	0,836	0,909	0,992	0,575



Graph 1: Dependence of the vitamin content on the fat content

Conclusion

Samples of ovine milk were analyzed by RP-HPLC/UV method. In 25 samples were determined content of vitamin A and E. Mean values of vitamins were: 0,575 - 3,686 mg/L zaokrouhlit for vitamin A and 1,563 – 5,996 mg/L for vitamin E. Increase of fat content in the samples means increase of the vitamin content in most of the samples, see table and graph 1.

This method is suitable for the determination of these vitamins in the milk samples.

Acknowledgments

This work was financially supported by the research plan MSM6215712402.

References

- CITOVÁ, I., HAVLÍKOVÁ, L., URBÁNEK, L., SOLICHOVÁ, D., NOVÁKOVÁ, L., SOLICH, P. Comparison of novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2007, vol.388, no.3, s.675-681.
- PANDYA, A.J., GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*. 2007, vol.68, no.1-2, s. 193-206.
- PARK, Y.W., JUÁREZ, M., RAMOS, M., HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristic of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2007, vol.68, no. 1-2, s.88-113.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K., LAGRIFFOUL, G., PACCARD, P., GUILLET, I., CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep mil products: An update. *Small Ruminant Research*. 2008, vol.79, no.1, s. 57-72.

Contact address: Lucie Gregorová, Mgr., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Milk Hygiene and Technology, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic, email: H10014@vfu.cz

Determination of proteins in cheeses

Ruprichová Lenka, Dračková Michaela, Borkovcová Ivana, Vorlová Lenka

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

Summary

The aim of this work was to introduce the method for detection of protein content in cheeses. The analysis was focused on determination of major milk proteins which include caseins. 10 samples from the market were analyzed by means of reversed phase high-performance liquid chromatography. Liquid chromatograph Alliance 2695 with PDA detector 2996 was used. The separation was performed on C18 column X Bridge TM, 150 x 3.0 mm, 3.5 μ m. Mobile phase contained water, acetonitrile and trifluoroacetic acid. Average values of determined proteins were: α ₅-casein $55.7 \pm 2.9\%$, β -casein $36.4 \pm 1.8\%$ and κ -casein $8.0 \pm 1.4\%$.

Keywords: RP-HPLC; cheese; protein; casein

Introduction

The determination of individual caseins, and their degradation products in milk, cheese and other dairy products has been a major task for several years, since it can provide valuable information (Veloso et al., 2002). Differences in price and seasonal availability might make it attractive for farmers to adulterate expensive ewe and goat milk with cheaper cow milk. Protection against such frauds is of importance to warrant fairness in food trade, and also to protect consumers. There is an ultimate need of rapid, efficient, sensitive, and reliable control methods that can determine the composition of milk in cheese and other dairy products (Rodríguez et al., 2010).

The aim of this work was the introduction of methods for the determination of caseins and whey proteins in cheese using the RP-HPLC (high performance liquid chromatography with reverse phase).

Material and Methods

Samples:

10 samples of cheese from the market were analyzed by the RP-HPLC method. The samples were preserved at 4-6 °C until analysis. Parallel analysis of the samples was performed.

- Sample No. 1: Brie
- Sample No. 2: Balsýr
- Sample No. 3: Primátor
- Sample No. 4: Ementáler Boryna
- Sample No. 5: Koliba
- Sample No. 6: Madeta Kamadet
- Sample No. 7: Blaťácké zlato
- Sample No. 8: Balkánský sýr
- Sample No. 9: Grattugiato fresco
- Sample No. 10: Formmagio per pasta

Sample preparation:

The protein fractions were obtained from the cheese samples (5 g) by extraction with water (15 ml), in sonicator (Bandelin, Germany) for 10 – 15 minutes. Then the mixture was precipitated by addition of acetic acid until pH 4.6. The samples were centrifugated (4000 g, 10 min) in tube. Caseins were rinsed by an aqueous mixture of dichloromethane (1:1) and lyophilised (López-Fandiño et al., 1993) using a lyophiliser of ALPHA 1–4 LSC (Christ, Germany). Before the final determination, lyophilised casein was diluted in a solution of Tris-HCl (pH 6.8) and 2-mercaptoethanol. Next, the casein samples were filtered through a nylon membrane filter (0.22 μm) into vials.

Conditions of HPLC determination:

For casein determination the following chromatographic system was used: liquid chromatograph Alliance 2695 with PDA 2996 detector (Waters, USA) and X Bridge TM C18, 150 x 3.0 mm, 3.5 μm column (Waters, Ireland). Column temperature for casein detection was 45 °C. Mobile phase A included water/acetonitrile/trifluoroacetic acid (TFA) in ratio of 95/5/0.1 (v/v/v) and mobile phase B included water/acetonitrile/TFA in ratio of 5/95/0.1 (v/v/v). Gradient elution and mobile phase flow rate of 0.4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ were applied. The detection was performed at 205 nm. Casein analysis lasted for 30 minutes. Injection volume of caseins was 5 μl .

Evaluation:

Collection and evaluation of data in relation to RP-HPLC were performed in by the Empower2 software (Waters, USA). Basic statistical characteristics (mean, standard deviation, maximum value, minimum value) were computed using Microsoft Excel.

Validation and optimization of RP-HPLC for caseins:

Optimization of HPLC analysis was performed using standard solutions of α_{S1} -casein ($\alpha_{\text{S}}\text{-CN}$), β -casein ($\beta\text{-CN}$) and κ -casein ($\kappa\text{-CN}$). Individual peaks were processed together as one peak (timed groups – sum peaks quantitation). In the case of κ -casein, peaks were summarized in the time range 10.00 – 12.50 min, for α_{S1} -casein 13.20 – 14.40 min and for β -casein 14.10 – 16.00 min. The repeatability of the procedure was determined from the results of multiple measurements per sample ($n = 6$) and was determined as RSD 4.6% for α_{S1} -casein, RSD 6.7% for β -casein and RSD 0.7% for κ -casein. The limit of detection was determined as 3 S/N (signal/noise ratio) 0.0045 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and the limit of quantification (determined as 10 S/N) was 0.015 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for α_{S1} -casein, β -casein and κ -casein. Evaluation was performed using external standard and quantification was performed using timed groups.

Chromatograms of caseins are in the Figs. 1–2.

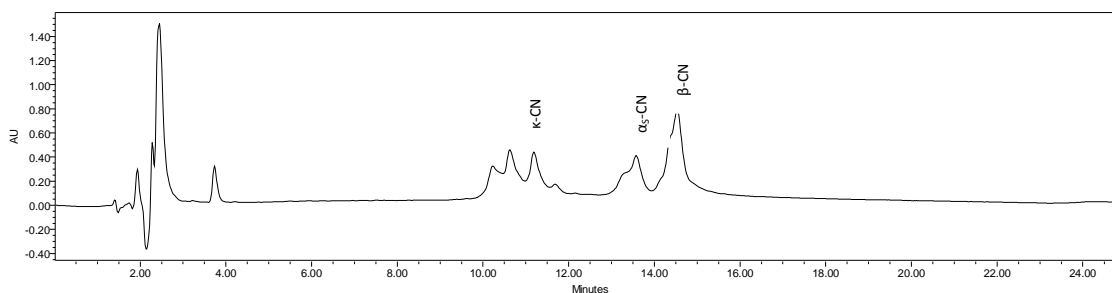


Figure 1: Chromatogram of caseins standards

Results and Discussion

In Table 1 there is percentage representation of α_S -casein, β -casein and κ -casein. Whey proteins were below the limit of detection. The concentrations of whey proteins were under the limit of detection and so they are not introduced in this table.

Table 1: Concentration of caseins in cheeses in %

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
α_S -CN	59.1	54.1	53.7	56.4	52.0	59.1	60.2	52.8	54.9	54.5
β -CN	34.8	37.3	39.2	36.4	38.1	33.6	33.9	38.0	35.9	36.4
κ -CN	6.20	8.70	7.20	7.30	9.90	7.20	5.80	9.20	9.20	9.20

Table 2: Basic statistics characteristic

%	mean	min	max	SD
α_S -CN	55.7	52.0	60.2	2.90
β -CN	36.4	33.6	39.2	1.80
κ -CN	8.00	5.80	9.90	1.40

From the results it is clear that the content of individual caseins at different types of cheese is very similar. This confirms the fact that all samples of cheese were made from cow's milk. In the Fig 2 is shown chromatogram of caseins standard and samples (Koliba cheese). For comparison, Veloso et al. (2002) reported that raw cow's milk contains 52.5% α_S -CN, 32.4% β -CN and 16.4% κ -CN.

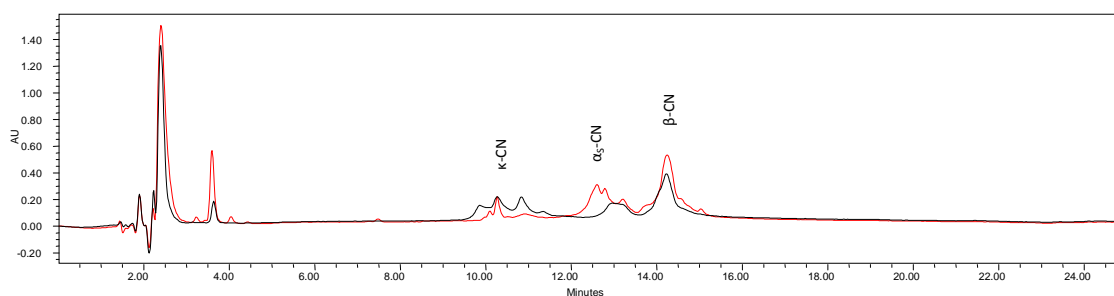


Figure 2: Chromatograms of caseins standards (black line) and caseins in Koliba cheese sample (red line)

Conclusion

Samples of cow's cheeses were analyzed by RP-HPLC method. In 10 samples were determined contents of caseins. Mean values of caseins were: α_S -CN $55.7 \pm 2.9\%$, β -CN $36.4 \pm 1.8\%$, κ -CN $8.0 \pm 1.4\%$. This method is suitable for the determination of caseins in the cheeses.

Acknowledgments

This work was supported by the Internal Grant Agency of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno 75/2011/FVHE.

References available at author.

Contact address: Lenka Ruprichová, Ing., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Milk Hygiene and Technology, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic, email: ruprichoval@vfu.cz

Aromaticky aktivní látky v tavených sýrových analogích Volatile aroma compounds in processed cheese analogues

¹Sklenářová Kateřina, ¹Vítová Eva, ²Buňka František, ¹Divišová Radka

¹Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Brno

²Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín

Summary

The solid-phase microextraction method connected to gas chromatography was used for identification and quantification of volatile aroma compounds in various types of processed cheese analogues produced from different types of fat (butter, palm oil, sunflower oil, coconut oil and butter oil). The highest total content of aroma compounds was found in sunflower oil analogue ($1429,92 \pm 86,03 \text{ mg.kg}^{-1}$), the lowest in coconut oil analogue ($930,70 \pm 48,63 \text{ mg.kg}^{-1}$). All samples were also sensorially evaluated. Processed cheese analogues with coconut oil and butter were best evaluated. On the other hand sunflower analogue was evaluated as the worst, in which the assessors have identified oily and rancid off-flavour, it was also evaluated as poor in taste.

Keywords: cheese analogues; aroma; SPME; GC

Úvod

V posledních letech se můžeme na našem trhu setkat stále častěji s tzv. analogy tavených sýrů. Poprvé se začaly objevovat na americkém trhu v 70. letech minulého století. Sýrové analogy jsou klasifikovány jako sýrové substituty nebo imitace, ve kterých jsou mléčný tuk, mléčná bílkovina nebo obojí částečně nebo zcela nahrazeny nemléčnou komponentou, zejména rostlinného původu. V současné době se komerčně vyrábí analogy různých druhů přírodních i tavených sýrů. Roční produkce v USA je přibližně 300 000 tun, evropská produkce je výrazně nižší (Guinee et al., 2004; Bachmann, 2011). Používají se jako zmražené přísady do pizzy, plátky do hovězích burgerů a přísady do salátů, chlebičků, sýrových omáček, sýrových chipsů a hotových jídel.

Sýrové analogy jsou vyráběny smícháním různých jedlých tuků nebo olejů (sojový, palmový, kukuřičný, arašídový, bavlníkový, kokosový, příp. jejich hydrogenované ekvivalenty) a proteinů s dalšími ingrediencemi a vodou. Náhrada mléčného tuku levnějšími rostlinnými oleji přispívá k příznivějšímu poměru nasycených/nenasycených tuků a ke snížení obsahu cholesterolu. Na druhou stranu je podstatně ovlivněna sensorická jakost finálního výrobku, zejména nedostatečná chuť a aroma (flavour) (Bachmann, 2011; Guinee et al., 2004).

Sýrový flavour je jedním z nejdůležitějších kritérií rozhodujících o výběru a o přijetí spotřebitelem. Charakteristická vůně a chuť přírodních sýrů se vytváří během skladování a zrání. Aromaticky aktivní látky vznikají na základě metabolických přeměn tří hlavních mléčných složek: laktosy, lipidů a proteinů. U sýrových analogů lze předpokládat, že přítomné látky budou pocházet především ze surovin, použitých pro jejich výrobu (Marilley et al., 2005; Sunesen, 2001).

Tato práce se zabývá srovnáním profilu aromatických látek tavených sýrových analogů obsahujících různý druh tuku, doplněné sensorickým hodnocením jejich flavouru.

Materiál a metody

Tavené sýrové analogy byly vyrobeny ve Zlíně na Univerzitě Tomáše Bati. Jako hlavní surovina byla použita eidamská cihla 30% tvs. (Kromilk a.s.), různé druhy tuků (máslo, palmový tuk, slunečnicový olej, kokosový tuk, koncentrovaný mléčný tuk), tavicí soli a voda. Obsah tuku v sušině konečných výrobků byl 50%. Suroviny byly rozkrájeny na menší kousky dány do tavicího kotle (Vorwerk a Co. Thermomix, Germany), dále se přidala voda a tavicí soli. Následně byla směs zahřívána za stálého míchání na 90°C nepřímým ohřevem a udržována při této teplotě 1 minutu. Roztavená hmota byla plněna do plastových vaniček, uzavřena a uskladněna při teplotě 6±2°C. Pro SPME extrakci bylo odebrán 1 g vzorku. Podmínky SPME-GC analýzy: vlákno CARTM/PDMS 85µm(Supelco), teplota extrakce 35°C, rovnovážná doba 30 min., doba extrakce 20 min., teplota desorpce 250°C, doba desorpce 20 min. Plynový chromatograf TRACETM GC (ThermoQuest, Italy), kapilární kolona DB-WAX (30m x 0.32 mm x 0.5 µm), teplota injektoru 250°C, nosný plyn N₂ 0.9 ml.min⁻¹, plamenově ionizační detektor 250°C, H₂ 35 ml.min⁻¹, vzduch 35 ml.min⁻¹, make up N₂ 30 ml.min⁻¹. Teplotní program 40°C.

Tabulka 1: Aromaticky aktivní sloučeniny identifikované v tavených sýrových analozích

Sloučenina [mg.kg ⁻¹]	Typ taveného sýrového analogu				
	Máslo	Palmový tuk	Slunečnicový olej	Kokosový tuk	Mléčný tuk
<i>Alkoholy</i>					
Propan-2-ol	nd	237,26±5,46	666,54±38,00	166,57±4,69	nd
Ethanol	165,74±12,98	174,98±9,85	173,76±3,44	194,18±1,75	171,06±5,72
Butan-2-ol	49,46±4,89	72,22±8,62	56,89±3,39	73,05±2,66	63,78±0,06
Propanol	0,16±0,03	0,24±0,07	0,21±0,01	0,23±0,02	0,22±0,01
Pentan-2-ol	4,93±0,33	nd	0,26±0,01*	nd	nd
Butanol	0,03±0,01*	0,07±0,01*	0,05±0,01*	0,03±0,01*	0,03±0,01*
3-methylbutan-1-ol	nd	0,90±0,09	1,37±0,05	nd	0,78±0,01
2-methylpropan-1-ol	nd	4,18±0,97	4,92±0,09	nd	nd
Pentan-1-ol	nd	0,02±0,01*	0,04±0,01*	nd	0,01±0,01*
<i>Aldehydy</i>					
Propanal	4,88±0,09	0,97±0,05	0,78±0,01	0,81±0,06	0,74±0,07
Ethanal	0,09±0,01	nd	0,76±0,02	nd	nd
Pentanal	0,02±0,01*	nd	0,05±0,01*	nd	0,02±0,01*
Hexanal	nd	0,01±0,02*	nd	nd	nd
E-2-hexanal	nd	0,04±0,01*	0,05±0,01*	nd	0,03±0,01*
<i>Ketony</i>					
Butan-2-on	0,50±0,09	0,96±0,02	0,54±0,01	0,79±0,01*	0,65±0,02
Butan-2,3-dion	0,61±0,07	0,57±0,03	0,91±0,05	0,46±0,06	0,54±0,01
4-methylpentan-2-on	0,01±0,01*	nd	nd	0,01±0,01*	0,01±0,01*
Undekan-2-on	0,01±0,01*	nd	nd	nd	0,01±0,01*
3-hydroxybutan-2-on	645,35±9,98	667,98±23,45	468,25±32,32	432,29±34,38	685,78±0,09
<i>Kyseliny</i>					
Ethanová	86,51±2,38	64,51±3,05	52,61±8,44	61,34±4,97	64,51±3,05
Butanová	1,47±0,06	nd	nd	nd	1,74±0,05
Hexanová	0,25±0,02	0,23±0,01	0,20±0,01	0,27±0,01	nd
Oktanová	nd	0,40±0,04	0,33±0,03	0,52±0,01	nd

<i>Estery</i>					
Methylacetát	0,19±0,01	0,14±0,1	0,14±0,01	0,14±0,01	0,16±0,02
Ethylacetát	0,02*±0,01*	0,01*±0,01*	0,02*±0,01*	0,02*±0,01*	0,02*±0,01*
Butylacetát	nd	0,03±0,04*	1,25±0,11	nd	nd
Ethyldekanoát	nd	nd	nd	0,01±0,01*	nd

Výsledky jsou uváděny jako průměr ±SD (n=6), nd= neidentifikováno, * = 10⁻¹

1 min., 40-200°C s gradientem 5°C/min., 200°C 7min. GC-MS analýza byla provedena na GC 8000 (Carlo Erba, Italy) s MS TRIO 1000 (FisonsInstrumental, USA). Nosný plyn He, kolona a podmínky analýzy byly stejné jako u GC-FID. Sensorické hodnocení se skládalo z pořadové zkoušky (ČSN ISO 8587 (56 0033)), hodnocení podle stupnice (ČSN ISO 4121 (56 0052)) a profilového testu (ČSN ISO 11035 (56 0061)).

Výsledky a diskuze

Pro extrakci těkavých aromatických sloučenin ze vzorků analogů byla použita metoda SPME, která je rychlá a velmi šetrná k matici vzorku. Vyextrahované aromatické látky byly identifikovány GC-MS a kvantifikovány pomocí standardů metodou GC-FID. Celkem bylo identifikováno 27 aromatických sloučenin, z toho 5 aldehydů, 9 alkoholů, 4 estery, 5 ketonů a 4 kyseliny. Dominantními sloučeninami všech analogů byly 3-hydroxybutan-2-on, ethanol, kyselina ethanová a butan-2-ol. V analogu s kokosovým tukem, palmovým tukem a slunečnicovým olejem dominoval propan-2-ol. Nejvyšší obsah aromaticky aktivních sloučenin byl identifikován v analogu se slunečnicovým olejem, nejméně v analogu s kokosovým tukem. V tab. 1 jsou uvedeny všechny identifikované a kvantifikované aroma sloučeniny v jednotlivých sýrových analogích. Množství aromaticky aktivních látek bylo ovlivněno tukem, ze kterého byl analog vyroben. Z uvedených výsledků vyplývá, že část aromaticky aktivních látek přechází do sýrových analogů z použitých surovin, především z eidamské cihly, část se jich tvoří účinkem vysoké teploty během tavení a některé vznikají během skladování.

Současně byla provedena sensorická analýza, ve které byl stejně jako u instrumentální analýzy hodnocen vliv přídavku různých druhů tuků na sensorickou jakost vzorků. Nejpříznivěji byly hodnoceny sýrové analogy s kokosovým tukem a máslem. Tyto analogy měly chuť a vůni harmonickou, sýrovou nebo máslovou a vykazovaly pouze nepatrné odchylky od vynikající chuti a vůně. U těchto analogů nebyla posuzovateli identifikována žádná nepříjemná cizí pachut'. Na druhé straně, nejhůře hodnocen byl analog se slunečnicovým olejem. Chuť a vůně byla hodnocena jako nevyhovující s výskytem olejové a žluklé pachutě.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem FRVŠ MŠMT ČR č. 1294/G4/2012.

Literatura

- BACHMANN, H. P. Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*, 2001, vol. 11, no. 4-7 pp. 505–515. ISSN 0958-6946.
- GUINEE, T.P., CARIĆ, M., KALÁB, M. Pasteurized Processed cheese and Substitute/Imitation cheese products. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed.). 2004, vol. 2, no. 3, pp. 349–394.
- MARILLEY, L., CASEY, M.G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal Food Microbiology*. 2005, vol. 90, no. 2, pp. 139-159.
- SUNESSEN, L.O., LUND, P., SORENSEN, J., HAMER, G. Development of volatile compounds in processed cheese during storage. *LWT-Food Science and Technology*. 2002, vol. 35, pp. 128–134.

Kontaktní adresa: Kateřina Sklenářová, Ing., Ústav chemie potravin a biotechnologií, FCH VUT Brno, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, sklenarova.katerina@gmail.com

Vliv teploty a vodní aktivity na sorpční izotermy sušené syrovátky

Effects of temperature and water activity on the sorption isotherms of whey powder spray

Langová Jitka, Vlášek Václav

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Sorption isotherms represent the relationship between the equilibrium moisture content (EMC) and relative air humidity or water activity (A_w) in biological materials at a constant temperature. They are used primarily to optimize the storage and food packaging conditions in predictive microbiology and in modelling of drying processes. The critical value of A_w for microbial growth is 0.6. The aim of this work was to create moisture sorption isotherms of whey powder spray for the temperature range of 20-35°C. The moisture manometer method was used for laboratory determination of equilibrium states. There were monitored the structural changes corresponding to the predetermined values of A_w and temperature for selected samples. Created sorption isotherms showed sigmoid shape which is in accordance with the hypothesis. The EMC which corresponded to the critical A_w was determined for each selected temperature. The storage conditions have been recommended after evaluation the results of EMC and A_w . For prevention of microorganisms growth in the whey powder spray is the storage by temperature 20°C under 6,5% EMC, by 25°C under 10,0% EMC and by 35°C under 19,5% EMC is recommended.

Keywords: sorption isotherms; water activity; relative air humidity; whey powder spray

Úvod

Potravin y s různými obsahy vlhkosti mají odlišnou hodnotu vodní aktivity (A_w) v závislosti na stavu vody v potravinách. Tento vztah mezi obsahem vlhkosti a A_w se nazývá sorpční izoterma vlhkosti (SIV), kdy teplota musí být konstantní. Kritická hodnota A_w , která brání efektivnímu rozvoji mikroorganismů, je pro většinu potravin 0,6 – 0,7 (Labuza, 1984). Sorpční izotermy desorpce a absorpce vytvářejí hysterezní smyčku (Štencl, 2006a). Se znalostí SIV lze predikovat maximální vlhkost, kterou může potravina během skladování získat (Labuza, 1984), aniž by došlo k rozvoji mikroorganismů.

U dehydratovaných mléčných výrobků dochází při změně jejich vlhkosti ke změně struktury. Problémem u těchto výrobků bývá slepování a tvrdnutí. SIV poskytují informace o stabilitě dehydratovaných mléčných výrobků. Pro sušené potraviny obecně platí, že obsah vlhkosti při určité A_w klesá s rostoucí teplotou (Foster *et al.*, 2005).

Materiál a metody

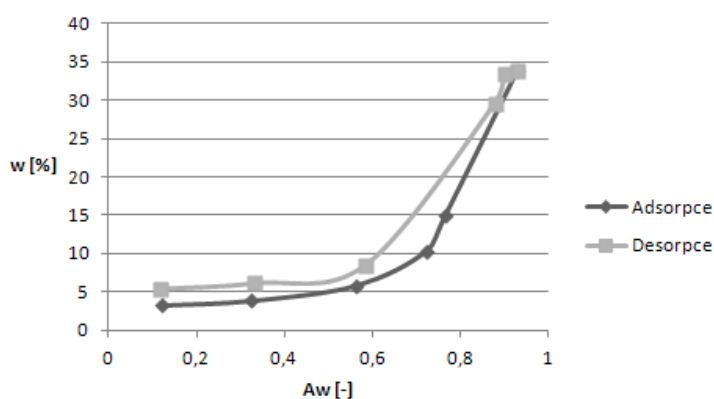
K měření byla použita sušená syrovátka zakoupená v tržní síti od výrobce Moravia Lacto a.s., balena v BOHEMILK, a.s. (400 g). Syrovátka byla skladována při teplotě do 24 °C a relativní vlhkostí max. 70 % v souladu s doporučením výrobce na obalu.

A_w byla měřena na A_w -metru Novasina manometrickou metodou založenou na změnách parciálního tlaku vodní páry v limitovaném objemu vzduchu těsně nad vzorkem citlivým měřicím zařízením. Byl vyhodnocován stav rovnováhy při předem zvolené teplotě (Štencl, 2006b). Každé měření bylo třikrát zopakováno. Konstantní

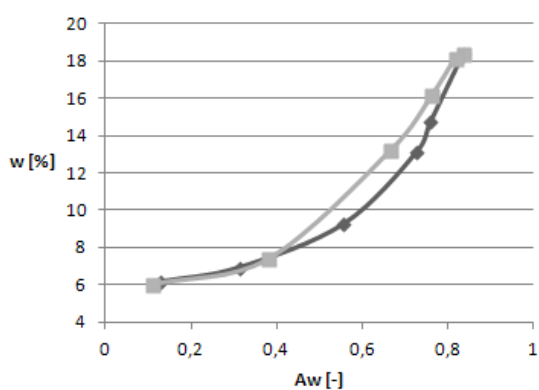
relativní vlhkost vzduchu byla získána za použití standardů nasycených solných roztoků Novasina SALT-T & Sensor-Check SC. Soli použité k dosažení relativní vlhkosti prostředí měly rovnovážné vlhkosti 11, 33, 58, 75, 84 a 97 %. SIV byly měřeny při teplotách 20, 25 a 35 °C. Zjištění sušiny probíhalo na gravimetrických vahách. Data byla zpracována za použití MS Excel 2010. Struktura sušené syrovátky byla pozorována a zaznamenána mikroskopem USB Digital Microscope (20x-200x) V2.0.

Výsledky a diskuse

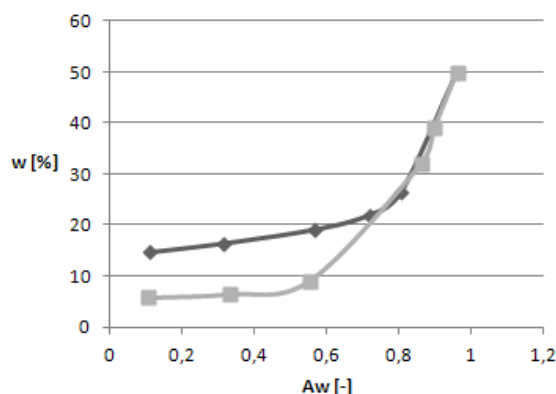
Jak je vidět na grafech 1, 2 a 3 rovnovážná vlhkost s rostoucí A_w při konstantní teplotě vzrůstala při adsorpci a při desorpci rovnovážná vlhkost klesala, což koresponduje se studií provedenou Štenclem *et al.* (2010). Při porovnání tří měřených teplot má sušená syrovátka při teplotě 25 °C nejnižší rovnovážnou vlhkost při 97% relativní vlhkosti.



Graf 1: SIV sušené syrovátky při 20 °C

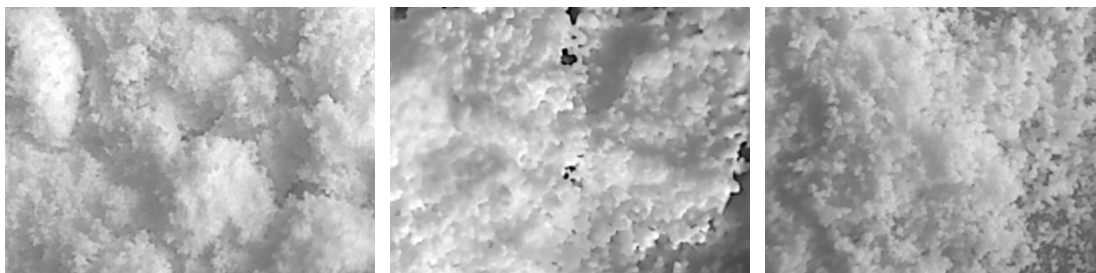


Graf 2: SIV sušené syrovátky při 25 °C



Graf 3: SIV sušené syrovátky při 35 °C

Na obrázcích 2 a 3 je patrná změna struktury sušené syrovátky vlivem adsorpce a desorpce vody vzhledem k sušené syrovátce na počátku (obrázek 1).



Obrázek 1: Suš. syrovátka (SŠ) na počátku

Obrázek 2: SŠ při 75% rovnovážné vlh. (adsorpce)

Obrázek 3: SŠ při 75 % rovnovážné vlh. (desorpce)

Závěr

Pro jednotlivé teploty byly určeny rovnovážné vlhkosti odpovídající kritické A_w a byly vytvořeny SIV sušené syrovátky, které vykazovaly sigmoidní tvar.

Kritická vlhkost při adsorpci sušené syrovátky odpovídající $A_w = 0,6$ při teplotě skladování $20\text{ }^\circ\text{C}$ je dle naměřených výsledků 6,5 %, teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$ odpovídá kritická vlhkost 10,0 % a při teplotě skladování $35\text{ }^\circ\text{C}$ je kritická vlhkost 19,5 %. Pro zamezení rozvoje mikroorganismů je tedy vhodné skladovat sušenou syrovátku pod tyto uvedené hodnoty.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Literatura

FOSTER, K.D.; BRONLUND, J.E.; PATERSON, A.H.J.T. The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *International Dairy Journal*. 2005, vol. 15, no. 4, s. 411-418.

LABUZA, T.P. *Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm, Measurement and Use*. 1. vyd. Minnesota : American Association of Cereal Chemists, 1984. 150 s. ISBN 0-913250-34-1.

ŠTENCL, J. Rovnovážné vlhkosti a sorpční izotermy potravin. *Potravinářská revue*. 2006a, no. 4., s. 49-51.

ŠTENCL, J. Vodní aktivita, významný současný parametr kvality potravin. *Potravinářská revue*. 2006b, no. 2, s. 48-50.

ŠTENCL, J.; JANŠTOVÁ, B.; DRAČKOVÁ, M. Effects of temperature and water activity on the sorption heat of whey and yogurt powder spray within the temperature range 20-40C. *Journal of Food Process Engineering*. 2010, vol. 33, no. 5, s. 946-961.

Kontaktní adresa: Jitka Langová, Ing., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11009@vfu.cz

Vliv MAP na vybrané parametry chlebu Effect of MAP on selected parameters of bread

Vlášek Václav, Langová Jitka

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Packaging is an important element of the barrier in food packaging. Its purpose is to keep the food in an isolated environment while maintaining the environment. But even in this closed system reactions take place that affect the food. That change is significant in foods with short shelf-life, which are suitable nutrient environment for microorganisms. The aim of the study was to examine the effect of modified atmosphere to reduce the development of micro-organisms in the sample wheat- rye bread and brown bread, was also intended to change the water activity and dry matter in the crust and crumbs associated with balancing moisture in the material around a closed environment. This bread was packed into the atmosphere, the atmosphere with carbon dioxide and nitrogen atmosphere and stored between 10 and 20°C. Samples were observed two times a week for 25 days, and material which is reflected mycoses, were calculated water activity and solids. For mould samples frequently observed characteristics occurring mold on bread.

Keywords: bread; water activity; mould; storage; modified atmosphere

Úvod

Pekárenské výrobky jsou svým složením rizikovou potravinou díky vysoké hodnotě vodní aktivity a specifickému chemickému složení, zejména to jsou cukry, které slouží jako vhodný substrát pro rozvoj mikroorganismů (Wasiu *et al*, 2001). Nejvýznamnějšími mikroorganismy podílejícími se na znehodnocení pekárenských výrobků jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopoda* (Tančinová *et al*, 2012). Dalším významným faktorem, který významně ovlivňuje jejich mikrobiologickou kontaminaci, je též způsob jejich dodávání a to zejména u chlebů, kdy bývají nejčastěji volně ložené a přístupné sekundární kontaminaci již od okamžiku výroby. Vhodnější způsob je jejich balení do primárních obalů, které zajišťují jejich částečnou ochranu (Gutierrez *et al*, 2011). Ovšem i v daném výrobku dochází k dějům, jimž nelze zcela zabránit. Je to kupříkladu jejich osychání a tím ztráta vlhkosti, která působí jako faktor snižující možnost rozvoje plísní a jiných mikroorganismů (Tančinová *et al*, 2012).

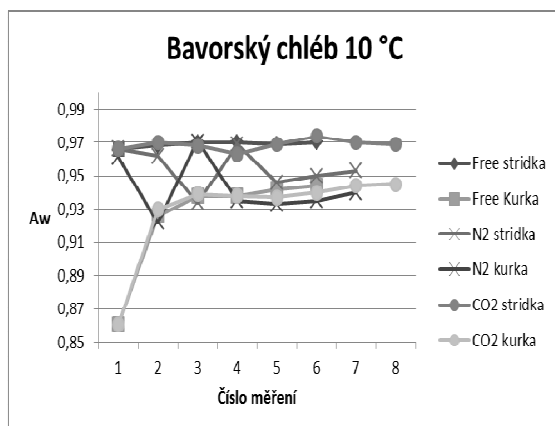
Proto se v dnešní době hledají možnosti, jak udržet potravinu co nejdéle zdravotně nezávadnou a zároveň pro spotřebitele atraktivní. Toho lze nyní částečně dosáhnout vhodně zvolenou atmosférou a skladovací teplotou. Stejně jako zvolením vhodného výrobku, který je možné skladovat bez újmy (Phimolsiripol *et al*, 2011).

Materiál a metodika

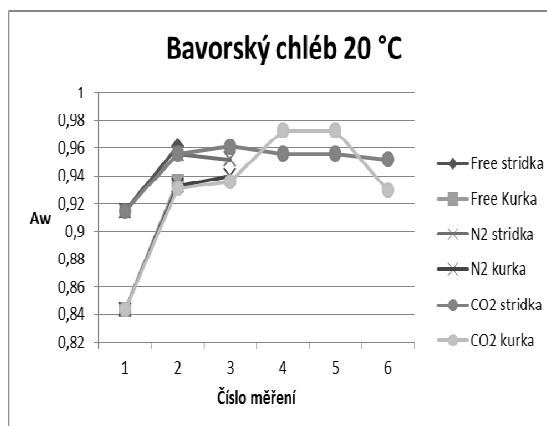
Vybrané výrobky byly zakoupeny v tržní síti a tentýž den nakrájeny na plátky, zváženy, zabaleny ve třech atmosférách (běžná atmosféra, atmosféra s oxidem uhličitým a atmosféra s dusíkem) a uloženy při dvou skladovacích teplotách (20 °C, tj. teplota běžná pro domácnost a 10 °C, tj. teplota obvyklá pro chladnější místa, kupříkladu spíže a sklepy). Následně probíhalo testování každého vzorku 2× týdně. Nejprve docházelo k subjektivnímu stanovení výskytu zaplísnění. V případě, že vzorek neobsahoval viditelné zaplísnění, byl vzorek rozbalen a vždy zvážen ke zjištění úbytku hmotnosti a následně

rozdělen na kůrku a střídku a podroben stanovení vodní aktivity a sušiny ve vzorcích. Pokud se vyskytlo zaplísnění u vzorku, vzorek byl fotograficky zaznamenán a plísně byly po skončení denního měření pozorovány mikroskopicky a za pomoci charakteristických znaků zařazeny.

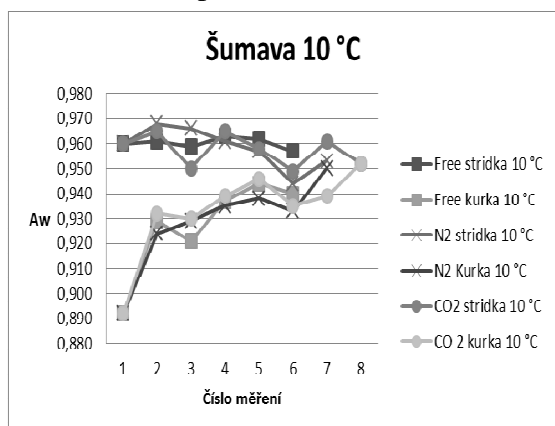
Výsledky a diskuse



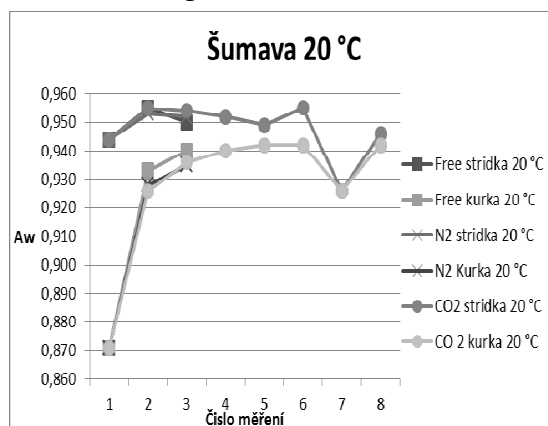
Graf 1: Změna Aw Bavorského tmavého chlebu při 10 °C



Graf 2: Změna Aw Bavorského tmavého chlebu při 20 °C



Graf 3: Změna Aw Šumavského světlého chlebu při 10 °C



Graf 4: Změna Aw Šumavského světlého chlebu při 20 °C

Pokud skladujeme chléb při 20 °C, tak se u světlého i tmavého chlebu začne velmi záhy objevovat zaplísnění, nejprve se objevují bílé plísně charakteristického vzhledu pro rod *Penicillium* a plísně se zeleným zabarvením rodu *Aspergillus*. Toto je patrné u chleba, který je balen ve volné atmosféře a atmosféře dusíku již po čtyřech dnech. Při teplotě 10 °C se toto zaplísnění projevuje po 18 dnech u běžné atmosféry a 21 dnech u atmosféry s dusíkem. Pozitivní vliv pro mikrobiální potlačení má rozhodně atmosféra oxidu uhličitého, která u světlého i tmavého pečiva dokázala potlačit rozvoj i v době posledního měření, tj. po 25 dnech skladování.

Zajímavý byl rozvoj plísně na tmavém pečivu, kdy na rozdíl od světlého pečiva projevoval vzorek tmavého pečiva i znaky plísně *Rhizopoda*, která má charakteristické oranžové zabarvení. Přítomnost této plísně je přisuzována tomu, že tmavý chléb

obsahuje i olejnatá semena, která k tomuto mikroorganismu jsou náchylnější a napomáhají přežívání tohoto mikroorganismu.

Vývoj vodní aktivity u kůrky a střídky byl nejlépe pozorovatelný u vzorků balených v oxidu uhličitém, protože tyto vzorky byly bez viditelné kontaminace. V průběhu celého měření měly hodnoty kůrky a střídky postupnou sblížující tendenci a k 25. dnu se lišily hodnoty A_w u světlého chleba již v pouhých tisícinách (při 20 °C - střídka 0,946; kůrka 0,942, při 10 °C - střídka 0,952; kůrka 0,952) a u tmavého chleba v hodnotách jedné až dvou setin (při 20 °C - střídka 0,951; kůrka 0,941, při 10 °C - střídka 0,963; kůrka 0,946). Podobná tendence byla viditelná i u sušiny výrobku.

Závěr

Modifikovaná atmosféra má významný vliv na údržnost pečiva. Při vhodné kombinaci modifikované atmosféry a teploty lze významně prodloužit údržnost potraviny, která tak déle dovede odolávat rozvoji plísní, i když její vodní aktivita je příznivá pro rozvoj mikroorganismů. Tento kombinovaný efekt ochrany potravin je velmi důležitým parametrem pro další výzkum a nalezení vhodné rovnováhy mezi používanými ochrannými opatřeními.

Výsledek může vést k ekonomické úspoře jak ze strany výrobce, tak i ze strany spotřebitele, pokud kombinovaná ochrana umožní prodloužit údržnost a příznivou estetiku daleko déle anebo pokud dovede snížit jiné potřebné faktory pro nyní delší udržení potraviny, které jsou energeticky náročné.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že zvolení vhodné atmosféry a čistota vstupní suroviny má významný vliv na prodloužení údržnosti koncového výrobku.

Dosažené výsledky jsou pouze dílčími hodnotami v probíhajícím experimentu.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Literatura

GUTIERREZ, L.; BATLLE, R.; ANDÚJAR, S.; SÁNCHEZ, C.; NERÍN, C. Evaluation of Antimicrobial Active Packaging to Increase Shelf Life of Gluten-Free Sliced Bread. *Packaging Technology and Science*. 2011, vol. 24, no. 8, s. 485-494.

PHIMOLSIRIPOL, Y.; SIRIPATRAWAN, U.; CLELAND, D.J. Weight loss of frozen bread dough under isothermal and fluctuating temperature storage conditions. *Journal of Food Engineering*. 2011, vol. 106, no. 2, s. 134-143.

TANČINOVÁ, D.; BARBORÁKOVÁ, Z.; MAŠKOVÁ, Z.; CÍSAROVÁ, M.; BOJŇANSKÁ, T. The occurrence of micromycetes in the bread samples and their potential ability produce mycotoxins. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*. 2012, vol. 1, no. 4, s. 813-818.

WASIU, A.O.A.; CLARA, R.B.O; FAKUNMOJU, B.B. Acceptability and chemical composition of bread from beniseed composite flour. *Nutrition & Food Science*. 2001, vol. 31, no. 6, s. 310-314.

Kontaktní adresa: Václav Vlášek, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10017@vfu.cz.

Hungarian honey

¹Vlkovič Daniel, ²Czipa Nikolett, ¹Vorlová Lenka

¹Department of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences
Brno

²Institute of Food processing, Quality Assurance and Microbiology, University of Debrecen

Summary

Due to the long-fluidity, mild flavour and low-pollen content the acacia honey belongs to one of the most popular types of honey. Hungary as a country with a very good landscape conditions, is one of the main producer and exporter of acacia honey. The aim of this study was to determine and compare the electrical conductivity with enzyme activity. Correlation analysis found strong correlation between electrical conductivity and enzymatic activity $r = 0.7218$ ($P < 0.01$). Increase of conductivity by 1 mS/m, resulted in increasing of enzymatic activity about 0.89 °Schade. This correlation is valid only for this particular set of samples. Because the samples were fresh and came mainly from beekeepers, the diastase activity was not affected by heating or long-term storage.

Keywords: acacia honey; diastase activity; electrical conductivity

Introduction

European Union participates approximately 20% on global honey production. The biggest European producers are Spain, Germany and Hungary. Apart from Bulgaria and Romania, Hungary is the main producer of acacia honey in Europe. In the Czech Republic, the acacia forests are found mainly in South Moravia around the town Mělník and in the Elbe lowland.

Robinia pseudoacacia tree is classified with other 30 kinds of plant to an invasive plant species list. In Hungary, acacia is found on the more than 300 000 hectares of soil. Due to the good climatic conditions and the intensive beekeeping, beekeepers can get up to 150 kg of acacia honey from a bee colony. Other significant honey sources in Hungary are sunflower and linden tree.

Acacia honeys are very popular with customers due to its composition and properties. They are pale to slightly yellowish in colour with a slight greenish tint, which is typical especially for pure acacia honey. Acacia honey has a strong sweet taste with a mild characteristic flavour due to extremely high levels of fructose. A very low content of pollen grains is caused by the specific position of acacia blossoms, therefore is suitable for the nutrition of children. Final taste of sweetened beverages is only little affected (Přidal, 2005). Mainly the ratio of glucose and fructose leads to prevention of crystallization even over several years. This predetermines the using of acacia honey in particular, where crystallization is a problem, such as production of portioned honey or processing of honey to tubes, where comes into consideration only the use of liquid honey or very good mixed (pasted honey). Acacia honey is characterized by very low values of electrical conductivity, but also one of the lowest enzyme activities (Švamberg, 2003).

Mainly due to higher mineral content honeydew honeys have a very high conductivity, which is distinguishes them from floral honeys. Conductivity of acacia honey moves around 12 to 20 mS/m (Mačička, 2007). In our group were samples of pure acacia

honey, but also acacia honey mixed with other kinds of honey, which can change the characteristics of honey. To what extent these additions alter the electrical conductivity and diastase activity, was the aim of this study.

Material and Methods

The study dealt with the analysis of Hungarian honey from beekeepers and market network. Is primarily focused on acacia honey, which is a typical generic honey of Hungary. According to the methods of the International Honey Commission were determined the legislative physico-chemical parameters (Bogdanov et al., 1997).

Results and Discussion

Electrical conductivity is a very good parameter for assessing whether this is indeed an acacia honey (Kaškonienė et al., 2010). In our sample the conductivity of honeys labelled as acacia ranged from 10.4 to 20.7 mS/m. Similar results were described in study Bertonecelj et al. (2011). It is obvious that even the honey in his samples contained a bigger or smaller addition of another types of honey. As the Přidal (2005) stated, electrical conductivity of pure acacia honey ranges to 12 mS/m. Enzyme activity ranged from 7.6 to 14.1 °Schade (DN-diastase number). We observed at samples a tendency to increase both parameters and their dependence on each other. As can be seen in Figure 1, curves of both parameters were very similar.

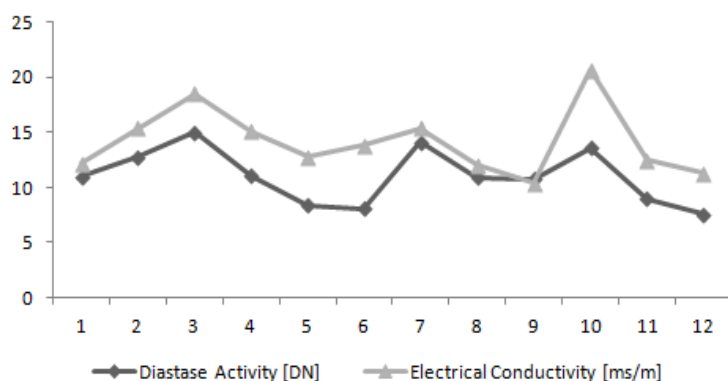


Figure 1: Dependence of electrical conductivity on the diastase activity

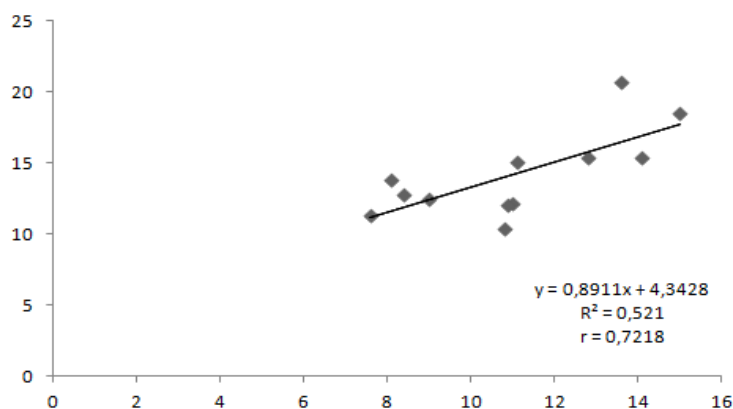


Figure 2: Regression analysis of the electrical conductivity and diastase activity

Regression analysis (Figure 2), shown a strong correlation relation between electrical conductivity and diastase activity $r = 0.7218$ ($P < 0.01$). The increase of conductivity by 1 mS/m, resulted in increasing of enzymatic activity about 0.89 °Schade. Because it were mainly fresh honeys from beekeepers, this relation can not be used for other honeys, because diastase is thermolabile and its activity decreases during storage (Consonni *et al.*, 2008), but the conductivity is relatively stable.

Conclusion

Twelve samples of acacia honeys were examined. The group included pure acacia honey and acacia honey mixed with other types of honey. The dependence of the samples was determined and performed by the regression analysis of the electrical conductivity and diastase activity. A strong correlation relation was found. Acacia honey has one of the lowest conductivity and enzymatic activity. Their properties and parameters will always be strongly influenced by admixture of a different kind of honey. The decision to what extent is still acacia honey, we can identify only through analysis, which include more parameters.

Acknowledgement

Special thanks to Dr. Nikolett Czipa from the University of Debrecen for the providing of samples, assistance and helpfulness during the practice at the Institute of Food Processing, Quality Assurance and Microbiology.

This work was financially supported by the research project MSM6215712402 Veterinary aspects of food safety and quality.

References

- BERTONCELJ, J., GOLOB, T., KROPF, U., KOROŠEC, M. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 46, p. 1661–1671.
- BOGDANOV, S., MARTIN, P., LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie Extra issue*, 1997, p. 1-59.
- CONSONNI, R., CAGLIANI, L. Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics. *JAFCS*. 2008, roč. 56, s. 6873 – 6880.
- KAŠKONIENĖ, V., VENSKUTONIS, P. R., ČEKŠTERYTĖ, V. Carbohydrate composition and electric conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT – Food Science and Technology*, 2010, vol. 43, no. 5, p. 801–807.
- MAČIČKA, M. 2007. Cesty k lepšímu odbytu medu – elektrická vodivost. *Včelár*, 2007, roč. 81, s. 150.
- PŘIDAL, A. *Včelí produkty*. dotisk 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005a. 102 s.
- ŠVAMBERK, V. Druhy medu na českém a evropském trhu. *Včelařství*, 2003, roč. 56, č. 8, s. 184-189.

Contact address: Daniel Vlkovič, MSc., Institute of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, danielvlkovic@gmail.com

Stanovenie antioxidantnej aktivity vybraných etanolových rastlinných extraktov

Determination of antioxidant activity of selected ethanol plant extracts

¹Bača Martin, ¹Marcinčák Slavomír, ²Marcinčáková Dana, ¹Máté Dionýz

¹Katedra hygieny a technológie potravín, ²Katedra farmakológie a toxikológie,
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Summary

The growing interest in the substitution of synthetic food antioxidants by natural ones has fostered research on vegetable sources. Antioxidative effects of ethanolic extracts of four plants and their combinations have been studied with the using of four *in vitro* assays. We used extracts of agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and red grapes (*Vitis vinifera*). The antioxidant activity was measured by DPPH reduction spectrophotometric assay and by modified TBARS assay. The total phenolic contents of extracts were measured by the Folin–Ciocalteu method and the total flavonoid content was determined according to the aluminum chloride colorimetric method. Extract of agrimony, lemon balm, red grapes and their combination exposed strong antioxidant activity (71,17 – 90,85 %) and the total phenolic compounds varied between (65,2 - 70,9 $\mu\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Results were different for each plant depending on the applied test. The extract from sage shows the lowest antioxidant activity (65,90 %) and total phenolic content (21,8 $\mu\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). The high correlation between antioxidant activity and total phenolic contents of extracts indicated that phenolic compounds were a major contributor of antioxidant activity of these plants.

Keywords: antioxidants; plants extracts; total phenolic contents

Úvod

Antioxidanty slúžia k ochrane kvality potravín, predovšetkým pred oxidáciou tukových zložiek potravín. Najčastejšie používané antioxidanty v súčasnosti sú BHT (butylhydroxy-toulén) alebo BHA (butylhydroxy-anizol). Dnešný konzument však preferuje pri potravinách používanie prírodných antioxidantov pred syntetickými. Mnoho rastlín a korenín má potenciálnu antioxidantnú aktivitu (Kitts a i., 2000). Preukázalo sa, že efektívne zloženie rastlinných extraktov bylín je spôsobené hlavne flavonoidmi, ktoré sú fenolickej povahy so silnou antioxidantnou aktivitou (Hossain a i., 2011). Celý rad štúdií ukázal, že antioxidantné vlastnosti týchto látok môžu chrániť proti artérioskleróze a srdcovým ochoreniam (Struch, 2000, Sun a i., 2002).

Cieľom našej práce bolo stanoviť antioxidantnú aktivitu, obsah celkových fenolov a obsah flavonoidov samostatných extraktov Repíka lekárskeho (*Agrimonia eupatoria* L.), Medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.), Šalvie lekárskej (*Salvia officinalis* L.), Červeného hrozna (*Vitis vinifera*) a ich vzájomných kombinácií.

Materiál a metodika

Komerčné práškové etanolové extrakty rastlín šalvia lekárska - *Salvia officinalis* L., repík lekársky - *Agrimonia eupatoria* L., medovka lekárska - *Melissa officinalis* L., červené hrozno - *Vitis vinifera* L. boli zakúpené od firmy Calendula, a.s. (Nová Ľubovňa, Slovensko). Ako extrahovadlo na extrakciu účinných zložiek z jednotlivých rastlín bol firmou Calendula a.s. použitý 50 resp. 40 % etanol. Na extrakciu bola u repíka a medovky použitá vňať rastliny, u šalvie listy rastliny a u hrozna vylisované

šupky červeného hrozna. Z jednotlivých práškových extraktov rastlín sme pripravili zásobné roztoky o koncentrácii 0,2 % rozpustením 0,2 g extraktu v 100 ml etanolu. Taktiež boli pripravené ich vzájomné kombinácie v pomere 1:1 o výslednej koncentrácii 0,2 %. Takto nariadené roztoky boli použité na ďalšie stanovenie. Následne bola stanovená antioxidačná aktivita spektrofotometrickou metódou redukcie DPPH· radikálu podľa Heilerova a i. (2003) a modifikovanou metódou TBA (Miquel a i., 2004).

Koncentrácia celkových fenolov bola stanovená testom Folin-Ciocalteu (Singleton a i., 1999). Celkový obsah flavonoidov bol stanovený spektrofotometricky s použitím chloridu hlinitého podľa metódy opísanej Kim a i. (2002).

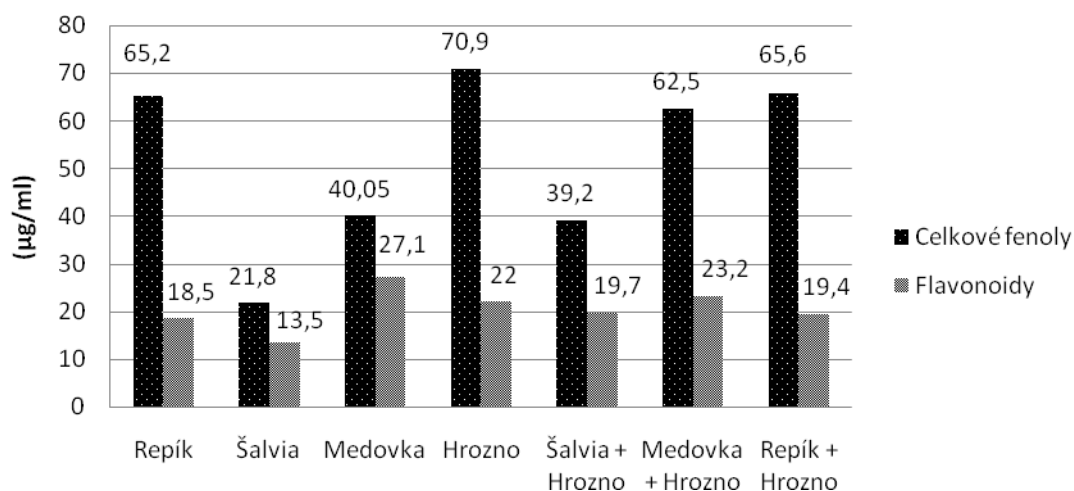
Výsledky a diskusia

Antioxidačná aktivita rastlinných extraktov závisí od zloženia extraktu a metódy stanovenia (Wong a i., 2006). Výsledky stanovenia antioxidačnej aktivity etanolových extraktov rastlín sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Antioxidačná aktivita extraktov pri metóde DPPH· radikálu a modifikovanej TBA metóde

Extrakt	Antioxidačná aktivita %	
	DPPH	TBA
Repík	90,85 ± 0,31	42,47 ± 1,04
Šalvia	65,90 ± 0,71	16,35 ± 4,94
Medovka	85,43 ± 1,16	79,58 ± 2,52
Hrozno	71,17 ± 0,72	66,44 ± 2,34
Šalvia + Hrozno	73,29 ± 2,84	44,37 ± 3,01
Medovka + Hrozno	74,77 ± 0,38	63,40 ± 4,27
Repík + Hrozno	79,84 ± 1,18	64,11 ± 3,80

Najvyššiu antioxidačnú aktivitu pri oboch metódach vykazuje medovka a hrozno. Pri metóde DPPH· radikálu majú extrakt veľmi vysokú účinnosť, nad 70 %. Extrakt šalvie dosiahol najnižšiu antioxidačnú aktivitu pri oboch metódach, čo súvisí s najnižšími hodnotami celkových fenolov a flavonoidov (graf č.2).



Graf 1: Množstvo celkových fenolov a flavonoidov vyjadrené v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ extraktu

Avšak v kombinácii s hroznom sa účinnosť šalvie zvyšuje, na rozdiel od ostatných kombinácii, kde dochádza k poklesu. Negro a i. (2003) potvrdzuje vysokú antioxidačnú aktivitu hrozna, ktorú taktiež spája s obsahom celkových fenolov.

Výsledky stanovenia celkových fenolov a flavonoidov udáva graf č. 1. Najvyššie hodnoty dosiahli extrakty repíka, hrozna a kombinácie hrozna s repíkom a medovkou ($62,5 - 70,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Extrakt medovky vykazuje najvyššie zastúpenie flavonoidov ($27,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) k celkovým fenolom ($40,05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Môžeme konštatovať, že fenolové zložky ako flavonoidy, majú zásadný vplyv na antioxidačnú aktivitu (Rockenbach a i., 2011, Alonso a i., 2002).

Pod'akovanie

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantového projektu VEGA č. 1/0648/11.

Literatúra

Alonso, A. M. Determination of antioxidant activity of wine by-products and its correlation with polyphenolic content. In *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 21, 5832–5836.

Heilerová, L. a i. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Oreganum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA– Based Biosensor. In *Czech J. Food Sci.* 2003, 21, 2, 78 – 84.

Hossain, M. A. a i. In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetragastrum* from Sabah. In *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2011, 4, 9, 717–721.

Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, Ch.Y. Antioxidant capacity phytochemicals from various cultivars of plums. In *Food Chem.* 2003, 81, 321 – 326.

Kitts, D. D. a i. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. In *Mol. Cell. Biochem.* 2000, 203, 1-2, 1 – 10.

Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho, L. Composition and antioxidant activities of essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. In *Food Chem.* 2004, 86, 183 – 188.

Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. In *Bioresource Technology Volume.* 2003, 87, 1, 41–44.

Rockenbach, I. I. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. In *Food Research International.* 2011, 44, 4, 897–90.

Singleton, V. I., Ortofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology.* 1999, 299, 152 – 178.

Struch, R. Wine and cardiovascular disease. In *Food Res. Int.* 2000, 333, 4, 219–223.

Sun, A.Y. a i. The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. In *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 324, 314–318.

Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. In *Food Chemistry.* 2006, 99, 775–783.

Kontaktná adresa: Martin Bača, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81, Košice, mvdrcaca.martin@gmail.com

Porovnanie citlivosti metódy STAR a NAT testu na stanovenie beta-laktámových a aminoglykozidových antibiotík

Comparison of the sensitivity of STAR method and NAT test to detection beta-lactam and aminoglycoside antibiotics

Gondová Zuzana, Kožárová Ivona

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra hygieny a technológie mäsa

Summary

The subject of our study was to compare the detection sensitivity (LOD) of two microbial inhibition tests (MIT), a screening test for antibiotic residues (STAR) and Nouws Antibiotic Test (NAT) for four beta-lactams antibiotics: oxacilin (OX), cloxacilin (CLX), ampicilin (AMP) and amoxicilin (AMX), and four aminoglycoside antibiotics: streptomycin (STR), gentamycin (GN), neomycin (NM) and kanamycin (KN). The LOD of both MITs to BL and AMG antibiotics were based on the detection of the lowest concentration of antibiotic which completely inhibited the growth and multiplication of the respective test strain of MIT. Based on our results we can concluded that the LOD of the STAR with the test strain *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 was at the level of maximum residue limit (MRL) for all BL antibiotics, but the LOD of *Bacillus subtilis* BGA to AMG antibiotics was not at the level of MRL for KN, NM and GN. In the case of NAT test, the LOD of *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 to BL antibiotics was at the level of MRL, but the LOD of *Bacillus subtilis* BGA to AMG antibiotics was not at the level of MRL only for KN.

Keywords: beta- lactams; aminoglycosides; STAR; NAT

Úvod

Beta-laktámové a aminoglykozidové antibiotiká (ATB) sa bežne používajú v humánnej a vo veterinárnej praxi na liečbu rozličných ochorení zvierat a ľudí. Avšak použitím ATB u potravinových zvierat vznikajú v živočíšnych tkanivách rezíduá, čo prináša riziko ohrozenia verejného zdravia. Kontrola rezíduí veterinárnych liekov u zvierat a v ich živočíšnych produktoch je v SR legislatívne pokrytá zákonom NR SR č. 39/2007 Z. z. v znení neskorších predpisov a nariadením vlády SR č. 320/2003 Z. z. Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie 2002/657/ES. V súčasnosti sú pre prvotný screening rezíduí schválené platňová metóda (STAR) a liekovkové testy (PREMI[®]TEST, KALIDOS TB, MP a ECLIPSE 50). Metóda STAR využíva päť testovacích kmeňov (*B. subtilis*, *K. rhizophila*, *B. cereus*, *E. coli* a *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*), každý citlivý na inú skupinu ATB. NAT predstavuje nový testovací systém taktiež využívajúci päť testovacích kmeňov: *B. cereus*, *Y. ruckeri*, *K. rhizophila*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, s rôznou citlivosťou na ATB. Vzhľadom na rozdielnosť pracovných postupov pri použitých metódach sa prezentovaná práca zaoberá zhodnotením a porovnaním detekčnej citlivosti metódy STAR a NAT testu na AMG a BL antibiotiká na základe hodnotiaceho kritéria – detekčný limit metódy (LOD). LOD oboch metód sme porovnávali s maximálnymi limitmi rezíduí určenými pre jednotlivé látky zo skupiny BL a AMG antibiotík nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010.

Materiál a metodika

Použili sme štandardné roztoky CLX, OX, AMP, AMX, STR, GN, NM, KN o koncentrácii $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pre pracovné roztoky sme použili koncentrácie 100; 200; 300; 400; 500 a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre CLX a OX a 30; 40; 50; 100; 200; 300 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre AMP a AMX, 500; 750; 1000 a $1100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre STR, 90; 100; 200 a $300 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre NM, 40; 50; 60 a $70 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre GN a 300; 400; 500 a $600 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pre KN. Testovacie kmene a kultivačné médiá boli pripravené podľa postupov uvedených v Zozname úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív – metóda STAR (CH 12.19, 2006) a pre NAT test podľa autorov Pikkemaat a i. (2008). Pri metóde STAR sme použili médium s *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 s koncentráciou 5×10^6 spór. ml^{-1} a *B. subtilis* BGA s koncentráciou 5×10^4 spór. ml^{-1} . Na disky sme inokulovali 30 μl CLX, OX, AMP, AMX, STR, NM, GN a KN a platne inkubovali podľa postupu. Pri metóde NAT bolo použité médium s *K. rhizophila* ATCC 9341 (10^6 KTJ. ml^{-1}) a *B. subtilis* BGA (10^5 KTJ. ml^{-1}). Na disky bolo aplikované 100 μl CLX, OX, AMP, AMX, STR, NM, GN a KN spolu s 200 μl platňovo špecifického tlmivého roztoku K_2HPO_4 (OX, CLX, AMP a AMX) a 100 μl Tris tlmivého roztoku (STR, NM, GN a KN). Inkubácia platní prebiehala pri teplote $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 16-18 hodín.

Výsledky a diskusia

Veľkosť inhibičných zón (IZ) bola pri metóde STAR meraná od okraja papierového disku po vonkajší okraj IZ a pri metóde NAT ako celý priemer IZ. Zistené IZ vytvorené reziduálnymi koncentráciami štandardov pre metódu STAR a NAT sú prezentované v tabuľkách 1 - 4.

Tabuľka 1: Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentráciami štandardu CL, OX, AMP a AMX pri metóde STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149

$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	100	200	300 (MRL)	400	500	1000
CLX	10,27 \pm 1,28	12,95 \pm 1,57	13,65 \pm 0,69	14,56 \pm 0,87	15,45 \pm 0,60	16,68 \pm 0,48
OX	16,23 \pm 1,21	16,68 \pm 1,19	16,01 \pm 0,58	15,35 \pm 0,51	15,78 \pm 0,62	16,57 \pm 0,55
$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	30	40	50 (MRL)	100	200	300
AMP	4,96 \pm 0,52	5,31 \pm 0,48	7,33 \pm 0,49	8,96 \pm 0,92	11,09 \pm 0,87	10,95 \pm 0,81
AMX	11,43 \pm 1,0	12,23 \pm 1,07	13,19 \pm 0,73	13,88 \pm 0,84	14,43 \pm 0,99	16,37 \pm 1,17

Tabuľka 2: Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentráciami štandardu CLX, OX, AMP a AMX pri metóde NAT s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	100	200	300 (MRL)	400	500	1000
CLX	32,62 \pm 1,42	35,65 \pm 2,35	34,69 \pm 1,14	34,41 \pm 1,70	34,87 \pm 1,53	34,84 \pm 1,16
OX	32,73 \pm 3,12	32,94 \pm 1,56	34,24 \pm 1,49	34,14 \pm 0,81	33,12 \pm 1,17	34,45 \pm 1,50
$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	30	40	50 (MRL)	100	200	300
AMP	31,75 \pm 2,41	32,27 \pm 1,5	33,06 \pm 1,06	33,49 \pm 1,72	30,29 \pm 1,67	28,53 \pm 0,39
AMX	33,76 \pm 2,21	35,06 \pm 0,7	35,62 \pm 0,715	36,05 \pm 1,24	33,41 \pm 2,9	34,37 \pm 1,04

Z pohľadu MRL stanovených pre jednotlivé látky zo skupiny BL antibiotík konštatujeme, že pri oboch MIT bola zaznamenaná detekčná citlivosť testovacích kmeňov na všetky sledované látky nielen v hladinách záujmu, ale aj v koncentráciách nižších, ako sú stanovené MRL.

Tabuľka 3: Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu STR, KN, GN a NM pri metóde STAR s testovacím kmeňom *Bacillus subtilis* BGA

$\mu\text{g.l}^{-1}$	300	400	500 (MRL)	750	1000	1100
STR	-	-	1,34±0,25	2,27±0,84	3,91±1,35	3,19±0,63
$\mu\text{g.l}^{-1}$	100 (MRL)	200	300	400	500	600
KN	-	-	1,77±0,53	1,46±0,17	1,99±0,63	1,96±0,48
$\mu\text{g.l}^{-1}$	20	30	40	50 (MRL)	60	70
GN	-	-	-	-	2,19±0,22	2,07±0,19
$\mu\text{g.l}^{-1}$	90	100	200	300	400	500 (MRL)
NM	-	-	-	1,28±0,13	1,43±0,56	1,92±0,34

Pri KN sme nezaznamenali tvorbu IZ pri žiadnej zvolenej koncentrácii (Tabuľka 3).

Tabuľka 4: Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu STR, GN a NM pri metóde NAT s testovacím kmeňom *Bacillus subtilis* BGA

$\mu\text{g.l}^{-1}$	300	400	500 (MRL)	750	1000	1100
STR	-	-	17,91±0,19	18,32±2,27	18,45±2,22	17,74±2,38
$\mu\text{g.l}^{-1}$	20	30	40	50 (MRL)	60	70
GN	-	-	20,45±1,17	20,91±1,19	20,52±1,13	22,19±1,74
$\mu\text{g.l}^{-1}$	90	100	200	300	400	500 (MRL)
NM	-	-	-	18,93±0,86	19,02±0,91	19,56±0,38

Pri metóde STAR s testovacím kmeňom *B. subtilis* BGA bola zaznamenaná detekčná citlivosť pre STR na úrovni MRL, ale pre GN a KN detekčná citlivosť v hladinách záujmu nebola zaznamenaná. Pri metóde NAT sme detekčnú citlivosť pre KN nezaznamenali na žiadnej úrovni.

Pod'akovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠ SR č. 1/0939/12.

Literatúra

CH 12.19: Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. In *Vestník MP SR, Doplnok č.1/2006*, 38, 2006, p.68 - 81.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010, o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácií, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. In *Úradný vestník EÚ L 15/64*, 2010, p.1 - 72.

NARIADENIE VLÁDY SLOVENSKEJ REPUBLIKY z 9. júla 2003 č. 320 o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu. In *Zbierka zákonov č. 320/2003, čiastka 145*, 2003, p.2541 - 2585.

PIKKEMAAT, M. G., a i. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT- screening). In *Food Control*, 2008, 19, 8, p. 781 - 789.

ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/ES, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. In *Úradný vestník EÚ L 221*, 17. 8. 2002, p. 8 - 36.

ZÁKON NÁRODNEJ RADY SLOVENSKEJ REPUBLIKY č. 39/2007 Z. z. z 12. decembra 2006 o veterinárnej starostlivosti. In *Zbierka zákonov č. 39/2007, čiastka 28*, p. 162 - 223.

Kontaktná adresa: Zuzana Gondová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, zuzana.gondov31@gmail.com

Faktory ovlivňující *qac* geny zprostředkovanou resistencí vůči kvartérním amoniovým sloučeninám

Factors influencing *qac* genes mediated resistance to quarternary ammonium compounds

Červinková Dana, Jaglič Zoran, Vladimír Babák

Veterinary Research Institute, Brno

Summary

The relative expression of the target genes *qacA* (resistance to quarternary ammonium compounds) and *norA* ("multidrug efflux") under the pressure of antiseptic was studied in *Staphylococcus aureus* SK982 by RT-qPCR. Antiseptics benzalkonium chloride (BAC) and chlorhexidine (CHX) were tested individually and in combinations. *S. aureus* was incubated either in the presence of antiseptics until reached the mid-exponential phase of growth or in the mid-exponential phase was exposed to antiseptics for 30 min. A significantly increased transcription of the *qacA* transcription was observed when bacteria in the mid-exponential phase of growth were exposed to 9,76 µg/ml. This concentration was 4-times higher than its minimum inhibitory concentration (2,44 µg/ml). CHX increased the *qacA* expression only in combination with BAC. Changes in the *norA* expression were insignificant regardless of the conditions tested. The *qac*-mediated resistance to BAC is strongly affected by conditions under which bacteria are exposed to this antiseptic.

Keywords: *qac*; resistance; disinfection; cationic detergents; expression; real-time quantitative PCR

Úvod

Fenomén antimikrobiální resistance byl původně popsán u antibiotik a chemoterapeutik. V poslední době je však pozorována zvýšená resistance i k dalším antimikrobiálním látkám, jako jsou např. dezinfekce a antiseptika. Některé studie prokázaly, že různé bakteriální druhy (např. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae*) jsou schopné přežít čištění a dezinfekci (např. Sharma a Anand, 2002). Kvartérní amonné sloučeniny (QAC) jsou běžně používány k dezinfekci potravinářských provozů, nemocničních prostředí, ale i jako součást léčiv (např. oční kapky, ústní voda, apod.). Jedná se o povrchově aktivní látky, mezi jejichž hlavní výhody patří vysoká stabilita, nízká korozivita a relativně nízká toxicita (Patarca a kol., 2000). Heir a kol. (1999) jako první popsali *qac* geny jako genetické determinanty resistance ke QAC. Nicméně role *qac* genů ještě nebyla zcela objasněna. Například, přestože *qac* geny se jmenují podle jejich hlavního substrátu (QAC), je známo, že kódují resistenci i k dalším kationovým složkám jako jsou např. rhodamin, ethidium, krystalová violet a berberin (Theis a kol., 2007). Navíc Smith a kol. (2008) pozorovali, že minimální baktericidní koncentrace QAC byly u izolátů *Staphylococcus aureus* nesoucích *qac* geny pouze mírně vyšší než u negativních izolátů. Dále u *nor* genů kódujících resistenci k fluorochinolonom bylo zjištěno, že také kódují resistenci i k některým antiseptikům, a že mají dokonce podobné substráty jako *qac* geny. Dnes se *qac* a *nor* geny označují jako součást tzv. 'multidrug efflux pump' systémů (Theis a kol., 2007). Toto vše pravděpodobně naznačuje úzké propojení mezi resistencí k antibiotikům a dezinfekčním látkám. Proto první krok ve snaze redukovat resistenci

k QAC spočívá v identifikaci a charakterizaci podmínek usnadňujících její vznik a šíření.

Materiál a metody

V této studii jsme použili referenční kmen *Staphylococcus aureus* SK982 (DSM 9385) obsahující plasmid pSK1 nesoucí *qacA* gene kódující resistenci ke QACs. Testovali jsme dvě chemicky odlišné povrchově aktivní látky: benzalkonium chlorid ze skupiny QACs a chlorhexidine ze skupiny biguanidů.

1. Růst S. aureus v přítomnosti BAC a CHX

Bakterie ve finální koncentraci $1,5 \times 10^5$ CFU/ml byly inkubovány na třepačce v 10 ml Brain Heart Infusion (BHI) obsahující BAC, CHX nebo směs BAC a CHX, při 37 °C po dobu 8 hodin, kdy kultura dosáhla střední exponenciální fáze. Testované koncentrace odpovídaly u BAC 1,22 µg/ml a u CHX 0,31 µg/ml, jak v případě kdy byly látky testovány samostatně, tak i v kombinaci. Tyto koncentrace byly nejvyšší koncentrace, které neinhibovaly bakteriální růst během prvních 8 hodin inkubace v porovnání s negativní kontrolou. Po 8 hodinách byla izolována RNA z 500 µl bakteriální kultury.

2. Exposice 8 hodinové kultury k BAC

Po 8 hodinové inkubaci na třepačce bylo k 9,9 ml bakteriální kultury v BHI přidáno 100 µl roztoku BAC. Testované koncentrace BAC byly 1,22 a 9,76 µg/ml a jejich expoziční doba byla 30 minut při 37 °C, následně byla izolována RNA z 500 µl bakteriální kultury. Koncentrace 9,76 µg/ml byla nejvyšší koncentrace BAC, která během 30 minut inkubace výrazně neovlivnila počet CFU v porovnání s negativní kontrolou.

RNA byla izolována pomocí NucleoSpin RNA II kitu (Macherey-Nagel), dle doporučení výrobce. Relativní exprese byla sledována pomocí real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Transkripce cílových genů kódující efflux antimikrobiálních látek (*qacA* a *norA*) byla normalizovaná geometrickým průměrem referenčních genů *gyrB* a *gmk*. Relativní exprese byla vypočítána na základě $\Delta\Delta C_t$ metody s korekcí efektivity amplifikace.

Výsledky a diskuze

1. Růst S. aureus v přítomnosti BAC a CHX

Pozorovali jsme zvýšenou expresi *qacA* genu v přítomnosti samotného BAC, ale výsledky byly na hranici statistické významnosti. Samotný CHX jen nepatrně zvyšuje expresi *qacA*, ale v kombinaci s BAC byla pozorována vyšší exprese *qacA*, než jen v přítomnosti samotného BAC. Změny v expresi genu *norA* nebyly signifikantně významné v žádné z testovaných podmínek.

2. Exposice 8 hodinové kultury k BAC

Významně zvýšená transkripce *qacA* genu byla pozorována, když byly bakterie v střední exponenciální fázi růstu vystaveny koncentraci 9,76 µg/ml BAC. Tato koncentrace byla 8x vyšší než koncentrace umožňující bakteriální růst během prvních 8 hodin inkubace (1,22 µg/ml). Za testovaných podmínek nebyly změny v expresi genu *norA* signifikantně významné.

Přestože *qac* geny byly považovány za významné genetické determinanty resistance ke QACs a monitorovali je mnoho autorů (např.: Bjorland a kol., 2005; Heir a kol., 1999), jejich praktický význam nebyl ještě zcela objasněn. Nízký nebo žádný rozdíl v citlivosti

k QACs mezi *qac* pozitivními a *qac* negativními bakteriemi různých druhů byl publikován několika autory (Jaglic a kol., 2012; Kucken a kol., 2000; Smith a kol., 2008). Jedním z vysvětlení může být fakt, že *qac* zprostředkovaná resistance zaměřená k širokému spektru různých kationtových sloučenin (Hassan a kol., 2006) se vylučuje s vyšším stupněm resistance vůči QACs. I když minimální inhibiční koncentrace BAC byla 2,44 µg/ml, bakteriální kultury ve střední exponenciální fázi růstu tolerovali 4x vyšší koncentraci tohoto antiseptika (9,76 µg/ml). Toto zjištění naznačuje, že fáze bakteriálního růstu hraje významnou roli v expresi resistance vůči QACs. Dále jsme pozorovali, že CHX v kombinaci s BAC zvýšil *qacA* expresi, což ukazuje na možné synergické působení těchto chemických látek. Ve všech testovaných podmínkách nebyl gen *norA* významně exprimován navzdory tomu, že Theis a kol. (2007) naznačili možnou interferenci mezi *nor* a *qac* geny.

Závěr

Resistance k BAC zprostředkovaná *qac* geny je silně ovlivněna podmínkami, za kterých jsou bakterie vystaveny těmto antiseptikům. Pouhá přítomnost *qac* genů nemusí nutně znamenat zvýšenou resistenci, která by mohla být významná pro praxi.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky (projekt MZe0002716202) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt 2B08074 a AdmireVet CZ 1.05/2.1.00/01.0006 – ED0006/01/01).

Literatura

- BJORLAND, J.; STEINUM, T.; KVITILE, B.; WAAGE, S.; SUNDE, M.; HEIR, E. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of ovine and caprine origin in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, vol. 43, no. 9, p. 4363-4368.
- HASSAN, K. A.; GALEA, M.; WU, J.; MITCHELL, B. A.; SKURRAY, R. A.; BROWN, M. H. Functional effects of intramembranous proline substitution in the staphylococcal multidrug transporter QacA. *Fems Microbiology Letters*. 2006, vol. 263, no. 1, p. 76-85.
- HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. Identification and characterization of quarternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 48, no. 3 p. 211-219.
- JAGLIC, Z.; CERVINKOVA, D.; VLKOVA, H.; MICHU, E.; KUNOVA, G.; BABAK, V. Bacterial biofilms resist oxidising agents due to presence of organic matter. *Czech Journal of Food Sciences*. 2012, vo. 30, no. 2, p. 178-187.
- KUCKEN, D.; FEUCHT, H. H.; KAULFERS, P. M. Association of *qacE* and *qacE* Delta 1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *Fems Microbiology Letters*. 2000, vo. 183, no. 1, p. 95-98.
- PATARCA, R.; ROSENZWEIG, J. A.; ZUNIGA A. A., FLETCHER M. A. Benzalkonium salts: effects on G protein-mediated processes and surface membranes. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2000, vol. 11, no. (3&40), p. 255-305.
- SHARMA, M.; ANAND S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*. 2002, vol. 19, no. 6, p. 627-636.
- SMITH, K.; GEMMELL, C. G.; HUNTER, I. S. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, vol. 61, no. 1, p. 78-84.
- THEIS, T.; SKURRAY, R. A.; BROWN, M. H. Identification of suitable internal controls to study expression of *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, vol. 70, no. 2, p. 355-362.

Kontaktní adresa: Dana Červinková, Mgr., Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100 Brno, H08356@vfu.cz

Useful tools in revealing *Salmonella* outbreaks

¹Pospíšilová Petra, ^{2,4}Karpíšková Renáta, ³Dědičová Daniela, ²Jakubcová Lea

¹Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

²Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum laboratorních činností Brno

³Státní zdravotní ústav, Praha, Národní referenční laboratoř pro salmonely

⁴VFU - FVHE

Summary

The objective of this study was to confirm possibly epidemic strains of *Salmonella* Indiana using both phenotypic and genotypic methods and at the same time distinguish the epidemic isolates from different clones of the same serotype.

Keywords: *Salmonella* Indiana; outbreak; PFGE; serotyping

Introduction

Although the number of illnesses caused by the genus *Salmonella* has been decreasing, 8,752 cases in 2011 (EPIDAT) in the Czech Republic show that thorough studies of *Salmonella* outbreaks still remain indispensable. Salmonellosis is a zoonosis which means there should be a link between strains detected in animals, food-stuffs and humans.

S. Enteritidis and *S. Typhimurium* are the most frequently detected serotypes in the Czech Republic, in total accounting for 92-94% of cases of salmonellosis (EPIDAT). Each year approximately 80-100 other serotypes are diagnosed, however, their occurrence is rare (EPIDAT). Most cases are considered as sporadic infections; however, if there are more cases of salmonellosis caused by these rare serotypes reported in the same location and period of time, it may indicate an epidemic. In Europe, an international outbreak was described in 2008, caused by a rare serotype *S. Urbana*. Several European countries including the Czech Republic were affected (Rimhanen-Finne *et al.*, 2010). In these cases the use of molecular methods is often the most important part of the investigation.

The objectives of this study were to describe a set of possibly epidemic strains of *Salmonella* Indiana and to confirm or refute their relatedness.

Material and Methods

Isolates

Salmonella strains were obtained from hospitals and regional clinical laboratories in Brno, 4 strains were isolated from human fecal samples (Figure 2) and 3 were isolated from retail chicken meat obtained from 3 different slaughterhouses (Figure 3).

Serotyping

Salmonella isolates were serotyped according to the antigenic scheme for *Salmonella* (Grimont and Weill, 2007) using Denka Seiken and BioRad serums.

Antimicrobial susceptibility test

The set of *Salmonella* Indiana strains was also tested to the effect of antimicrobials. The disc diffusion method was the method of choice, using Oxoid antimicrobial discs. The set of antimicrobials used in this study together with their concentrations are shown in Figure 1.

Pulsed-field gel electrophoresis

PFGE was carried out according to the PulseNet protocol. In this study we used the *XbaI* restriction enzyme. PFGE patterns were compared by BioNumerics software.

Figure 1: Antimicrobials and their concentration used for DDM

Antimicrobial	Concentration (µg)	Antimicrobial	Concentration (µg)
Ampicilin	10	Sulfonamides	300
Amoxycilin	30	Sulfamethoxazole	25
Cefotaxime	30	Trimethoprim	5
Chloramphenicol	30	Tetracycline	30
Streptomycin	10	Nalidixic acid	30
Kanamycin	30	Ciprofloxacin	5
Gentamycin	10	Enrofloxacin	5
Neomycin	30	Colistin	10
Apramycin	15		

Results

All results are summarized in Figure 2 (human isolates) and Figure 3 (food-stuff isolates).

Figure 2: Results for human isolates

Isolate	Year of isolation	Antigenic formula	Antimicrobial susceptibility	PFGE profile
1	2012	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-1
2	2012	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-1
3	2012	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-1
4	2008	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-2

Figure 3: Results for food-stuff isolates

Isolate	Year of isolation	Slaughterhouse	Antigenic formula	Antimicrobial susceptibility	PFGE profile
1	2012	A	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-1
2	2012	B	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-3
3	2009	C	O:4,12 H1:z H2:1,7	Susceptible	Xba-1

Discussion and Conclusions

Our results show serotyping is not a sufficient method to reveal a *Salmonella* outbreak caused by a rare serotype. Even though all our strains shared the same serotype Indiana, not all of them were related. Even the test of antimicrobial susceptibility was not determinative as all the strains were fully susceptible. The only method which reliably showed the relationship was the pulsed field gel electrophoresis, which showed 3 different profiles. Out of 4 human strains 3 showed identical profile and at the same time shared profile with 1 recent food-stuff isolate (slaughterhouse A) and one archival (slaughterhouse C). On the other hand the 1 historical human isolate and 1 archival food-stuff isolate (slaughterhouse B) evinced unlike from each other and from the rest of the isolates.

Thorough typing of *Salmonella* strains is necessary to detect possible outbreaks and combination of phenotypic and genotypic methods is essential for successful confirmation of these outbreaks. Even though all our 7 isolates seemed to be same regarding their rare serotype, the PFGE proved different. The genotypic method was able to distinguish 3 different pulse profiles showing uniformity of 3 human cases and 1 food-stuff isolate from the same area of the Czech Republic and 1 archival food-stuff isolate from different slaughterhouse.

Acknowledgements

This project was supported by the research project MSM6215712402.

References

EPIDAT. Available: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>

GRIMONT P; WEILL F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007.

RIMHANEN-FINNE, R.; LUKINMAA, S.; MARTELIUS, T.; ROSSOW, H.; KARPÍŠKOVÁ, R.; DEDICOVA, D.; GALAJEVA, J.; BORMANE, A.; SIITONEN, A.; KUUSI, M. Cases of *Salmonella* Urbana in Finland, the Czech Republic and Latvia, January-February 2010. *Eurosurveillance* [online]. 2010, vol. 15, no. 11, [cit. 2012-03-06]. Available: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19511>

Contact address: Petra Pospíšilová, Mgr., Department of Experimental Biology, Faculty of Science, MU Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno, pospisilova.petra@mail.muni.cz

Bakterie rodu *Arcobacter* a jejich přežívání v nápojích

Bacteria of the genus *Arcobacter* a their survival in beverages

¹Šilha David, ²Vytrásová Jarmila, ¹Beňová Blanka

¹Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

²Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Summary

This study focuses on a possible inhibitory effect on survival of the genus *Arcobacter* based on various concentrations of ethanol and five tested kinds of beer.

The determinations were made using several representative arcobacters. For most of these, a concentration of 10% ethanol was determined to be the minimum inhibitory concentration (MIC). Also the survival of arcobacters in a laboratory-prepared model stomach was examined and subsequently the definite volume of beer was added in the model stomach system. Complete inactivation of all monitored arcobacters was usually detected within 10 min. The results are compared with values of antioxidative activity determined.

Keywords: *Arcobacter* spp.; beer; antioxidant activity; inactivation; model stomach; HPLC-ECD

Úvod

Rod *Arcobacter* byl poprvé popsán v roce 1991, dříve tyto bakterie patřily do rodu *Campylobacter* [Vandamme *et al.*, 1991]. Arkobaktery jsou aerotolerantní a rostou při nižších teplotách než kampylobaktery. V současné době zahrnuje tento rod již 17 bakteriálních druhů. Řadíme sem *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* (1A, 1B) izolované ze stolice lidí a zvířat, *A. cibarius* z těl brojlerů, *A. skirrowii* izolovaný z jehňat, prasat a skotu, *A. halophilus* ze slané laguny, *A. nitrofigilis* izolovaný z kořenů rostliny *Spartina alterniflora*, *A. mytili* z mušlí a brakických vod, *A. thereius* z jater a ledvin potracených prasat, *A. marinus* z mořských řas a hvězdic, *A. trophiarum* z prasat, *A. defluvii* z odpadních vod, *A. molluscorum* z mušlí a ústřic, *A. sulfidicus* z mořských živočichů, *A. ellisii* izolovaný z mušlí a letos izolované druhy *A. bivalviorum* a *A. venerupis* opět z mušlí a škeblí [Levican *et al.*, 2012].

Arkobaktery patří mezi významné patogenní mikroorganismy v potravinářství a veterinární medicíně. K potlačení nežádoucí kontaminace se používají antimikrobiální látky, avšak problémem se stává rezistence bakterií vůči těmto látkám. Antimikrobiální látky se vyskytují v řadě potravin a nápojů. I pivo může antimikrobiálně působit díky obsahu ethanolu, CO₂, nízkému pH a také obsahu antioxidantů a chmelových hořčin.

Toto je zřejmě první studie, která popisuje chování arkobakterů v žaludečním prostředí a vliv konzumace piva během stravy na možnou inaktivaci arkobakterů.

Materiál a metody

Stanovení MIC ethanolu bylo provedeno kultivační metodou pro několik vybraných arkobakterů. Byla připravena mikrobiální suspenze o denzitě odpovídající stupni 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice (~ 10⁸ cfu/ml), naředěna na 10⁴ cfu/ml a zaočkována do testované koncentrace ethanolu (0,5; 1,0; 2,0; 5,0 a 10,0 %). Ke kontrole skutečné denzity buněk kultivační plotnovou metodou bylo použito ředění 10² cfu/ml. Obdobně bylo postupováno i při stanovení závislosti přežívajících buněk na čase v zaočkovaném

vzorku piva. Jako vzorky piv byly použity Pernštejn 12° (ležák, 5% ethanolu), Porter 19° (tmavé pivo, 8% ethanolu), Radegast Birell (nealkoholické, < 0,49% ethanolu), Budweiser Budvar 10° (výčepní pivo, 4% ethanolu) a Stella Artois (zahraniční ležák, 5% ethanolu). Modelování žaludečního obsahu bylo simulováno ve sterilním homogenizačním sáčku. Celkový objem se skládal ze simulované žaludeční směsi (SGF), potravinové matrice, vzorku testovaného piva a kultury bakterie *Arcobacter*. V určitých intervalech bylo provedeno vyočkování a stanovení procenta přežívajících buněk opět kultivačně. Kultivace byla vždy prováděna na povrchu TSA (HIMEDIA), pro ředění byl použit BHI bujón (HIMEDIA) a fyziologický roztok.

Pro možnost srovnání efektu jednotlivých vzorků piv byla stanovena antioxidační aktivita vzorků několika metodami (metoda s DPPH radikálem, ABTS činidlem a Folin-Ciocalteuova metoda) a zároveň byly identifikovány významné antioxidační sloučeniny vzorků pomocí RP-HPLC/ECD.

Výsledky a diskuse

Stanovili jsme MIC ethanolu pro vybrané arko bakterie. Hodnoty MIC pro dobu působení 0 a 30 min jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace ethanolu

Doba působení	<i>Arcobacter butzleri</i> – izolát z kuřecího krku (UPa)	<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 3933	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 3934	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>Arcobacter cibarius</i> CCUG 48482
0 min	5%	10%	10%	10%	10%	10%
30 min	2%	5%	5%	2%	5%	5%

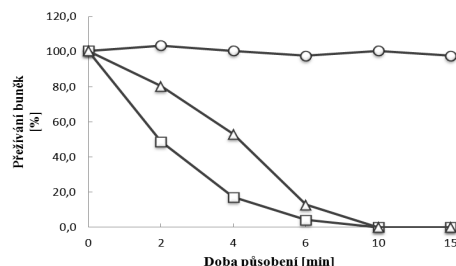
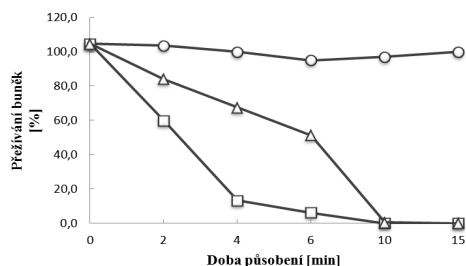
Výsledky přežívání arko bakterí ve vzorcích piv poukazují na fakt, že k inhibici dochází pozvolněji a v menší míře, než je tomu u samotného ethanolu v téže koncentraci jako u piv. Např. divoký izolát *A. butzleri* byl zcela inhibován koncentrací ethanolu 5 %, kdežto ve vzorku piva Pernštejn 12°, které obsahuje stejnou koncentraci ethanolu, přežívaly tyto buňky z 80 % původně inokulované density.

Stanovili jsme hodnoty antioxidační aktivity všech testovaných vzorků několika metodami. Nejnížší hodnoty antioxidační aktivity vykazoval vzorek nealkoholického piva (0,35 µg TEAC/ml), následuje výčepní pivo, ležákové pivo a naopak nejvyšší hodnotu logicky vykazoval vzorek černého extraktivního piva Porter 19° (1,67 µg TEAC/ml).

Model žaludečního obsahu byl převzat s určitými modifikacemi z předchozí publikace [Carneiro *et al.*, 2008]. Jako potravinová matrice byla zvolena kojenecká masozeleninová strava. Tento komerčně dostupný produkt splňuje požadavky na sterilitu a neobsahuje žádná aditiva, která by mohla ovlivňovat chování arko bakterí při stanovení. Vzorek piva byl přidáván do simulované směsi bez úprav. Objem vzorku byl zvolen tak, aby přibližně odpovídal „malému“ pivu (300 ml) konzumovanému během stravy. Na grafech 1 a 2 jsou uvedeny modelové případy průběhu inaktivace testovaných arko bakterí v modelu žaludku.

Z výsledků je patrné, že u arko bakterí dochází v simulovaném prostředí žaludku k úplné inaktivaci již po 10 minutách působení. Výjimkou je vzorek piva Stella Artois, u kterého i po 10 minutách dochází k přežívání buněk *A. cryaerophilus* CCM 3934,

avšak ve velice minimálním množství (0,6 %), naopak u vzorku Pernštejn 12° dochází k úplné inaktivaci již po 6 minutách.



Graf 1: Vzorek Porter 19° (tmavé pivo) - inaktivace *A. butzleri* – izolát z kuřecího krku (UPa) v modelu žaludku. Kontrola (○), Potr.matrice+SGF+Voda (□) a Potr.matrice+SGF+Pivo (△).
Graf 2: Vzorek Porter 19° (tmavé pivo) - inaktivace *A. cryaerophilus* CCM 3934 v modelu žaludku. Kontrola (○), Potr.matrice+SGF+Voda (□) a Potr.matrice+SGF+Pivo (△).

Obdobné výsledky byly získány i pro model žaludečního obsahu s přidáním vzorkem. Lze říci, že doba pro usmrcení buněk *Arcobacter* spp. inokulovaných do modelu žaludku a modelu žaludku se vzorkem je totožná, a to 10 minut. Zásadněji se však liší průběh závislosti procenta přežívajících buněk na době expozice. Model žaludku s přidáním vzorkem piva vykazuje pozvolnější úbytek procenta buněk tohoto patogenu. U jednotlivých vzorků piv jsou určité rozdíly v průběhu těchto závislostí, stejně jako jsou rozdíly v jejich složení. Piva obsahují značné množství sladového extraktu, což může mít určitý ochranný efekt na arkobaktery v modelu žaludku.

Závěr

Stanovili jsme MIC ethanolu pro arkobaktery, které jsou uvedeny v tabulce 1. Výsledky modelování žaludečního obsahu nenasvědčují tomu, že by konzumace piva během stravy mohla přispět k potlačení případné alimentární kontaminace arkobaktery jako v případě studie Carneiro *et al.* (2008) provedené s kamylobaktery a jejich přežíváním ve vzorcích vín. Je to dáno zřejmě rozdílným obsahem ethanolu, ale též nesrovnatelnou antioxidační aktivitou.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, projekt MSM 0021627502 a SGFChT 07/2011.

Literatura

CARNEIRO, A.; COUTO, J.A.; MENA, C.; QUEIROZ, J.; HOGG, T. Activity wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*. 2008, vol. 19, s. 800-805.

LEVICAN, A.; COLLADO, L.; AGUILAR, C.; YUSTES, C.; DIÉGUEZ, A.L.; ROMALDE, J.L.; FIGUERAS, M.J. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*. 2012, doi:10.1016/j.syapm.2012.01.002

VANDAMME, P.; FALSÉN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERS, P.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991, vol. 41, s. 88-103.

Kontaktní adresa: David Šilha, Ing. Katedra analytické chemie, FCHT UPa, Studentská 573, 532 10 Pardubice, david.silha@centrum.cz

Výskyt *Escherichia coli* v syrové zelenině z tržní sítě České republiky

Occurrence of *Escherichia coli* in raw vegetables from the market of Czech Republic

¹Skočková Alena, ¹Cupáková Šárka, ^{1,2}Karpíšková Renata

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum zdraví, výživy a potravin, Brno

Summary

A large epidemic caused by shigatoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*) in spring 2011 in Germany resulted in reduction of trust in health safety of raw vegetables and sprouted seeds. Therefore is this study focused on the presence and characterization of *E. coli* in raw vegetables and sprouted seeds sold in Czech Republic. Out of 59 samples 14 (23%) were positive for the presence of *E. coli*. Resistance to antimicrobial agents was determined using a disc diffusion method and E-test. Polymerase chain reaction was used for the detection of selected genes encoding virulence – *eaeA*, *hly*, *stx*₁ and *stx*₂, and genes encoding resistance to tetracycline - *tetA*, *tetB*, *tetC* a *tetG* and to betalactames – *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}. In two (12,5%) isolates was detected *bla*_{TEM} gene, in three (18,75 %) isolates *tetB* gene. No *hly*, *stx*₁ and *stx*₂ genes were detected, *eaeA* gene was detected in three (18,75 %) imported isolates. These isolates can be assessed as potentially enteropathogenic. Results of our study show that vegetable and sprouted seeds sold in Czech Republic can represent a potential risk for consumers, especially the imported one.

Keywords: virulence genes; antibiotic resistance; shigatoxins

Úvod

Stanovení *E. coli* je při mikrobiologické analýze potravin využíváno, jako indikátor možné fekální kontaminace a jeho přítomnost může mimo jiné indikovat přítomnost patogenních bakterií včetně shigatoxinogenní (STEC) *E. coli* (Altalhi a Hassan, 2009). Zelenina byla nejednou označena jako zdroj patogenní *E. coli* a spolu s naklíčenými semeny byla i jedním z možných zdrojů vážné epidemie hemoragických kolitid a hemolyticko-uremického syndromu, vyvolaného shigatoxigenním kmenem *E. coli* O104:H4 v Německu na jaře 2011 (Tzschopppe *et al.*, 2011). Tento epidemický kmen byl nejen nositelem důležitých faktorů virulence, ale produkoval také širokospektrou beta-laktamázu (ESBL), takže byl rezistentní k řadě antibiotik (Marejková *et al.*, 2011).

Práce byla zaměřena na sledování výskytu *E. coli* v syrové zelenině a naklíčených semenech prodávaných v tržní síti České republiky a jejich následnou charakterizaci – a) zhodnocení rezistence k antimikrobiálním látkám, b) detekci genů rezistence k tetracyklinu a k β-laktamovým antibiotikům, c) detekci genů kódujících vybrané faktory virulence.

Materiál a metody

V období červen – srpen 2011 bylo z tržní sítě České republiky získáno 59 vzorků syrové zeleniny včetně naklíčených semen. Vzorky se lišily zemí původu (ČR = 26, jiné = 33) i typem agroekosystému (ekologické zemědělství = 12, konvenční zemědělství = 47), ze kterého pocházely. Detekce *E. coli* byla prováděna po pomnožení 10 g vzorku v 90 ml pufrované peptonové vody (Oxoid, VB) při 37 °C po dobu 24 hodin s následnou kultivací na TBX agar (44 °C, 24 h) a agaru SMAC s BCIG (37 °C, 24 h).

Konfirmace suspektních izolátů spočívala v detekci oxidázy (OXItest, Erba-Lachema, ČR), β -D-glukoronidázy a v posouzení tvorby indolu (COLItest, Erba-Lachema, ČR).

Diskovou difúzní metodou byla testována rezistence k 13 terapeuticky významným antimikrobiálním látkám. Stanovení bylo provedeno podle metodiky CLSI (2006a), antibiotické disky byly získány od firmy Oxoid (VB). Vyhodnocení bylo provedeno dle kritérií uvedených v CLSI (2006b). U rezistentních izolátů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiální látky pomocí E-testu (Oxoid, VB).

Metodou double disk synergy test (DDST) a růstem na selektivní chromogenní půdě pro ESBL pozitivní bakterie (Oxoid, VB) byla zjišťována produkce širokospektré betalaktamázy.

K detekci genů kódujících vybrané faktory virulence – *eaeA*, *hly*, *stx*₁ a *stx*₂, genů rezistence k tetracyklinu – *tetA*, *tetB*, *tetC* a *tetG* a k β -laktamovým antibiotikům – *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Bakteriální DNA byla izolována z 24-hod. kultury na krevním agaru (BioRad, Francie), vlastní izolace byla provedena lýzou suspenze bakteriálních buněk při teplotě 95,5 °C po dobu 10 minut za přítomnosti 20% chelexu 100 (BioRad, Francie) s následným odstředěním. Supernatant byl použit jako templátová DNA. K detekci *tet* genů byly použity primery uvedené autory Ng *et al.* (2001), k detekci *bla* genů primery uvedené autory Brinas *et al.* (2002) a Lewis *et al.* (2007). Reakční objem činil 25 μ l a k amplifikaci byla použita *taq*-Purple DNA polymeráza s MgCl₂ (Top-Bio, ČR). Detekce faktorů virulence byla provedena pomocí multiplex PCR podle autorů Fagan *et al.* (1999), v 25 μ l reakční směsi byl použit PCR QIAGEN Master mix (Qiagen, Německo). Produkty PCR byly analyzovány gelovou elektroforézou v 1,5% agaróze (Serva, Německo) s následnou vizualizací na transiluminátoru po obarvení ethidium bromidem.

Výsledky a diskuse

Z celkového počtu 59 vzorků syrové zeleniny byla *E. coli* izolována ve 14 případech (23,7 %). Podrobnější výsledky jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1: Výskyt *E. coli* v syrové zelenině prodávané v ČR

Země původu	Počet vzorků	<i>E. coli</i> - pozitivní vzorky		Typ agroekosystému	Počet vzorků	<i>E. coli</i> - pozitivní vzorky	
	n	n	%		n	N	%
ČR	26	6	23,1	Konvenční	47	12	25,5
Jiné	33	8	25,8	Ekologický	12	2	16,6

Mezi vzorky lišícími se zemí původu byl zjištěn pouze minimální rozdíl ve výskytu *E. coli*, větší rozdíl byl zaznamenán mezi vzorky lišícími se typem agroekosystému. Méně často než v naší studii zjistili přítomnost *E. coli* v zelenině a naklíčených semenech němečtí autoři Tzschoppe *et al.* (2011), a to v pěti (12,5 %) ze 40 vzorků. Také Mukherjee *et al.* (2004) zaznamenali nižší procento výskytu *E. coli*, jak z ekologického (9,7 %), tak i z konvenčního (1,6 %) zemědělství. Zelenina může být kontaminována kdykoli v průběhu pěstování, sklizně, zpracování, distribuce či při přípravě ke konzumaci. Jako nejčastější bývá označována předsklizňová kontaminace (Harapas *et al.*, 2010), tzn. kontaminace půdou, závlahovou vodou a organickými hnojivy.

U získaných izolátů byla diskovou difúzní metodou nejčastěji zjištěna rezistence k ampicilinu (AMP), a to u 12 (75,0 %) izolátů. Rezistence k tetracyklinu (TET) byla stanovena u tří (18,8 %) izolátů. Dále byla zjištěna rezistence k trimethoprimu (TMP), kyselině nalidixové (NA), ampicilinu s kyselinou klavulanovou (AMC) a streptomycinu (STR) (6,3 %). Metodou E-test byla potvrzena rezistence k ampicilinu pouze ve dvou případech (12,5 %), kdy byla zjištěna hodnota MIC >256 µg/ml. U těchto izolátů byl také detekován gen *bla*_{TEM} zodpovědný za rezistenci k β-laktamovým antibiotikům. Rezistence k tetracyklinu byla potvrzena u všech tří izolátů (MIC = 70 – 128 µg/ml), ve kterých byl detekován gen *tetB*. Dále byla metodou E-test potvrzena rezistence k trimetoprimu (TMP) s hodnotou MIC >32 µg/ml. U dvou izolátů byla zjištěna rezistence k více než jedné antimikrobiální látce, fenotypy rezistence byly následující: AMP-TET; AMP-TET-TMP.

Přestože všechny izoláty rostly na selektivní chromogenní půdě pro ESBL pozitivní bakterie v charakteristických modrých koloniích, DDST ani PCR (detekce genu *bla*_{CTX}) produkci ESBL nepotvrdili.

U žádného z izolátů nebyla detekována přítomnost genů *stx*₁ a *stx*₂ kódujících produkci shiga toxinů ani genu *hly* zodpovědného za produkci hemolysinu. U tří izolátů byla detekována přítomnost genu *eaeA*, ve všech případech ve vzorku s jinou zemí původu než je ČR. Gen *eaeA* kóduje produkci intiminu, důležitého adhezenčního faktoru zodpovědného za tvorbu attachment-effacement lézí ve střevě (Fagan *et al.*, 1999; Altalhi a Hassan, 2009). Intimin je faktor virulence typický pro skupinu enteropatogenních *E. coli* (EPEC), bývá přítomen i u kmenů enterohemoragických *E. coli* (EHEC), pro které je však na rozdíl od EPEC typická současná produkce shiga toxinů a hemolysinu (Duffy *et al.*, 2007). Z tohoto pohledu lze izoláty, u kterých byla prokázána přítomnost genu *eaeA* hodnotit jako potenciálně enteropatogenní.

Závěr

Výsledky naší studie potvrzují, že syrová zelenina a naklíčená semena prodávaná v České republice mohou být zdrojem bakterií *E. coli*. U žádného ze získaných izolátů však nebyla zjištěna přítomnost genů *stx*₁, *stx*₂ ani *hly*, které bývají detekovány u shigatoxigenních kmenů *E. coli* způsobujících vážná alimentární onemocnění. U tří izolátů byla detekována přítomnost genu *eaeA*, tyto izoláty lze hodnotit jako potenciálně enteropatogenní. Všechny ve studii určené potenciálně enteropatogenní izoláty pochází ze vzorku s jinou zemí původu než je ČR. Souhrnně lze tedy konstatovat, že syrová zelenina prodávaná v České republice může být pro konzumenty potencionálním rizikem, a to zejména zelenina do České republiky dovážená.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402.

Literatura

Literatura dostupná u autora.

Kontaktní adresa: Alena Skočková, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, askockova@vfu.cz

Bezpečnost mléka a mléčných výrobků z pohledu termostability stafylokokových enterotoxinů

Milk and milk products safety from the perspective of staphylococcal enterotoxins heat stability

¹Janštová Bohdana, ¹Necidová Lenka, ²Lačanin Ines, ¹Janštová Bohumíra

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Faculty of Food Technology, University of Josip Juraj Strossmayer Osijek, Croatia

Summary

UHT milk inoculated with three strains of *Staphylococcus aureus* was incubated for 24 hours at 37 °C. After that it was heated to the three different temperatures (72 °C, 85 °C a 92 °C) for 15 seconds. Growth of *S. aureus* and production of staphylococcal enterotoxin was observed after heating treatment. Our experiments show, that heating process can kill all bacteria, but thermostable staphylococcal enterotoxin can persist.

Keywords: staphylococcal enterotoxin; *Staphylococcus aureus*; heat stability

Úvod

Staphylococcus aureus je považován za jednoho z nejčastějších původců onemocnění z potravin (Tirado and Schimdt, 2001). *S. aureus* je hlavní příčinou mastitid u krav (Rabello *et al.* 2007), a proto kontaminované mléko a mléčné výrobky mohou znamenat pro konzumenta riziko intoxikace. Jablonski a Bohach (2001) uvádějí, že počty *S. aureus* v rozmezí již 10^3 - 10^5 KTJ.g⁻¹ mohou vyprodukovat takové množství enterotoxinu, které může představovat pro konzumenta riziko. S ohledem na zajištění bezpečnosti potravin a zdraví konzumenta a vzhledem k riziku vzniku onemocnění stafylokokovou enterotoxikózou se podle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny ve znění pozdějších předpisů nařizuje u vybraných kategorií potravin stanovovat počet koagulázopozitivních stafylokoků a prokazovat nepřítomnost stafylokokových enterotoxinů, pokud je v nich zjištěn počet koagulázopozitivních stafylokoků $>10^5$ KTJ/g.

Při výskytu *S. aureus* v pasterovaném mléce jde obvykle o důsledek jejich tepelné rezistence (Jičínská a Havlová, 1995). Ačkoli pasterace zničí bakterie *S. aureus*, termostabilní enterotoxin si obvykle zachová svoji biologickou aktivitu (Evenson *et al.*, 1988). Vzhledem k významu těchto toxinů v sektoru veřejného zdraví a v potravinářském průmyslu je nezbytný efektivní screening s cílem zjistit prevalenci těchto toxinogenních kmenů v potravinách a zhodnotit případné riziko výskytu stafylokokových enterotoxinů (SEs) v potravinách.

Materiál a metodika

Kmeny *S. aureus* s produkcí SEA, SEB a SEC (kmen A, B, C) pocházely z České sbírky mikroorganismů (CCM 5756, 5757, 5971). Těmito toxinogenními kmeny bylo zaočkováno UHT mléko z tržní sítě v počtech 10^4 KTJ.ml⁻¹, u kterého byla předem testováním vyloučena přítomnost *S. aureus*. Takto zaočkované vzorky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, aby došlo k pomnožení *S. aureus* a k produkci SEs. Tyto podmínky simulovaly množení *S. aureus* a možnou produkci SEs v mléce před pasterací. U všech vzorků bylo po 24 h inkubaci provedeno stanovení počtu *S. aureus* a

průkaz produkce enterotoxinu. Následně byly vzorky pasterovány při různých teplotách, které jsou běžně využívány v mlékárenském průmyslu (72 °C, 85 °C a 92 °C). Časová expozice, po níž byly vzorky vystaveny uvedeným teplotám, byla jednotná - 15 sekund. Po pasteraci byly u mléka zjišťovány počty *S. aureus* a přítomnost SEs.

Stanovení počtu *S. aureus* bylo prováděno plotnovou metodou dle ČSN EN ISO 6888-1 s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera, inkubace Petriho misek probíhala při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 ± 2 hodiny a 48 ± 2 hodiny. Konfirmace vybraných suspektních kolonií byla provedena pomocí koagulázového testu Dry Spot Staphytest Plus (Oxoid, UK). Ke stanovení SEs byl použit přístroj miniVIDAS® - plně automatický systém založený na fluorescenční imunologické metodě (ELFA - enzyme-linked immunofluorescent assay). Míra fluorescence je přímo úměrná množství SEs ve vzorku a je vyjádřena jako hodnota RFV (Relative Fluorescence Values).

Výsledky a diskuze

V pokusu byl zaznamenán vliv pasterační teploty na přežívání *S. aureus* a především na výskyt SEs typu A, B a C po tepelném ošetření mléka.

Tabulka 1: Počty *S. aureus* před a po pasteraci zaočkovaného mléka

Kmen <i>S. aureus</i>	Počty <i>S. aureus</i> (KTJ.ml ⁻¹)				
	po zaočkování	po inkubaci 37 °C / 24 hod	po pasteraci 72 °C / 15 min	po pasteraci 85 °C / 15 min	po pasteraci 92 °C / 15 min
A	9,0 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁴
B	9,0 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁸	2,0 x 10 ³	< 5,0 x 10 ¹	< 5,0 x 10 ¹
C	8,0 x 10 ⁴	6,5 x 10 ⁸	< 5,0 x 10 ¹	< 5,0 x 10 ¹	< 5,0 x 10 ¹

Po pasteračním záhřevu mléka zaočkovaného **kmenem A** nedošlo ke zničení bakterií *S. aureus*, při působení teploty 72 °C po dobu 15 s poklesl počet bakterií o 3 logaritmické řády. Obdobná situace byla sledována při záhřevu na 85 °C. Působení vyšší pasterační teploty 92 °C snížilo počet bakterií oproti výchozímu počtu na polovinu, nicméně i při této teplotě dosahovaly počty *S. aureus* vyšších hodnot. V modelovém vzorku mléka zaočkovaného **kmenem B** přežily po pasteraci 72 °C vyšší počty bakterií *S. aureus*. Pasterační teploty 85 °C a 92 °C byly dostačující pro inaktivaci bakterií *S. aureus*. **Kmen C** se v našem pokusu jevil jako velice senzitivní vůči tepelnému záhřevu, již působení teploty 72 °C snížilo počty *S. aureus* na hodnotu < 5,0 x 10¹.

Tabulka 2: Průkaz přítomnosti stafylokokových enterotoxinů ve vzorcích mléka po 24 h inkubaci (před pasterací) a po pasteraci s uvedením hodnoty RFV

	Průkaz SEs (RFV)		
	SEA	SEB	SEC
Inkubace 37 °C / 24 h	+ (9737)	+ (9670)	+ (10911)
Pasterace 72 °C / 15 min	+ (8347)	+ (2317)	+ (2980)
Pasterace 85 °C / 15 min	+ (5915)	- (329)	+ (1254)
Pasterace 92 °C / 15 min	+ (4776)	- (120)	+ (1925)

Stabilita vůči teplotnímu záhřevu je jednou z nejdůležitějších vlastností stafylokokových enterotoxinů ve vztahu k bezpečnosti potravin (Hernandez et al., 1993). Tepelná stabilita enterotoxinů závisí na teplotě, čase, použitém kultivačním médiu, pH, koncentraci soli a dalších faktorech související s denaturací toxinu (Spero et al., 1976). Tabulka 2 ukazuje hodnoty RFV před a po pasteraci (72 °C, 85 °C a 92 °C).

Přestože jsou veškeré hodnoty RFV po tepelném opracování nižší, potraviny s pozitivním průkazem SEs nelze považovat za bezpečné. Jak vyplývá z Tabulky 1, počty *S. aureus* byly pasterací také výrazně sníženy, avšak SEs v některých vzorcích mléka pasteračním teplotám odolaly. Při mikrobiologickém vyšetření takových vzorků pasterovaného mléka by *S. aureus* nebyl zachycen, přestože by potravina byla příčinou onemocnění z potravin s typickými příznaky stafylokokové enterotoxikózy. V případě SEA a SEC byla pasterační teplota v kombinaci s dobou působení nedostatečná ke zničení enterotoxinu. Problematikou působení vysokých teplot na SEC ve fosfátovém pufru se zabýval Fung et al. již v roce 1973. Zjistili, že i po 5 hodinovém působení teploty 80 °C byla u bakterií sledována zbytková (5-10%) serologická aktivita.

SEB byl v našem modelovém pokusu zcela inaktivován již při působení teploty 85 °C po dobu 15 s.

Závěr

Vzhledem k možnému nebezpečí vzniku alimentárních intoxikací způsobených SEs je monitorování výskytu *S. aureus* a jeho enterotoxinů důležitým krokem při kontrole kvality a bezpečnosti potravin. Výsledky modelových pokusů ukázaly, že stabilita enterotoxinů závisí hlavně na teplotě, čase, ale i dalších faktorech souvisejících s denaturací toxinu. Velkou tepelnou stabilitu v našem pokusu vykazovaly enterotoxiny A a C, poměrně termolabilní byl enterotoxin B, který byl inaktivován 15 sekundovým záhřevem při teplotě 85 °C. Z výsledků práce vyplývá význam dostatečného tepelného ošetření mléka, ale prioritně se především musí zabránit kontaminaci výchozí suroviny.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin a IGA 18/2012/FVHE.

Literatura

- EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*. 1988, vol. 7, no. 4, s. 311–316.
- FUNG, D. Y. C.; STEINBERG, D. H.; MILLER, R. D.; KURANTNICK, M. J.; MURPHY, T. F. Thermal Inactivation of Staphylococcal Enterotoxins B and C. *Applied microbiology*. 1973, vol. 26, no. 6, s. 938-942.
- HERNÁNDEZ, F. J.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; BLANCO, J. L.; DOMÉNECH, A.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCÍA, E. Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, vol. 59, no. 5, s. 1515-1519.
- JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (eds): Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington. 2001, s. 411-434.
- JIČÍNSKÁ, E.; HAVLOVÁ, J. Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných výrobcích. Vydal ÚZPI, Praha. 1. vydání. 1995, s. 106.
- RABELLO R. F.; MOREIRA B. M.; LOPES R. M.; TEIXEIRA L. M.; RILEY L. W.; CASTRO A. C. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*. 2007, vol. 56, no. 11, s. 1505–1511.
- SPERO, L.; GRIFFIN, B. Y.; MIDDLEBROOK, J. I.; METZGER, J. F. Effect of Single and Double Peptide Bond Scission by Trypsin on the Structure and Activity of Staphylococcal Enterotoxin C. *The Journal of Biological Chemistry*. 1976, vol. 251, no. 18, s. 5580-5588.
- TIRADO, C.; SCHIMDT, K. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *The Journal of Infection*. 2001, vol. 43, no. 1, s. 80–84.

Kontaktní adresa: Bohdana Janštová, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, bjanstova@vfu.cz

SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat a hygiena
vegetabilí*

Determining sulphur dioxide levels in selected samples of South Moravian wines

Pažout Vladimír, Staňková Lenka

*Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinarian and Pharmaceutical Sciences
Brno*

Summary

This document concerns the levels of sulphur dioxide found in selected South Moravian wines. Several samples of red and white wines were analysed, while all samples were drawn from wines readily available on the market. The amount of sulphur dioxide in the samples was determined by the Hálkové et al. (2004) method, using appropriate procedures and calculations.

Keywords: wine; sulphur dioxide; levels

Introduction

Must and wine have been sulphurised since days of old, whereby sulphur dioxide removes oxygen from must and wine, preventing the micro-organisms who feed on them from spreading. Which cannot be avoided with modern wine-making methods, as SO₂ has both a reductive and conserving effect on must. In optimum levels sulphur dioxide positively affects a wine's bouquet and flavour as it ages, stabilising it as well (Pátek, 1995).

Material and Methods

Determining Sulphur Dioxides Levels by the Hálkové et al. (2004) Method

Sulphur dioxide was found in the samples, as was sulphurous acid and bisulphite and sulphitic anion, and bound to some organic compounds. Free sulphur dioxide becomes oxidised by iodine, but requires alkaline hydrolysis if bound.

Procedure: FREE sulphur dioxide

Pipette 50 ml of wine into a 500 ml conical flask and add 3 ml of sulphuric acid (100 ml 96% + 900 ml distilled water), 1 ml chelating agent 3 (30 g/l) solution of starch paste and immediately titrate a solution of 0,02 M I₂ until blue-violet in colour. Make note of the consumption of V₁.

Procedure: TOTAL amount of sulphur dioxide

Once we determine the amount of free sulphur dioxide in the sample we add 8 ml 4 M NaOH, seal the flask, mix and let sit for 5 minutes. While stirring add 10 ml of diluted sulphuric acid (100 ml 96% + 900 ml distilled water). Immediately titrate with 0,02 M I₂ until blue-violet and make note of the consumption of V₂. We add 20 ml of 4 M NaOH, mix and let sit for 5 minutes, add 200 ml of cold distilled water and 30 ml of diluted sulphuric acid (100 ml 96% + 900 ml of distilled water). Immediately titrate with 0,02 M I₂ and make note of the consumption of V₃.

Calculation: free sulphur dioxide in mg/l

$$X_1 = 0,64 \times V_1 \times 20 = 12,8 \times V_1$$

Calculation: total amount of sulphur dioxide in mg/l

$$X_2 = 0,64 \times (V_1 + V_2 + V_3) \times 20 = 12,8 \times (V_1 + V_2 + V_3)$$

- 0,64.....the amount of SO₂ corresponding to 1 ml 0,02 M I₂
 V1.....amount of 0,02 M I₂ consumed while titrating
 V2.....amount of 0,02 M I₂ consumed while titrating
 V3.....amount of 0,02 M I₂ consumed while titrating
 20.....coefficient conversion to 1 dm³

Required items:

- Erlenmeyer flask (500 ml), stopper
- 10 ml measuring cylinder
- pipettes : 50 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml, 1 ml
- 25 ml burette
- burette stand

Chemicals and solutions:

- 0,02 M I₂
- 4 M NaOH
- diluted sulphuric acid – 100 ml 96% + 900 ml distilled water
- starch paste
- chelating agent 3

Results

Table 1: Amount of free and total sulphur dioxide found in wines available on the market

White wine	free SO₂ (mg/l)	total SO₂ (mg/l)
Veltlínské zelené, Velké Pavlovice	6,4	39,1
Muller, Pálava	7,1	38,4
Veltlínské zelené, Dolní Dunajovice	10,3	32,7
Ryzlink rýnský, Dolní Dunajovice	12,8	41,0
Ryzlink vlašský, Dolní Dunajovice	8,9	53,4
Ryzlink vlašský, Velké Pavlovice	10,3	57,6
Red wine		
Modrý Portugal, Pálava	12,8	142,7
Svatovavřinecké, Pálava	6,4	28,5
Frankovka, Rakvice	8,3	33,1
Svatovavřinecké, Velké Pavlovice	7,7	29,2
Modrý Portugal, Velké Pavlovice	8,3	32,7
Modrý Portugal, Rakvice	7,0	32,0

Discussion

The purpose of this work was to assess the quality and safeness of South Moravian wines by measuring their content of total and free sulphur dioxides.

Steidl (2002) stated that, from a technological point of view, we must pay special attention to the sulphurisation of grape must. Sulphur dioxide is presently irreplaceable in the wine-making industry and there is no other agent which could fully replace its

effects on must. In the right amount sulphur dioxide favourably affects an aging wine's bouquet and flavour as well as its quality and stability.

Council regulation no. 479/2008 and EC Commission regulation no. 606/2009 dictate SO₂ and liquid acid limits, since their total amount is important for health, for which reasons wines found to contain levels beyond these limits should not make it to market. For example, for still wines, red wines must not have more than 150 mg/l SO₂ while white wines and rosés must not have more than 200 mg/l. If the amount of residual sugar is greater than 5 g/l the limits increase to 200 mg/l for red wines and 250 mg/l for white wines and rosés.

Conclusion

This work focuses on evaluating the quality of South Moravian wines and their safety in terms of content of sulphur dioxide, and reveals the amount of their free and bound forms. This amount is important for the wine's quality and consumer safety, whereby the results prove that what is available on the market does meet legislative requirements. Any differences are due to the different conditions when growing wine and the actual wine production process. These wines have shown that their sulphur dioxide content is significantly higher than the set limits and should be examined further.

Acknowledgements

We'd like to thank Doc. MVDr. Vladimír Pažout, CSc., for his excellent help and counsel during the practical procedure.

References

HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J., Analýza potravin, vydavatel odborných publikací – Straka Ivan, 2001, 109 s.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 606/2009 ze dne 10. července 2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č.479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, ekologické postupy o omezením, která se na ně použijí.

PÁTEK, J., Nová vinařská abeceda, Blok, Brno, 1995, 183 s. ISBN 80-7029-095-1

STEIDL, R., Sklepní hospodářství, Národní salon vín, Valtice, 2002, 307 s. ISBN 80-903201-0-4

Contact address: Lenka Staňková, Mgr., Ústav vegetabilních potravin, FVHE, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, JLVKKK@seznam.cz

Determination of anthocyanins in blue aleurone species of wheat

Bartl Pavel, Tremlová Bohuslava, Ošťádalová Martina

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Anthocyanins are a group of naturally occurring phenolic compounds which have many beneficial effects for humans organisms. They have been detected in many species of fruit, vegetable or cereal. The aim of this work was to detect anthocyanin compounds in blue aleurone species of wheat.

Keywords: blue wheat; anthocyanins; determination

Introduction

Anthocyanins belong to large group of phenolic compounds that is generally called flavonoids (Kong *et al.*, 2003). Anthocyanins are the most widespread and very large group of plant pigments. They consist of sugar and non-sugar part. The non-sugar part is called anthocyanidin (Figure 1) (Motohashi and Sakagami, 2009).

The most important anthocyanidins are summarized in Table 1. Up to these days about 300 of different kinds of anthocyanins have been identified in various natural plants (Velíšek, 1999). Anthocyanins are the largest group of water-soluble natural pigments which cause red, purple and blue colour of many species of fruit, vegetable and even grains of cereal. They are found in plants in the form of various glycosides which are often formed with glucose, galactose, arabinose, rhamnose a xylose (Horbowicz *et al.*, 2008). Cyanidin is the most frequent anthocyanidin in foodstuffs.

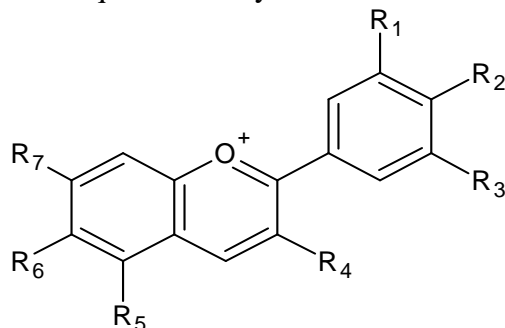


Figure 1: Structure of anthocyanidins (Velíšek, 1999)

Table 1: Summary of the most widespread anthocyanidins (Andersen and Markham, 2007; Velíšek, 1999)

Anthocyanidin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH

The interest toward natural compounds is very intensive especially in last years and anthocyanins are on the top current research. The main reason for research of anthocyanin is the fact that these compounds have strong positive effects on human health. Antioxidative effect belong among the most important properties. It is much stronger than antioxidative properties of vitamine E and C. Furthermore, anthocynins could play an important role in prevention of atherosclerosis and they have anti-inflammatory and anti-cancer properties (Andersen and Markham, 2007, Naczk and Shahidi, 2006). Anthocynins could also replace synthetics pigments in food processing since these compounds represent an usable alternative because they are one of the largest group of natural pigments. Nowadays anthocyanins are used as food pigment. They are marked by abbreviation E163 on covers of foodstuffs. The aim of this work is quantitative determination of anthocyanins in blue aleurone wheat.

Material and Methods

The sample of blue aleurone wheat was species RU 440–6. It was cultivated from red species of wheat. It is a species of wheat which is potentially usable in food processing. Extraction of anthocyanins from plant samples was performed by straight extraction of the sample with solvent (Andersen and Markham, 2007). In our case we used ethanol and formic acid. Milled sample of blue aleurone wheat was extracted in ratio 1:8 for one hour of extraction on a laboratory shaker. The sample was centrifuge (4200g) and supernatant was evaporated at 30 °C.

HPLC method was used for determination of anthocyanins. Stationary phase was column C18 (150.0 x 4.6 mm, 3.0 µm), mobile phase consisted of methanol and 4.5% formic acid. The determination of anthocyanins was preceded at 520 nm.

Results and Discussion

Abdell-All and Hucl (2003) reported content of anthocyanins in blue aleurone wheat to be about 105–09 mg/kg. We found out that the content in our sample was 65.2 mg/kg. The difference of contents of anthocyanins can be influenced by presence of others species of blue aleurone wheat and also the concentration of anthocyanins depends on climatic conditions where blue aleurone wheat was grown. Generally it is known that drier climatic conditions can result in higher content of anthocyanins in grains. The total quantity of anthocynins and quantity of particular anthocyanins of blue aleurone wheat is summarized in Table 2.

Table 2: Individual and Total Anthocyanins in Blue Aleurone Wheat

Anthocyanins	Content of Anthocyanins (mg/ kg)
cyanidin 3-glucoside	22.23 ± 1.62
cyanidin 3-galactoside	7.13 ± 0.65
malvidin 3-glucoside	2.76 ± 0.43
peonidin 3-glucoside	6.33 ± 0.56
pelargonidin 3-glucoside	14.13 ± 1.58
total unknown	12.62 ± 1.44
total	65.20 ± 1.25

Five species of anthocyanins were identified in our sample of blue aleurone wheat. Cyanidin 3-glycoside was found in the highest amount in our samples. At the same time it is the compound which is the one of the most widespread anthocyanins in nature. Further anthocyanidin which was found in higher concentration is pelargonidin 3-glucoside. Others unidentified and identified anthocyanins are present in lower concentrations.

Conclusion

We found 65.20 ± 1.25 mg of anthocyanins per 1 kilogram of wheat in our samples of blue aleurone wheat. Five various species of anthocyanins were identified and we also found other compounds based related to anthocyanins whose structure have not been evaluated yet.

References

- ABDEL-AAL, E.-S, M., HUCL, P. Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no.8, p. 2174-2180.
- ANDERSEN, O., M.; MARKHAM, K., R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1. vyd., 2006. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 1197 s. ISBN 0-8493-2021-6.
- HORBOWICZ, M., KOSSON, R., GRZESIUK, A., DEBSKI, H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2008, vol. 68, no. 3, p. 5-22.
- KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N., K., CHIA, T., F., BROUILLARD, R. Analysis and biological Activities of Anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003, vol. 64, no. 5, p. 923-933.
- MOTOHASHI, N., SAKAGAMI, H. Anthocyanins as Functional Food Colors. *Topics of Heterocyclic Chemistry*, 2009, vol. 16, no. 2, p. 1-40.
- NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, no.5, p. 1523-1542.
- VELÍSEK, J. *Chemie potravin*. 1. vyd., 1999. Tábor:Ossis, 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

Contact address: Pavel Bartl, Mgr., Department of Vegetable Foodstuffs, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09025@vfu.cz

Nutritional value of selected legumes species

Rusníková Lucie, Straková Eva, Suchý Pavel

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

In the study was compared nutritional value of selected legumes: soybean, field peas, broad beans, and lupin. In these legumes we determined content and quality of the oil. We focused especially on the content of fatty acids. Fatty acids were divided into groups according to the saturation. We monitored the total content of saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA). We also divided them to group ω -3, ω -6, and ω -9 fatty acids (FA). Legumes have a favorable ratio of ω -3 FA: ω -6 FA, especially lupin oil (1:4.3), which is in accordance with ratio 1:5 recommended for human diet. Content of amino-acids (g/kg) in nitrogen substances of the lupin seeds was evaluated. Lupin is an excellent source of protein, but can be used as well as a source of UFA.

Keywords: vegetable oil; fatty acid; UFA; ω -3, ω -6, ω -9 FA; protein content; lupin

Introduction

The work is focused on nutritional properties of selected legume's species. The main usability of legumes in nutrition is for them high content of crude protein. However, there is also a very positive fat composition, which is very interesting in terms of dietetics. Legumes contain little fat and are not grown to obtain a fat in addition to soybean seeds. Fat content in soybean seeds exceeds fat content in other pulses. KARAASLAN (2008) reviewed the fat content in soybean seeds about 190 g/kg. Thanks to higher content of fat 70.4–75.5 g/kg (CHIOFALO et al., 2012) lupin differs from beans and peas 15 g/kg (CAMPOS-VEGA et al., 2010). An important measure for evaluation of fat is fatty acid (FA) ratio between saturated fatty acids (SFA) and unsaturated fatty acids (UFA). Content of monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) preferably reflects about oil quality. PUFA contain essential fatty acids very important with respect to human and animal nutrition. In particular, the focus is on adequate intake of ω -3 FA and the ratio ω -3 FA: ω -6 FA in the diet. The ratio 1:5 is recommended. SUJAK et al. (2006) dealt with composition of lupin seeds. Their results indicate that lupin oil is dietetically very good. When lupin is used, is necessary to take into account the individual species and varietal differences. CHIOFALO et al. (2012) confirm this in their study. *L. angustifolius* showed the highest content of SFA and *L. luteus* showed the highest levels of ω -6 PUFA. The data obtained suggests *L. albus* as the most interesting lupin species for aiding the crop-livestock food chain and *L. luteus* as a promising crop due to its high nutritive traits for the Mediterranean environment. *L. albus* had the highest ω -3 FA: ω -6 FA PUFA ratio. Differences between lupin species are also evident in the content and composition of crude protein (CP). The most satisfactory in terms of human and livestock nutrition marked SUJAK et al. (2006) *L. albus*. WOOD and FEARON (2009) refer to lupin and field peas novel feeds to increase levels of beneficial UFA in products. JEZIERNY et al. (2010) examined the CP content and content of 17 amino acids in seeds of *L. albus*, *L. angustifolius* and *L. luteus*.

Material and Methods

The aim of this work was on its own analyzes to compare dietary and nutritional quality of oil seeds in selected major legumes in the Czech Republic. The material to be analyzed consisted of whole seeds of species given below were used: **Soybean** (*Soja hispida*), **field peas** (*Pisum sativum*), **broad bean** (*Faba bean*), and **lupin** (*Lupinus* sp.), respectively. Fat content was determined by Soxhlet method. Fatty acids were detected by gas chromatography analyzer GAS Chromatograph GC-2010 (SHIMADZU). In lupin seeds, we also focused on evaluating the content of crude protein and amino acid composition. To determine crude protein, we used the method according to Kjeldahl (Nx5,7). In addition, we determined the amino acid content (g/kg) (AAA INGOS 400).

Results and Discussion

For each species of legume was fat content in seed evaluated. Data are expressed on a dry matter basis (DM). The highest fat content was reported in soybean seeds (216.0 g/kg), it was higher than reported (KARAASLAN, 2008), followed by lupin (67.2 g/kg) with a lower value than reported (CHIOFALO et al., 2012), to field peas (7.4 g/kg) and broad bean (4.8 g/kg), value lower than reported (CAMPOS-VEGA et al., 2010). The results of contents of individual groups of fatty acids, expressed in g/100 g of oil, are shown in figures 1-3. Figure 1 shows sums of SFA and UFA. The individual oils are very similar in low representation of SFA and high proportion of UFA that corresponds with the results (SUJAK et al., 2006). Lupin oil contains on average approximately the same amount of MUFA and PUFA. That is significant difference from other oils, as documented in Figure 2. Soybean, field peas and broad bean oils have higher values of PUFA than MUFA.

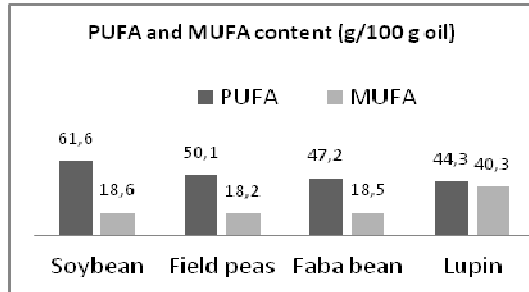
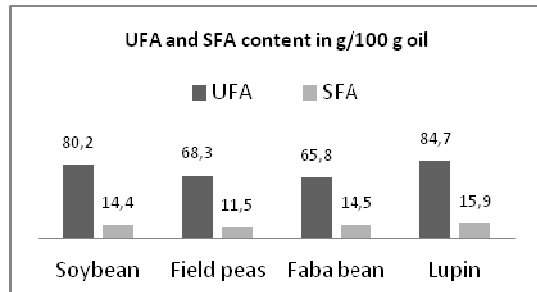


Fig. 1. Content of SFA and UFA in oils

Fig. 2. Content of MUFA and PUFA in oils

The greatest qualitative differences can be observed in various oils for distribution by the FA group ω -3, ω -6, and ω -9 FA, as shown in Figure 3.

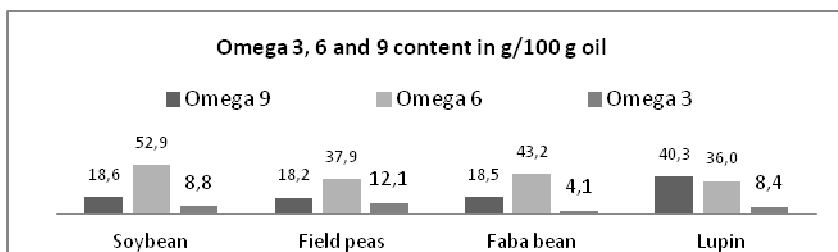


Fig. 3. Content of ω -3 FA, ω -6 FA, and ω -9 FA in oils

According this dealing legumes can be evaluated positively. Especially the lupin oil, where the ratio ω -3: ω -6 reaches 1:4,3. The ratio 1:5 is recommended as a suitable in

human nutrition. Following fatty acid predominate in lupin oil: oleic acid from ω -9 FA, linoleic acid from ω -6 FA and α -linolenic acid from ω -3 FA.

If we look for lupin as an alternative to soybean, lupin brings us the best results compared to both broad bean and field peas in the assessment of dietary fatty acids, but also in the content of CP, which is primarily use for. CP content of lupin is from all selected legume the highest (344.3 g/kg), followed by soybean (323.4 g/kg), broad bean (293.1 g/kg) and peas (207.7 g/kg). Content of amino acids in crude protein of lupin is in the total 310.7 g/kg, indicating a large proportion of protein in CP. Thanks to the advantageous dietary properties of lupin it should be more included in feeding rations in the future, as recognized by WOOD and FEARON (2009).

Conclusion

The results of analyzes can be concluded that the legumes oils are suitable dietetic oils in human and animal nutrition. In terms of the ratio between ω -3 and ω -6 FA are even better than some used oil of oil crops. Specifically, lupin oil, despite the higher proportion of SFA, contains balanced proportions of individual fatty acids as well as MUFA and PUFA ratio, and appropriate representation of each group ω -3 FA, ω -6 FA and ω -9 FA. Lupin is appropriate with respect to fat content. Its content is the highest compared with peas and broad bean. Another lupin advantage is high proportion of crude protein represented by quality amino acids. However, care must be taken on the choice of species and varieties, because the individual results of CP, amino acids and fatty acids are different. With proper choice of species and varieties of lupin, it is a good source of crude protein, but also fatty acids in the correct proportion. Mentioned characteristics allow the use of lupin in the diet and replacing it partially soybean.

Acknowledgements

This work was performed as a part of the Research Plan IGA 5/2012/FVHE.

References

- CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, D.B. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res Int.* 2010, vol. 43, p. 461-482.
- CHIOFALO, B.; PRESTI, L.V.; CHIOFALO, V.; GRESTA, F. The productive traits, fatty acid profile and nutritional indices of three lupin (*Lupinus* spp.) species cultivated in a Mediterranean environment for the livestock. *Anim Feed Sci Tech.* 2012, vol. 171, p. 230-239.
- JEZIERNY, D.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim Feed Sci Tech.* 2010, vol. 157, p. 111-128.
- KARAASLAN, D. Determination of total protein and fatty acid composition of soybean seed as affected by sowing dates. *Asian J Chem.* 2008, vol. 20, no. 1, p. 767-775.
- SUJAK, A.; KOTLARS, B.; STROBEL, W. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chem.* 2006, vol. 98, no. 4, p. 711-719.
- WOOD, V.B.; FEARON, A.M. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livest Sci.* 2009, vol. 126, p. 1-20.

Contact address: Lucie Rusníková, Mgr., Department of Animal Nutrition, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, rusnikoval@vfu.cz

Průkaz sojového proteinu fluorescenční mikroskopií **Detection of soy protein by fluorescent microscopy**

Talandová Michaela, Pospiech Matej, Tremlová Bohuslava

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Immunohistochemistry method by ABC (avidin-biotin complex) was verified. It is a three-stage indirect method, based on formation of the strong irreversible bonds between biotin and avidin. Avidin is a protein of egg white and biotin is a vitamin H. Fluorochromes like FITC, Texas Red, AMCA and Fluorescein streptavidin were used for visualization of location of antibodies bounded to the antigen. Developed methodology was tested on pure soybean protein, which is among the major food allergens.

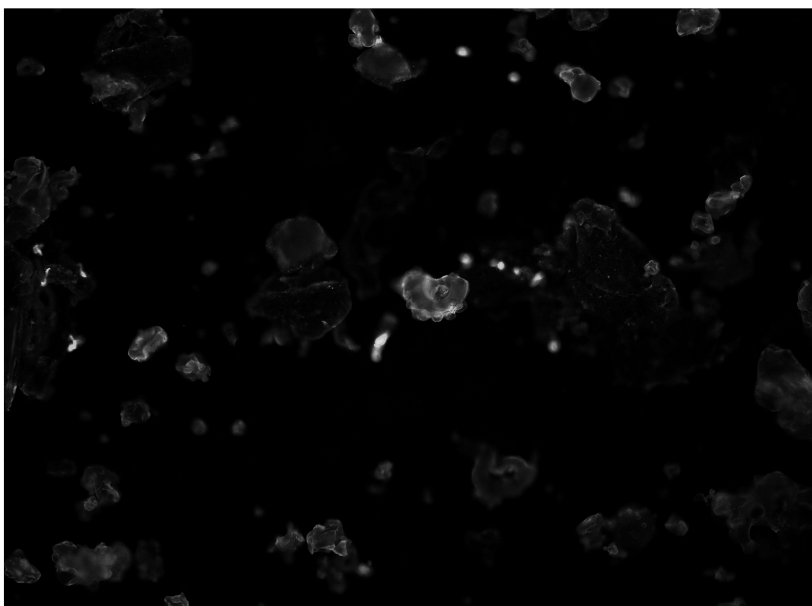
Keywords: *allergy; fluorescent IHC; fluorochromes*

Úvod

Sójové bílkoviny jsou široce používány po celém světě díky jejich výživové hodnotě, funkčním vlastnostem nízkým nákladům na pěstování a snadnou využitelnost pro technologické zpracování, což umožňuje použití sojové bílkoviny v celé řadě potravinářských výrobků. (Saz and Marina, 2007). Na druhou stranu je však sója spolu s kravským mlékem, vejci, pšenicí, arašídý, ořechy, rybami, korýši a měkkýši odpovědná za přibližně 90 % potravinových alergií a patří také mezi potraviny způsobující anafylaxi (Sicherer and Sampson, 2000). Potravinové alergie postihují až 2,5 % dospělé populace a 6 až 8 % dětí do 3 let věku, u nichž mohou být spojeny s morbiditou a mortalitou (Bock, 1987). Alergické reakce na potraviny jsou u citlivých jedinců zprostředkovány imunitním systémem a jsou obvykle iniciovány proteiny. Dosud bylo v sóji nalezeno 21 alergenních bílkovin (Wilson *et al.*, 2005). Tři z nich a to bílkovina Gly m Bd 60 kDa, Gly m Bd 30 kDa a Gly m Bd 28 kDa, jsou hlavními sojovými alergenními proteiny (Ogawa *et al.* 2000). Alergie na sojové boby a sojové produkty byla dlouhou dobu podceňována. Sojová bílkovina byla zaváděna do stravy již malých dětí a byla používána jako standardní kojenecká výživa. Tato praxe je dnes znemožňována skutečností, že sója je řazena mezi důležité potravinové alergen. Podle směrnice Evropské unie 2000/13/ES musí být potravinářské výrobky obsahující bílkoviny sóji označeny za účelem ochrany alergických spotřebitele. Navzdory platné legislativě, však může být sója bezděčně přítomna v potravinách a to prostřednictvím mnoha cest, protože potravinářská výroba je stále složitější a v rámci jednoho zařízení je vyráběno více výrobků. Pak je možný výskyt alergenu v potravine v důsledku nesprávného označení potraviny, nesprávné manipulace, křížové kontaminace či nedostatečných nebo neúčinných sanitačních a čistících postupů (Jackson, 2009). Jako preventivní opatření tedy výrobci potravin často umisťují na obal potravinářských výrobků upozornění, že výrobek "může obsahovat" určitý alergen. Takto je však značně omezena škála potravinářských produktů vhodných pro alergické spotřebitele. Je tedy nejen v zájmu alergického spotřebitele, ale také v ekonomickém zájmu výrobce potraviny, aby byla zaručena nepřítomnost alergenů v potravinách. Proto jsou nezbytné analytické nástroje pro spolehlivou a přesnou detekci a kvantifikaci alergenů v potravinách (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Materiál a metodika

Metodou průkazu byla zvolena fluorescenční imunohistochemie. Vyšetřovaným materiálem byl čistý sójový protein. K průkazu křížové reakce s nejčastějším potravinovým alergenem byla použita směs sójové bílkoviny s pšeničnou v poměru 1:1. Vzorky byly připraveny technikou parafinových řezů. Pro každý vzorek byl připraven 1 bloček, z něhož bylo připraveno 24 náhodně vybraných řezů tloušťky 5 μm z každého bločku s prokrajováním 50 μm . Vlastní zpracování bylo z důvodu přizpůsobení prostředí pro úspěšnou vazbu antigen – protilátka zahájeno odparafinováním řezů a sestupnou alkoholovou řadou byly vzorky převedeny do vodního prostředí. Pro vlastní vyšetření byla zvolena metoda avidin biotin komplexu (ABC). Blokace endogenní peroxidázy byla provedena 3% roztokem peroxidu vodíku v PBS. Blokace nespecifické vazby byla provedena pomocí Goat diulent normal séra po dobu 30 minut v ředění 3:200. Po té byla na řezy aplikována biotinylovaná primární protilátka anti-soya (Sigma Aldrich) v ředění 1:500 a po ní protilátka sekundární ředená 3:200. Následovala aplikace fluorochromů. Fluorochromy byly použity čtyři a to FITC (ředění 1:250), Texas Red, AMCA a Fluorescein streptavidin (všechny ředěny 1:200). Každý z fluorochromů byl aplikován na 6 řezů pro čistou sójovou bílkovinu a na 6 řezů pro směs bílkoviny sójové a pšeničné. Jako montovací médium bylo použito Vectashield mounting medium fluorescence. Následovalo vyšetření pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica type-11307072057/BZ:09 a dále zpracování programem Leica IM 50 na pracovišti AV ČR Brno.



Obrázek 1: Sójový a pšeničný protein obarvený Fluoresceinem, zvětšení 100x

Výsledky a diskuse

Fluorescenční imunohistochemickou metodou bylo vyšetřeno celkem 24 řezů čistého sójového proteinu a 24 řezů směsných vzorků sóje s pšeničnou bílkovinou v poměru 1:1. Tyto postupy jsou založeny na reakci mezi alergenem a příslušnou značenou protilátkou. Navázání značené protilátky bylo hodnoceno ve fluorescenčním mikroskopu s příslušným filtrem. Pro fluorochromy FITC a Fluorescein streptavidin byl použit filtr zelený, pro Texas Red červený a pro fluorescein AMCA modrý filtr (Biocompare, 2005). Vyšetření bylo založeno na vytvoření fluorescenčního zbarvení,

kteře signalizuje pozitivní reakci antigenu s protilátkou. Průkaz sójové bílkoviny byl pozitivní jak ve vzorcích, kde byla přítomna pouze čistá sójová bílkovina tak ve vzorcích směsi sójové a pšeničné bílkoviny, ve kterých pšeničná bílkovina fluoreskovala velice slabě na rozdíl od bílkoviny sójové. Ve směsných preparátech bylo také možné odlišení těchto dvou bílkovin na základě jejich morfologické struktury, kdy sójová bílkovina má charakteristický tvar prstencovitých, popř. srpovitých až kruhovitých částic (Horn, 1987) a naopak protein pšeničný má tvar houbovitý (Lukášková Řezáčová *et al.*, 2011) viz obrázek 1.

Závěr

Alergeny představují závažný zdravotní problém a proto je nutná jejich správná detekce. Analytické metody vhodné pro detekci alergenů musí mít vysokou citlivost, specifčnost a dostatečnou robustnost. Jednou z těchto metod by mohla být fluorescenční imunohistochemie. Pomocí této metody jsme na základě vizuálního barevného odlišení od pozadí a znalosti morfologické struktury byli schopni detekovat sójový protein ve směsi s proteinem pšeničným, čímž byl prokázán správný výběr protilátek. Pro použití této metody v praxi je však nutné testování této metody na modelových vzorcích a na finálních potravinách.

Literatura

- Biocompare* [online]. United States of America: biocompare, December 12, 2005 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: http://www.biocompare.com/documents/fluor_wavelengths.pdf
- BOCK, S. A. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, 1987, vol. 79, no. 5, p. 683–688.
- HORN, D. Zum Nachweis pflanzlicher Eiweisszubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. *Fleischwirtschaft*. 1987, vol. 67 no. 5, p. 616 – 618.
- JACKSON, L. S. Chemical food safety issues in the United States: past, present, and future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, vol. 57, p. 8161–8170.
- LUKÁŠKOVÁ ŘEZÁČOVÁ, Z., TREMLOVÁ, B., POSPIECH, M., RENČOVÁ, E., RANDULOVÁ, Z., STEINHAUSER, L., REICHOVÁ, A., BEDNÁŘ, J. Comparison of immunohistochemical, histochemical and immunochemical methods for the detection of wheat protein allergens in meat samples and cooked, dry, raw and fermented sausage samples, *Food Additives & Contaminants*, 2001, vol. 28, no. 7, p. 817 — 825.
- OGAWA, T., SAMOTO, M., TAKAHASHI, K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2000, vol. 46, p. 271–279.
- SAZ, J. M., MARINA, M. L. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, p. 431–451.
- SCHUBERT-ULLRICH, P., RUDOLF, J., ANSARI, P., GALLER, B., FUHRER, M., MOLINELLI, A., BAUMGARTNER, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, vol. 395, no. 1, p. 69–81.
- SICHERER, S. H., SAMPSON, H. A. Peanut and tree nut allergy. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2000, vol. 12, no. 6, p. 567–573.
- WILSON, S., BLASCHEK, K., DE MEJIA, E. G. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. *Nutrition Reviews*, 2005, vol. 63, p. 47–58.

Kontaktní adresa: Michaela Talandová, Mgr., Ústav vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Talandovam@seznam.cz

Differences in growth performance and chemical body composition of two ROSS 308 and COBB 500 hybrids at the end of the fattening period

¹Vopálenský Josef, ¹Macháček Miroslav, ¹Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹ Department of Animal Husbandry and Animal Hygiene, FVHE VFU Brno

²Department of Animal Nutrition, FVHE VFU Brno

Summary

The objective of the study was to investigate whether there are differences in growth performance and chemical body composition of two ROSS and COBB hybrid combinations of chickens at the end of the fattening period at 40 days of age. Chickens of the hybrid combination ROSS showed statistically highly significantly ($P \leq 0.01$) and significantly ($P \leq 0.05$) higher mean live body weight as compared to the COBB chickens during the fattening period, which demonstrates their higher growth performance. Except for days 1 – 5 during which lower conversion of feed mixture in COBB chickens was observed, the conversion of feed mixture during the total fattening period was almost comparable. Regarding the monitored parameters of chemical composition and energy value of chickens' bodies (dry matter, nitrogenous substances - NS, fat, ash, Ca, P, Mg and gross energy), higher mean values of NS and Mg (statistically highly significant difference, $P \leq 0.01$) and of Ca (statistically significant difference, $P \leq 0.05$) were observed in COBB chickens in comparison to ROSS chickens.

Key words: fattening chickens; body weight development; content of dry matter; nitrogenous substances; fat; ash; Ca; P; Mg and gross energy of chickens' bodies

Introduction

Nowadays, there is a lack of scientific information on chemical body composition of chickens during their fattening. Most of the studies present chemical composition or energy content only in those parts of bodies that are consumed, especially in muscles, or authors compare differences in individual types of muscles such as breast and thigh. Chemical composition of muscles is discussed in publications such as Suchý et al. (2002), in which authors conclude that breast muscle can be characterized by higher protein content (22.5 – 22.7 %), higher dry matter content (25.8 – 26.0 %) and lower fat content (2.1 – 2.5 %). On the contrary, thigh muscle can be characterized by higher dry matter content (28.5 – 28.6 %) and fat (8.9 – 9.3 %). The chemical composition of whole body is presented by Mavromichalis et al. (2000). The authors present the content of dry matter 31.3 %, protein 19.3 % and lipids 25 and 30 %. Especially the fat content is very variable as it depends on many factors such as age, sex and anatomical origin of the meat (Klíma, 1996). As Matušovičová (1986) shows, in poultry, more fat is contained in thigh muscle than in breast muscle. According to Simeonovová (1999), thigh muscles contain more fat. Matušovičová (1986) showed statistically significant negative correlation between fat and protein content in the muscles.

Material and Methods

The objective of the presented study was to investigate whether there are differences in growth performance, conversion of feed mixture, chemical composition and energy value of bodies of chickens of two world's most important hybrids ROSS and COBB.

The experiment was performed at the experimental accredited animal house at the Department of Animal Nutrition, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. ROSS 308 and COBB 500 chickens were divided into two groups. Each group included 300 chickens, 150 hens and 150 cockerels. In the course of the fattening period, chickens of both sexes were given identical feed mixtures BR1, BR2 and BR3. Chickens were weighed during the fattening period after each 5 days (days 5, 9, 15, 20, 25, 30, 35 and 40) and the mean live weight of chickens in individual stages of fattening was calculated. On day 40 of the fattening (fattening termination), 40 chickens randomly selected from each group were killed after 24 hours of fasting. Their bodies were completely homogenized in the cutter, the homogeniser was weighed and dried and after drying, it was ground to the form appropriate for further analysis. Within the experiment, we determined dry matter content, content of nitrogenous substances (N x 6.25), contents of fat, ash, Ca, P, Mg and gross energy (GE) in the homogenate samples. The acquired results were processed using the statistical programme Unistat CZ, version 5.6 for Excel, in which we evaluated mean values and their differences using multiple comparisons by Tukey's HSD, at the level of significance $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Results of the experiment show (Figure 1) that chickens of the ROSS hybrid combination have statistically highly significantly ($P \leq 0.01$) and significantly ($P \leq 0.05$) higher weight, at the same rearing conditions and level of nutrition, in comparison to COBB chickens.

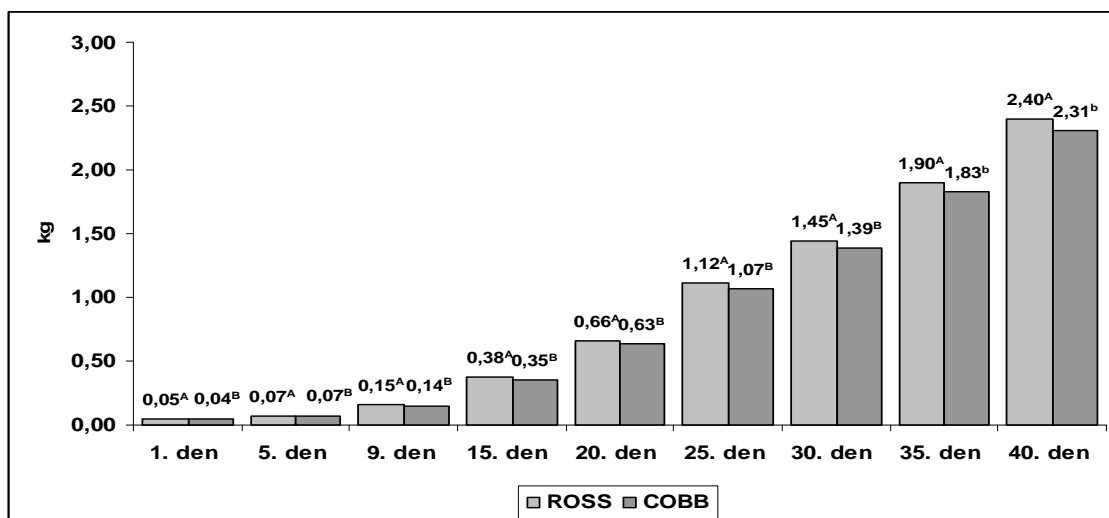


Figure 1: Development of live weight in broiler chickens of two hybrid combinations COBB and ROSS (AB $P \leq 0.01$, Ab $P \leq 0.05$)

Higher mean live weight of ROSS chickens during the fattening also demonstrates their higher growth performance in comparison to chickens of COBB hybrid combination. As documented by Table 1, the found values of live weight were reached at the non-significantly different conversion of feed mixture between the hybrid combinations. The exception was only the period until 5 days of age when COBB chickens showed lower conversion in comparison to ROSS chickens.

Table 1: Conversion of feed mixture during the fattening in two hybrid combinations of chickens – ROSS and COBB

	<i>Days 1-9</i>	<i>Days 1-5</i>	<i>Days 1-15</i>	<i>Days 1-20</i>	<i>Days 1-26</i>	<i>Days 1-30</i>	<i>Days 1-35</i>	<i>Days 1-40</i>
ROSS	1.449	1.458	1.499	1.587	1.680	1.750	1.856	1.943
COBB	1.446	1.311	1.527	1.606	1.696	1.764	1.856	1.932

It results from the chemical analyses (Table 2) that body of COBB chickens has highly significantly ($P \leq 0.01$) higher content of nitrogenous substances (NS) and magnesium (Mg) and significantly higher ($P \leq 0.05$) calcium content (Ca). In other parameters of chemical body composition including gross energy (GE), statistically significant differences were not found between the tested hybrids.

Table 2: Differences in mean values of chemical composition and energy value in bodies of two hybrid combinations of chickens – ROSS and COBB (SD-standard deviation, AB $P \leq 0.01$, Ab $P \leq 0.05$)

<i>Group</i>	<i>Dry matter</i>	<i>Nitrogenous substances</i>	<i>Fat</i>	<i>Ash</i>	<i>Ca</i>	<i>P</i>	<i>Mg</i>	<i>GE</i>
ROSS	376.54	170.04^A	165.01	23.21	6.09^A	5.49	0.23^A	10.77
<i>SD</i>	± 20.714	± 9.329	± 20.481	± 1.935	± 0.378	± 6.472	± 0.027	± 0.907
COBB	378.21	177.79^B	167.18	22.83	6.26^b	4.18	0.27^B	10.84
<i>SD</i>	± 15.639	± 10.285	± 18.281	± 2.188	± 0.294	± 0.408	± 0.050	± 0.672

It follows from the results of chemical composition that in comparison to muscles as shown by Suchý et al. (2002), it contains less proteins (NS) and more fat, at higher dry matter content. Our results correspond rather to the chemical values for total body as presented by Mavromichalis et al. (2000).

Acknowledgements

This study was supported by the Research plan MŠMT ČR MSM 6215712402 „Veterinary aspects of food safety and quality“.

References

- Klíma D (1996) Živočišné tuky. In Maso, č. 6, s. 3-5
- Matušovičová E (1986) Technológia hydinárskeho priemyslu. Bratislava: Príroda, 1. vydání, s. 393
- Mavromichalis I, Emmert JL, Aoyagi S, Baker DH (2000): Chemical Composition of Whole Body, Tissues, and Organs of Zouny Chickens. Journal of Food Composition and Analysis, vol. 13, no. 5, p. 799-807
- Simeonovová J (1999) Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů. Brno: MZLU s. 247
- Suchý P, Jelínek P, Straková E, Hucl J (2002): Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. Czech Journal of Animal Science, vol. 47, no. 12, p. 511–518

Contact address: Josef Vopálenský, Ing., VFU Brno, FVHE, Department of Animal Husbandry and Animal Hygiene, Palackého1/3, 612 42 Brno, e-mail: j112@seznam.cz

Rozdíl v chemickém složení prsní a stehenní svaloviny orebice chukar (*Alectoris chukar*)

The difference in the chemical composition of breast and thigh muscle of chukar partridge (*Alectoris chukar*)

¹Jůzl Radovan, ²Rusníková Lucie, ¹Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹Ústav zootechniky a zoohygieny, FVHE, VFU Brno

²Ústav výživy zvířat, FVHE, VFU Brno

Summary

*The aim of our study was to evaluate the chemical composition as regards the breast and thigh muscle of chukar partridge (*Alectoris chukar*) under intensive fattening conditions. In experimental animals, we first watched their live weight within 90 days of fattening for a total of 60 experimental animals (hens and roosters). Average values of live weight were increasing in the course of fattening; no large growth was recorded towards its end whereas the live weight in the 90th day of age reached 0.452 kg. In the 90th day of age after the fattening was finished, 30 subjects were selected to monitor the carcass yield. Regarding the obtained samples of breast and thigh muscles, it was performed a chemical analysis which showed a statistically very significant difference ($P \leq 0.01$) between the breast and thigh muscle, specifically as for the following analyzed indicators: crude protein, fat, ash, gross energy. The calcium content demonstrated a significant difference ($P \leq 0.05$). These results were compared with outcomes available in literature. Due to the lack of published work on the chemical analysis of partridge meat, we compared the results also with studies addressing the chemical composition of meat from broiler chickens and pheasants.*

Keywords: *meat; intensive fattening; chemical analysis; feathered game*

Úvod

Cílem naší práce bylo stanovit chemické složení masa orebice chukar a popsat rozdíly mezi prsní a stehenní svalovinou. V našich podmínkách orebice nepatří mezi tradičně odchovávanou pernatou zvěř, jako je tomu u bažanta, stejně tak není zaveden intenzivní výkrm orebic, podobný výkrmu brojlerových kuřat. Orebice jsou chovány pouze k zájmovým účelům a i výzkum v oblasti odchovu a výkrmu je ve srovnání s jinými druhy pernaté zvěře omezený, ačkoli zájem o maso orebic k lidské spotřebě stoupá (Gulsen et al., 2010). Výkrmem orebic se zabývá několik autorů, jejich práce jsou však zaměřeny především na složení krmné směsi (Cufadar et al., 2010; Ůzek 2006). Existují ale práce, hodnotící obsah mastných kyselin ve svalovině orebic (Gulsen et al., 2010). Zaměřili jsme se tedy na srovnání chemického složení masa orebic s masem brojlerových a bažantích kuřat. Složení prsní a stehenní svaloviny u brojlerových kuřat se od sebe liší. Prsní svalovina obsahuje více hrubého proteinu (CP), popelovin a fosforu a méně sušiny, tuku a vápníku oproti svalovině stehenní (Suchý et al., 2002). Prsní i stehenní svalovina bažanta obsahuje více CP a fosforu, méně tuku a vápníku než u brojlerových kuřat (Večerek et al., 2005). Obsah hrubé energie (BE) v prsní a stehenní svalovině je nejnižší u orebice, následuje bažant a nejvyšších hodnot BE bylo dosaženo u brojlera. U všech druhů byly zjištěny vyšší hodnoty BE u stehenní svaloviny (Vitula et al., 2011).

Materiál a metodika

Jako materiál sloužily vzorky masa orebic, a to konkrétně stehenní a prsní svalovina. Tyto vzorky pocházely z biologického pokusu, realizovaného v roce 2010 v experimentální stáji Ústavu výživy, zootechniky a zoohygieny, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Zmíněný pokus byl založen na 90 denním intenzivním výkrmu 60 jedinců (slepičky i kohoutci) orebice chukar. Pokusná zvířata byla krmena kompletními krmnými směsmi, které jsou komerčně dostupné k výkrmu brojlerových kuřat. Od 1. do 20. dne věku byla použita krmná směs (KS) BR 1 ve složení sušiny: dusíkaté látky (NL) 235,4 g.kg⁻¹, tuk 47,8 g.kg⁻¹, popel 58,9 g.kg⁻¹, ME 13,6 MJ.kg⁻¹. Od 20. do 81. dne věku byla použita KS BR 2 ve složení sušiny: NL 244,9 g.kg⁻¹, tuk 100,1 g.kg⁻¹, popel 62,0 g.kg⁻¹, ME 15,3 MJ.kg⁻¹. Od 81. do 90. dne KS BR 3 ve složení sušiny: NL 245,8 g.kg⁻¹, tuk 112,0 g.kg⁻¹, popel 63,6 g.kg⁻¹, ME 15,5 MJ.kg⁻¹. Orebice byly krmeny ad libitum a všechny typy KS byly granulované. Během pokusu nedošlo k úhynu. V průběhu výkrmu byla u pokusných zvířat sledována živá hmotnost. V 90. dnu věku bylo vybráno 30 jedinců, u kterých byly sledovány vybrané ukazatele prsní a stehenní svaloviny. V původní hmotě vzorku byla sledována sušina (g.kg⁻¹), v sušině vzorku byly následně sledovány tyto parametry: CP (g.kg⁻¹), tuk (g.kg⁻¹), popel (g.kg⁻¹), vápník (g.kg⁻¹), fosfor (g.kg⁻¹), hořčík (g.kg⁻¹), spalné teplo BE (MJ.kg⁻¹). Po stanovení předsušiny a sušiny v sušárně byl vzorek homogenizován a následně podroben dalším analýzám. Obsah dusíku byl stanoven dle Kjeldahla na přístroji Büchi Kjeldahl (Büchi). Vynásobením faktorem 6,25 jsme vyjádřili obsah CP ve vzorku (g.kg⁻¹). Tuk byl stanoven přístrojem ANKOM^{X^T10} Fat Analyzer (firma O.K. Servis BioPro). Popel (g.kg⁻¹) byl stanoven vázkově po zpopelnění při 550 °C v Muflové peci za předepsaných podmínek. Vápník, hořčík a fosfor (g.kg⁻¹) byly stanoveny z popela vzorku. Vápník a hořčík vyluhováním a následnou titrací, fosfor na spektrofotometru HELIOS α (firma Fisher Scientific, spol. s.r.o.). Spalné teplo bylo měřeno na kalorimetru AC 500 (firma Leco s.r.o. Plzeň). Bylo provedeno statistické hodnocení výsledků chemické analýzy pomocí programu Unistat (5.6 for Excel).

Výsledky

Provedená chemická analýza ukázala statisticky vysoce významný rozdíl ($P \leq 0.01$) mezi prsní a stehenní svalovinou a to konkrétně pro tyto sledované parametry: sušinu, CP, tuk, popel, BE. Byl prokázán statisticky významný rozdíl ($P \leq 0.05$) v obsahu vápníku. V obsahu fosforu a hořčíku nebyly prokázány statisticky významné rozdíly. Prsní svalovina obsahovala více sušiny, CP a vápníku. Stehenní svalovina obsahovala více tuku, popela, fosforu a BE. Při porovnávání s údaji v literatuře, které se týkají chemického složení masa brojlerových kuřat, je patrný rozdíl zejména v obsahu CP. Maso orebic obsahuje v prsní i stehenní svalovině menší množství tuku a fosforu a vyšší množství vápníku a CP. Stehenní svalovina orebic obsahuje více CP než stehenní svalovina bažanta.

Závěr

Z výsledků vyplývá rozdíl v chemickém složení prsní a stehenní svaloviny. Za hodnotnější partii JOT orebic by se dala považovat prsní svalovina, která stejně jako prsní svalovina brojlera nebo bažanta obsahuje vyšší množství CP a méně tuku, než svalovina stehenní. Tento fakt řadí maso orebic mezi nutričně ceněné maso pernaté zvěře. Výsledky jsou o to zajímavější, že nebylo použito speciálních krmných směsí pro

orebice, ani šlechtitelských metod ke zlepšení jatečné výtěžnosti a kvality masa, orebice byly pouze krmeny v intenzivních podmínkách.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 78/2011/FVHE.

Literatura

GULSEN, N., UMUCALILAR, H. D., KIRIKCI, K., HAYIRLI, A., AKTUMSEK, A., ALASAHAN, S. Sunflower oil supplementation alters meat quality but not performance of geowing partridges (*Alectoris chukar*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2010, vol. 24, no. 2, p. 196-203.

CUFADAR, Y., OLGUN, O., BAHTIYARCA, Y., YILDIZ, A. O. Effects of dietary energy and protein on performance, reproduction traits and nitrogen-excretion of breeder chukar partridges (*Alectoris chukar*). *Revue de Medicine Veterinaire*, 2010, vol. 161, no. 4, p. 151-156.

ÖZEK, K., The optimum protein content in high-energy starter diet for chukar partridge (*Alectoris chucar*). *International Journal of Poultry Science*, 2006, vol. 5, no. 6, p. 522-525.

SUCHÝ, P., JELÍNEK, P., STRAKOVÁ, E., HUCL, J. Chemical composition of muscles of hybrid broiler chicken during prolonged feeding. *Czech Journal of Animal Sciences*, 2002, vol. 47, no. 12, p. 511-518.

VEČEREK, V., SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E., VITULA, F., MIKUNDOVÁ, M. Variation in the chemical composition of muscles in young pheasants during their growth. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 2005, vol. 48, no 3, p. 290-298.

VITULA, F., SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E., KARASKOVÁ, K., ZAPLETAL, D., KROUPA, L. Energy value of meat in selected species of feathered game. *Acta Veterinaria Brno*, 2011, vol. 80, no. 2, p. 197-202.

Kontaktní adresa: Radovan Jůzl, Ing., Ústav zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, juzlr@vfu.cz

A comparison of the chemical composition of dry matter of breast and thigh muscles in fattened pheasant males and females at the age of 90 days

¹Karásková Kateřina, ¹Straková Eva, ¹Suchý Pavel, ²Jámbor Márk

¹*Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*
²*Állatorvosi rendelő Székesfehérvár*

Summary

*The article deals with a comparison of the chemical composition of dry matter of breast and thigh muscles in common pheasant (*Phasianus colchicus* L.) males and females at the age of 90 days with orientation to the content of nitrogen substances, fat, ash, calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg).*

Keywords: *pheasant; breast and thigh muscles; chemical composition*

Introduction

Meat belongs to the important foodstuff, its consumption in 2010 in the Czech Republic was 75.9 kg meat on the bone per one resident (Český statistický úřad, 2012). However, consumers are still more interested in the quality of the meat. According to the dietetic point of view it is possible to say that because of higher amount of proteins, lower amount of fat (Straková et al., 2010) and higher amount of essential fatty acids (Adamski et al., 2006, Uherova et al., 1992) the pheasant meat has higher nutritive value in comparison to the meat of broiler chickens.

These days the pheasant meat is possible to get especially from pheasants, which were reared on farms. Under intensive fattening pheasants can achieve approximately 90 % of final weight of adult animal during 90 days, in case that they are fed by common feed mixture for broiler chicken, their average daily weight gain is in range of 0.004 – 0.013 kg/day (Straková et al., 2005). The dressing percentage in 12-week-old pheasant males (on the weight of 937 g) is approximately 72.6 % and in pheasant females 71.6 % (on the weight of 710 g) (Adamski et al., 2006). However, Tucak et al.(2008) report that the quality of the meat of pheasants kept in aviaries has lower biological value than meat of pheasants grown in nature, respectively this meat has lower weight, lower content of proteins, water, calcium and it is higher in fat.

Composition of muscles is influenced by lots of factors, especially by animal species, function of muscles, its work and placement, and also by nutrition (Steinhauserová I, Steinhauser L, 2000). Many authors (Dordević et al., 2010, Sage et al., 2002, Ohlsson et al., 2001) in their studies monitored the influence of different amounts of crude protein in a pheasant diet on their growth and higher putting on weight. But these works are concerned only in one nutrient. Complete nutritional and energy requirements during time period of pheasant growing are still not expressed by current feed mixtures. Determination of exact nutritional requirements of pheasant can be achieved on the basis of complete knowledges of chemical composition of whole pheasant body. The aim of this study is a presentation of partial results, which will be used for completing of the chemical composition of whole pheasant body during its ontogenetic development.

Material and Methods

In total, dry matters of breast and thigh muscles from 80 common pheasant at the age of 90 days, i. e. 40 females and 40 males, were analysed. They were housed on a deep bedding in an approved experimental enclosure equipped stable with air conditioning, light and temperature controls and with controlled zoo-hygienic and feeding regimens at the Institute of Animal Nutrition.

Each sample was analysed on the content of crude protein by Kjehldal method (multiplied with a coefficient of 6.24, using the Buchi analyser, Centec automatika, spol. s. r. o.), the content of fat (using petrolether extraction and Ankom^{XT10} Fat Analyzer (O.K. SERVIS BioPro)), the content of ash (by weighing the residue after burning at 550 °C), the content of calcium (Ca), phosphorus (P) a magnesium (Mg) (by burning and infusing and by subsequent titration). To reach a higher state of objectivity, all results of analysed parameters are expressed in dry matter (g.kg⁻¹) of sample. The dry matter was determined by drying the sample at 103 ± 2°C to the constant weight.

Results and Discussion

Dry matter of breast and thigh muscles of common pheasant is composed mainly from nitrogen substances, fat, ash and minerals. It follows from the results, presented in Tables 1 and 2, that there are significant differences among contents of chemical substances in males and females. In dry matter of breast muscles in males is significantly higher amount of crude protein, also higher amount of fat and ash, on the contrary there is lower amount of calcium, phosphorus and magnesium compared to females.

Table 1: Chemical composition of dry matter of breast muscles in pheasant females and males at the age of 90 days

(g.kg ⁻¹)	n	Crude protein	Fat	Ash	Ca	P	Mg
Females	40	930.57 ± 26.839	29.58 ± 24.507	45.61 ± 1.401	0.67 ± 0.166	10.16 ± 0.367	1.56 ± 0.202
Males	40	937.23 ± 25.732	29.92 ± 20.570	45.78 ± 1.243	0.57 ± 0.066	9.72 ± 0.370	1.51 ± 0.141

Table 2: Chemical composition of dry matter of thigh muscles in pheasant females and males at the age of 90 days

(g.kg ⁻¹)	n	Crude protein	Fat	Ash	Ca	P	Mg
Females	40	781.80 ± 53.853	163.74 ± 56.035	46.52 ± 3.537	1.28 ± 0.174	9.31 ± 0.648	1.63 ± 0.203
Males	40	810.07 ± 80.856	140.71 ± 84.808	48.97 ± 5.512	1.32 ± 0.172	9.23 ± 0.905	1.56 ± 0.243

Dry matter of thigh muscles in males is significantly higher in the amount of crude protein, ash and calcium, on the contrary there is significantly lower amount of fat and also lower amount of phosphorus and magnesium. Similar findings in differences

among contents of chemical substances in breast and thigh muscles in pheasant males and females at the age of 90 days were also reported by Večerek et al. (2005).

Conclusion

On the basis of the results of chemical analysis of muscles from pheasant males and females can be concluded that there are significant differences in their chemical composition. These findings can be used in an extending of knowledges about chemical composition of the whole pheasant body and can be utilised in better specification of nutrition requirements of pheasant poult during their growing period.

Acknowledgements

This research was supported by IGA 88/2010/FVHE.

References

- ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. Spotřeba potravin 2010, [online]. c2012 [cit. 02.02.2012]. Dostupné z: <<http://www.czso.cz/csu/2011edicniplan.nsf/tab/53004FB2E4>>
- STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P., KROUPA, L., ZAPLETAL, D., STEINHAUSER, L. Nutriční hodnota proteinů svaloviny bažanta obecného (*Phasianus colchicus*). *Veterinářství* 2010, vol. 8, p. 466-468.
- ADAMSKI, M., KUZNIACKA, J. The effect of age and sex on slaughter traits of pheasants (*Phasianus colchicus* L.). *Animal Science Papers and Reports*. 2006, vol. 24, suppl. 2, p. 11-18.
- UHEROVA, R., BUCHTOVA, V., TAKACSOVA, M. Nutritional factors in game. *Fleischwirtschaft*. 1992, vol. 72, no. 8, p. 1155-1156.
- STRAKOVÁ, E., VITULA, F., SUCHÝ, P., VEČEREK, V. Growth intensity and carcass characteristics of fattened pheasant poult. *Krmiva*. 2005, vol. 47, no. 2, p. 73-82.
- TUCAK, Z., SKRIVANKO, M., POSAVCEVIC, S., PERISKIC, M., BOSKOVIC, I., JUMIC, V. The Influence of Keeping Pheasants in Captivity vs. Nature on the Biological Value of Meat and its Use in Human Nutrition. *Collegium Antropologicum*. 2008, vol. 32, no. 3, p. 959-962.
- STEINHAUSEROVÁ, I., STEINHAUSER, L. Chemické a biochemické složení svalu – masa. In Steinhauser, L. et al. *Produkce masa*. Brno: Last 2000, 2000, s. 24-36.
- DORDEVIČ, M., PEKEČ, S., POPOVIČ, Z., DORDEVIČ, N. Influence of dietary protein levels on production results and mortality in pheasants reared under controlled conditions. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2010, vol. 60, no. 1, p. 79-88.
- SAGE, R.B., PUTAALA, A., WOODBURN, M.I.A. Comparing growth and condition in post release juvenile common pheasants on different diets. *Poultry Science*. 2002, vol. 81, no. 8, p. 1199-1202.
- OHLSSON, T., SMITH, H.G. Early nutrition causes persistent effects on pheasant morphology. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2001, vol. 74, no. 2, p. 212-218.
- VEČEREK, V., SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E. Chemical composition of breast and thigh muscles in fattened pheasant poult. *Krmiva*. 2005, vol. 47, no. 3, p. 119-125.

Contact address: Kateřina Karásková, MVDr., Ústav výživy zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09015@vfu.cz

Effect of soybean and rapeseed components in the ration of dairy cows to milk fat profile of fatty acids

¹Ryšavý Jan, ²Křížová Ludmila, ¹Janštová Bohumíra

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. - Pracoviště Pohořelice

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of rapeseed and soybean diets of dairy cows on changes in milk fatty acid profile.

Keywords: fatty acids; milk; dairy cows

Introduction

Nutrition of dairy cows besides other factors significantly contributes to changes in the composition biological value, sensory and technological properties of milk. Therefore, not only the content of individual nutrients in the ration, but also the type of feed given, its quality and feeding technique affects the composition and quality of milk. The proportion of milk constituents is not constant, the largest changes are occurring in milk fat content (Illek, 1998). Milk fat usually contains a high proportion of saturated fatty acids (SFA, 70–75%), largely as a consequence of microbial biohydrogenation in the rumen, monounsaturated fatty acids (MUFA; 20–25%) and small amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFA; 5%), (Lock and Shingfield, 2004).

Currently, there is customer demand for unsaturated fatty acids (UFA), which are considered healthier than saturated fatty acids. For these reasons, there is also an effort to influence the profile of fatty acids (FAs) in milk fat. Soybean and rapeseed oils are commonly partially hydrogenated for use in commercial frying to decrease susceptibility to oxidative degradation. (Sanders, 2000).

Material and Methods

The experiment was carried out on four high-yielding lactating Holstein cows that were divided into 2 groups with similar milk yield. The control group of animals was fed a diet based on extruded rapeseed (C) while the experimental group of animals was fed a diet based on extruded full-fat soya (S). The experiment was carried out in the form of a cross-over design and was divided into 2 periods of 14 days. Each period consisted of a 11-d preliminary period and a 3-d experimental period. Cows were fed individually twice daily (6.30 and 16.30 h) *ad libitum*. Cows were milked twice a day (7.00 and 17.00 h). Milk yield was recorded at each milking. During the experimental period, samples of milk were taken at each milking for determination of basic constituents using infrared analyser (Bentley Instruments 2000, Bentley Instruments Inc., USA).

FA profile was determined as follows: extracted milk fat (50–60 mg) was dissolved in isooctane and homogenised in ultrasound. After the addition of sodium methanolate the mixture was heated under a reverse cooler. FA were released in the form of fatty acid methyl esters (FAMES) which were separated using a gas chromatograph HP 4890D (Hewlett-Packard, USA) with capillary column DB-23 (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm). FAMES were detected with the flame ionisation detector (FID) and identified according

to the retention times using external standards of fatty acids Supelco 37 component FAME Mix (Supelco, USA). For a list of determined fatty acids see Table 3.

Table 1: Composition of diet (g/kg, dry matter basis)

Components		C	S
Maize silage	g/kg	508	508
Lucerne hay	g/kg	92	92
Supplemental mixture R	g/kg	400	200
Supplemental mixture S	g/kg		200
Composition of supplemental mixtures			
Barley	g/kg	266.0	266.0
Oat	g/kg	266.0	266.0
Sugarbeet chippings	g/kg	150.0	96.0
Extruded full-fat soya	g/kg		336.0
Extruded rapeseed meal	g/kg	282.0	
Rapeseed oil	g/kg	10.5	
Sodium chloride (NaCl)	g/kg	5.5	4.0
Dicalciumphosphate (DCP)	g/kg	7.5	14.0
Limestone (CaCO ₃)	g/kg	10.5	11.6
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	g/kg	1.0	4.5
Magnesiumphosphate (MgP)	g/kg		0.9
Blend-s minerals	g/kg	0.5	0.5
Blend-s vitamins	g/kg	0.5	0.5
Total	g/kg	1000.0	1000.0

Table 2: Dry matter intake and milk yield and composition

	Units	R	S	SEM
Dry matter intake	kg/d	16.763 *	17.844 *	0.284
Milk yield	kg/d	17.581 *	19.500 *	0.496
Fat	g/kg	44.903	44.903	1.110
Protein	g/kg	36.513 *	34.439 *	0.200
Lactose	g/kg	46.497 *	47.985 *	0.219
Urea	mg/100ml	16.545 *	19.415 *	0.477

* $P < 0,05$

Results and Discussion

Presented results are preliminary. Average daily dry matter intake was significantly different between groups ($P < 0.05$) as presented in Table 2. Milk yield and concentration of lactose and urea was higher in S than in R ($P < 0.05$). Concentration of fat was not affected by the treatment ($P > 0.05$). Profile of FA is presented in Table 3. C18:2 n6c and C20:0 was significantly different between groups ($P < 0.05$). The concentration of SFA determined in our study was not affected by the treatment but there was a tendency to higher levels in R ($P > 0.05$). These are different findings with reported by Komprda et al. (2000) or by Kudrna and Marounek (2006). C4:0, C6:0, C8:0 and C14:0 was not significantly different between groups. Nevertheless, Veselý et al. (2009) found different results. There was a tendency to higher levels in S, and these results are generally in agreement with Veselý et al. (2009).

Table 3: Profile of FA (%)

	R	S	SEM
C 4:0	0.540	0.599	0.051
C 6:0	0.348	0.381	0.044
C 8:0	0.263	0.269	0.028
C 10:0	1.260	1.248	0.095
C 12:0	2.781	2.695	0.107
C 14:0	11.496	11.545	0.209
C 16:0	39.003	38.313	0.558
C 18:0	11.581	11.184	0.421
C 18:2n6t	0.183	0.182	0.009
C 18:2 n6c	2.319*	2.603*	0.047
C 20:0	0.187*	0.154*	0.009
C 20:2	0.150	0.162	0.025
C 21:0	0.101	0.089	0.004
C 22:0	0.140	0.125	0.008
C 22:2	0.313	0.341	0.070
SFA ¹	69.502	68.316	0.398
MUFA ²	26.878	27.622	0.367
UFA ³	30.498	31.684	0.398
Short-chain ⁴	5.346	5.336	0.295
Medium-chain ⁵	56.081	55.554	0.732
Long-chain ⁶	38.574	39.110	0.825

* P < 0,05

¹SFA = saturated fatty acids, ²MUFA = monounsaturated fatty acids, ³UFA = unsaturated fatty acids, ⁴fatty acids with carbon length from C4 to C12, ⁵fatty acids with carbon length from C14 to C16, ⁶fatty acids with carbon length C18 and more

Conclusion

Rapeseed products have become dietary components frequently used in dairy cow nutrition as an adequate substitution of soybean products. The aim of the study was to compare the effect of extruded rapeseed and soyabean in diets of dairy cows on changes in the milk fatty acid profile.

Acknowledgments

This work was financially supported by project MSM 6215712402.

References available at author.

Contact address: Jan Ryšavý, Ing., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, h10021@vfu.cz

Vplyv parenterálnej aplikácie selénu a vitamínu E na zdravotný stav mliečnej žľazy jalovíc počas peripartálneho obdobia

Effect of parenteral application of selenium and vitamin E on health status of mammary gland primipary cows during periparturition period

¹Zigo František, ¹Vasil' Milan, ¹Elečko Juraj, ¹Farkašová Zuzana, ²Lešková Lenka

¹Ústav chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

²Klinika prežívavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

Summary

This study focuses about effect of parenteral administration of Selenium (Se) and vitamin E (vit. E) on the concentration Se and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood of primipary cows before and after parturition and their effect on the reduction of clinical mastitis during 22 days after parturition. From 35 primipary holstein cows were randomly selected control group, 1st and 2nd experimental group (in every group were 8 cows). All cows were fed with the diet containing only 0.1 mg of Se per kg. The blood samples from vena jugularis were collected approximately 12 to 14 days before calving (control sampling), 1 to 3 days after calving, approx. 10 to 12 days and approx. 20 to 22 days after calving. The same day after control sampling (12 to 14 before calving) were injected subcutaneous in 1st group Selevit inj. a. u. v. and Erevit 300 sol. inj a. u. v. at the doses 33 mg/cow and vit. E 1000 I.U./cow. The 2nd group were injected equivalent preparations at the doses of Se 22 mg/cow and vit. E 1000 I.U./cow. The changes on the concentration of Se and activity of GSH-Px in blood were in 1st group (with the maximal doses of Se) on the 1 to 3 days after calving and reduction of occurrence clinical mastitis were 12.5% in comparing with control group. In 2nd group weren't observed changes on the concentration of Se and the activity of GSH-Px in blood and occurrence of clinical mastitis in the 2nd group were equal (25%) as in control group.

Keywords: selenium; vitamin E; glutathione peroxidase; primipary cows; mastitis

Úvod

Medzi preventívne opatrenia znižujúce chorobnosť kráv a výskyt mastitíd počas jednotlivých fáz laktácie patrí aj výživa vyváženou kŕmnom dávkou, ktorá zabezpečuje optimálny metabolizmus a podporuje prirodzené obranné mechanizmy mliečnej žľazy. Medzi najúčinnějšíe antioxidantné nutrienty, ktoré sú často deficientné v kŕmnych zmesiach, patria zlúčeniny selénu (Se) a vitamínu E (vit. E) (Pavlata a i., 2001).

Avšak aj dostatočná, prípadne zvýšená suplementácia Se a vit. E, v kŕmnej dávke len pomaly ovplyvňuje zvyšovanie plazmatických koncentrácií Se a α -tokoferolu, v porovnaní s parenterálnou aplikáciou ich syntetických foriem. Touto aplikáciou je možné efektívnejšie riešiť akútne požiadavky organizmu dojníc v peripartálnom období. Injekčná aplikácia Se a vitamínu E je považovaná za najvhodnejšie riešenie v prípadoch, keď sa perorálnou suplementáciou nedarí eliminovať zníženú koncentráciu α -tokoferolu a Se v krvnej plazme počas peripartálneho obdobia (Pavlata a i., 2001; Vasil' a i., 2011).

Materiál a metódy

Zo stáda holštajnských jalovíc o priemernom počte 35 kusov, voľne ustajnených, boli náhodne vybrané tri skupiny (každú skupinu tvorilo 8 kusov jalovíc), ktoré boli

v poslednej fáze gravidity. Medzi 12-14 dňom pred očakávaným pôrodom bola odobratá všetkým vybraným jaloviciam krv (5ml) z *vena jugularis* do heparinizovaných skúmaviek (lithium heparin), (Gama, České Budejovice, Czech Republic) a krvné sérum z odobratej krvi sa získalo jej sedimentáciou pri izbovej teplote po dobu 20 min. a následnej centrifugácii pri 3000 ot. počas 15 min a všetky vzorky boli uskladnené pri -24 °C do analýzy. Po vlhkej mineralizácii vzoriek krvného séra v mikrovlnnej rúre (Perkin Elmer, LS 1200, Massachusetts, USA), bola koncentrácia selénu stanovovaná podľa Bax a kol. (1986) atómovým absorbným spektrometrom (Perkin Elmer, Zeman 4000) vybaveným hydridy generujúcim systémom. Aktivita GSH-Px v krvi bola stanovená pomocou kitov Glutathione peroxidase assay kit (Randox-Ransel, UK) podľa Paglia a Valentina (1967).

Následne bol prvej skupine jalovic subkutánne jednorázovo podaný Selevit inj. a. u. v. (Biotika a.s., Slovakia) a to v dávke 15 ml/ks spolu s Erevit 300 sol. inj. (Biotika a.s., Slovakia) v dávke 2,1 ml/ks a druhej skupine v dávke 10 ml/ks (Selevit inj. a. u. v.) a 2,5 ml/ks (Erevit 300 sol. inj.). Tretia kontrolná skupina jalovic spolu s ostatnými dvoma skupinami dostávala krmnu dávku s obsahom selénu do 0,1 mg/kg sušiny bez parenterálnej aplikácie injekčných prípravkov. V jednotlivých intervaloch po pôrode (1–3 dní, 10–12 dní a 20–22 dní) bola tým istým spôsobom odobratá krv všetkým skupinám jalovic a boli stanovené jednotlivé analýzy ako počas prvého odberu pred pôrodom. Všetky skupiny jalovic boli do 20–22 dní po pôrode vyšetrené komplexne (klinické vyšetrenie vemena, mlieko z každej štvrte NK-testom (Bioveta a.s., Czech Republic) a mikrobiologicky – izolácia, kultivácia a identifikácia bakteriálnych pôvodcov) podľa Vasiľa (2004).

Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené podľa ANOVA testu. Jednocestnou Anovou (one-way Anova) použitím Dunettovho testu boli porovnávané priemerné hodnoty obsahu Se a aktivity GSH-Px v krvi prvej a druhej skupiny oproti kontrolnej skupine jalovic a signifikantné zmeny boli vyhodnotené ako $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$.

Výsledky

V sledovaných skupinách jalovic sa výskyt mastitíd pohyboval od 12,5% (prvá skupina) do 25% (druhá a kontrolná skupina jalovic) v čase do 20–22 dní po pôrode. V prvej skupine s najvyššou podanou dávkou Se a vitamínu E bol zaznamenaný 1 mastitídny prípad, čo je o 12,5% nižší výskyt klinických mastitíd oproti druhej a kontrolnej skupine (2 prípady výskytu mastitíd).

Tabuľka 3: Vplyv parenterálnej aplikácie Se a vit. E jaloviciam 12 dní pred očakávaným pôrodom na výskyt klinických mastitíd počas prvej fázy laktácie oproti kontrolnej skupine

Skupina dojníc	Deň parent. aplik. Se a vit.E	Dávka Se mg/ks	Dávka vit. E IU/ks	Výskyt KM v jed. skup. v %	% zníž. KM/sled. obd.
J1 (N=8)	12	33	1000	12,5	o 12,5 / 22 dní
J2 (N=8)	12	22	1000	25	o NZ / 22 dní
C (N=8)	BPA	BPA	BPA	25	—

C - kontrolná skupina dojníc, BPA - bez parenterálnej aplikácie so štandardnou krmnou dávkou 0,1 mg/kg sušiny, KM – klinické mastitídy, NZ- neboli zaznamenané rozdiely oproti kontrolnej skupine, BPA – bez parenterálnej aplikácie

Priemerná koncentrácia Se v krvnom sére jalovíc bola zvýšená len u prvej skupiny jalovíc v porovnaní s kontrolnou skupinou dojníc (bez parenterálnej aplikácie Se a vit. E) po parenterálnom podaní Se a vit. E a to najmä na 1-3 deň po pôrode. U druhej skupiny dojníc sme nezaznamenali signifikantné zmeny oproti kontrolnej skupine dojníc.

Tabuľka 1: Vplyv parenterálnej aplikácie Se a vit. E jaloviciam na priemerné koncentrácie Se ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) v krvnom sére v peripartálnom období

Skupina		C (N=8)		J1 (N=8)		J2 (N=8)	
Se	Deň	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.
	12-14 pred pôrodom	0,82	0,064	0,82	0,079	0,80	0,151
	1-3 po otelení	0,78	0,071	1,04^a	0,09	0,90	0,152
	10 – 12 po pôrode	0,76	0,062	0,85	0,099	0,84	0,120
	20 - 22 po pôrode	0,79	0,05	0,85	0,085	0,78	0,041

J1 – jalovice s dávkou 15 ml/ks (Selevit inj. ad us. vet.) a 2,1 ml/ks (Erevit 300 sol. inj.)

J2 - jalovice s dávkou 10 ml/ks (Selevit inj. ad us. vet.) a 2,5 ml/ks (Erevit 300 sol. inj.)

C – kontrolná skupina jalovíc bez parenterálnej aplikácie, x- priemerná hodnota z počtu (N) 8 jalovíc

S.D. – smerodajná odchýlka, ^a – extrémne signifikant (P<0,001)

Priemerná aktivita GSH-Px v krvi u prvej a druhej skupiny jalovíc počas celého sledovaného obdobia nebola zvýšená v porovnaní s kontrolnou skupinou (bez parenterálnej aplikácie Se a vit. E) .

Tabuľka 2: Vplyv parenterálnej aplikácie Se a vit. E jaloviciam na priemernú aktivitu GSH-Px ($\mu\text{kat. l}^{-1}$) v krvi v peripartálnom období

Skupina		C (N=8)		J1 (N=8)		J2 (N=8)	
GSH-Px	Deň	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.
	12-14 pred pôrodom	709,3	79,95	736,4	70,25	708,9	92,91
	1-3 po otelení	681,4	72,13	784,0	106,9	769,9	133,4
	10 – 12 po pôrode	697,8	66,45	712,7	103,1	726,4	67,66
	20-22 po pôrode	702,0	55,49	703,6	55,93	692,1	48,18

J1 – jalovice s dávkou 15 ml/ks (Selevit inj. ad us. vet.) a 2,1 ml/ks (Erevit 300 sol. inj.)

J2 - jalovice s dávkou 10 ml/ks (Selevit inj. ad us. vet.) a 2,5 ml/ks (Erevit 300 sol. inj.)

C – kontrolná skupina jalovíc bez parenterálnej aplikácie, x- priemerná hodnota z počtu (N) 8 jalovíc

S.D. – smerodajná odchýlka

Diskusia a záver

Jednu z najkomplexnejších štúdií týkajúcich sa imunity kráv proti výskytu klinických mastitíd a intramamárnych infekcií urobili autori Smith, Hogan a Weiss (1997), ktorí sledovali účinky vitamín E a Se na incidenciu a dĺžku trvania klinických mastitíd a intramamárnych infekcií. Z ich štúdií vyplýva, že ako účinné kombinácie selénu a vit. E na zníženie rizika výskytu klinických mastitíd možno označiť dávky selénu od 0,09 mg/kg ž.h. a 1,5-2 IU vitamínu E na kg ž.h./deň, ktoré môžu byť výrazným prostriedkom v prevencii infekcií mliečnej žľazy v peripartálnom období.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná projektom APVV-0629-07 a projektom APVV-0679-10.

Literatúra

BAX, D., PETERS, F.F., AGTERDENBO, J., VAN NOORT, J.P.M.: The determination of selenium with hydride generation AAS—II: The role of sodium borohydride and of hydrogen gas, 1986. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic spectroscopy*, Issue 3, 41:275-282.

SMITH K. L., HOGAN J. S., WEISS W. P.: Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. 1997. *J. Anim. Sci.*, 75:1659–1665.

PAVLATA, L., ILLEK, J., PECHOVÁ, A.: Blood and tissue selenium concentration in calves treated with inorganic or organic selenium compounds - a comparison. *Acta Veterinaria Brno*. 2001. 70: 19 - 26.

PAGLIA D. E., Valentine W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. 1967. *Journal Lab. Clin. Med.*70:158-169.

VASIL, M.: Zápaly mliečnej žľazy dojnic, Vyd. Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice, Elektronická verzia, 2004. ISBN 80-8077-005-0.

Kontaktná adresa: František Zigo, MVDr., Ústav chovu zvierat, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, zigo.f@azet.sk

Zmeny zloženia kolostra prasníc v prvých hodinách postpartálneho obdobia

Changes in the composition of colostrum of sows in the first hours postpartum

¹Ševčík Peter, ¹Ruzsíková Edina, ¹Kuruc Maroš, ²Bučko Ondřej, ²Petrák Juraj

¹Katedra výživy zvierat, ²Katedra špeciálnej zootechniky, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra, Slovenská republika

Summary

The aim of this study was to determine the changes in the composition of colostrum of sows in the first 10 hours after beginning of farrowing. Experiment was done on 18 Large White sows on 1st up to 5th litters. From each sow were taken 10 ml colostrum. Colostrum were taken just from one gland. Using apparatus MilkoScan FT 120 were analysed content of dry matter (%), fat (%), protein (%) and lactose (%). The concentration of dry matter were highest in 1. hour (24.51%) and increased to 10. hour on 18.33%. Fat concentration were in 1. hour 4.81%, in 5. hour 5.38% and in 10. hour 3.66%. Protein concentration were at the beginning of farrowing 14.82% and increased during 10 hours on 9.53%. Lactose concentration decreased during the first 10 hours after beginning of farrowing from 2.63% to 3.54%.

Keywords: sow; kolostrum; dry matter; fat; protein; lactose

Úvod

Hlavné faktory vplývajúce na produkciu mäsa pri ošípaných sú genetického a negenetického pôvodu. Výživa je jedným z najdôležitejších negenetických faktorov (Trakovická et al., 2005). Z hľadiska prežitia prasiatok je nevyhnutné, aby ihneď po narodení prijali kvalitné kolostrum bohaté na základné živiny a imunoglobulíny (Pajtáš et al., 2009). Kolostrum sa vytvára v mliečnej žľaze cicavcov už krátko pred pôrodom a je prvým výlučkom mliečnej žľazy bezprostredne po pôrode. Kolostrum sa vyznačuje vysokým obsahom živín a nenahraditeľných špecifických látok, ktorých obsah však s postupujúcim časom rýchlo klesá (Gálik et al., 2011). Vývoj koncentrácie živín v kolostre prasníc v čase je charakteristický výrazným poklesom obsahu bielkovín a sušiny a vzostupom obsahu tuku a laktózy (Klobasa et al., 1987). Význam kolostra pre prasiatka spočíva v termoregulácii, imunizácii a pôsobí aj na vývoj čreva (Le Dividich et al., 2005; Rooke a Bland, 2002; Xu et al., 2000). Faktorov ktoré ovplyvňujú zloženie a množstvo kolostra je veľa. Klaver et al. (1981) sledovali vplyv kondičného stavu prasníc a úrovne kŕmenia na jednotlivé zložky kolostra. Gálik a Rolinec (2011) tvrdia, že tiež fytoaditíva ovplyvňujú úžitkovosť neprežúvavcov. Zou et al. (1992) sledovali zloženie kolostra a mlieka ošípaných rôznych plemien. Cieľom tejto práce bolo sledovať zmeny v zložení kolostra prasníc v prvých hodinách postpartálneho obdobia.

Materiál a metódy

Do sledovania sme zaradili 18 prasníc plemena biela ušľachtilá s rôznou hmotnosťou a na rôznych vrhoch. Prasnice boli ustajnené na VPP Kolíňany, farma Žirany v pôrodných kotercoch s kliečkou. Od 5 dňa pred očakávaným prasením boli prasnice kŕmené voľne dostupnou kompletnou kŕmnom zmesou pre laktujúce prasnice OŠ-09. Vzorky kolostra (20 ml) sme odobrali ručným oddojením vždy iba z jedného hrudného vemienka do umelohmotných skúmaviek. Prvú vzorku kolostra (1.hodina) sme odobrali

jednu hodinu po narodení prvého prasiatka. Ďalšie vzorky kolostra sme odoberali 5. a 10. hodinu po narodení prvého prasiatka. Odobrané vzorky boli uskladnené v hlboko mraziacej skrini pri teplote - 20 °C. Obsah sušiny, tuku, bielkovín a laktózy sme stanovili na prístroji MilkoScan FT 120. Štatistické vyhodnotenie získaných výsledkov sme robili pomocou programu SAS Enterprise Guide 4.2 (SAS Institute Inc.).

Výsledky a diskusia

V tabuľke 1 sú uvedené zistené hodnoty zložiek kolostra prasníc.

Tabuľka 1: Zloženie kolostra prasníc v prvých hodinách postpartum (biela ušľachtilá)

	Sušina %	Tuk %	Bielkoviny %	Laktóza %
1. hodina	24,51	4,81	14,82	2,63
5. hodina	22,16	5,38	11,86	2,33
10. hodina	18,33	3,66	9,53	3,54

Problematikou základných zložiek kolostra, tuku, laktózy a bielkovín a ich transportom cez stenu tenkého čreva prasiatok sa zaoberali Danková et al. (2009). Obsah sušiny v kolostre prasníc je najvyšší na začiatku pôrodu. V prvých desiatich hodinách od začiatku pôrodu sme zaznamenali pokles obsahu sušiny v kolostre z 24,51 % na 18,33 %. Porovnateľné hodnoty obsahu sušiny v kolostre prasníc publikovali aj Klobasa et al. (1987), na začiatku pôrodu namerali 25,6 %-ný a po dvanástich hodinách 18,4 %-ný obsah sušiny. Obsah tuku v kolostre prasníc bol na 1. hodinu 4,81 % a do piatej hodiny sa zvýšil na 5,38 %. Na desiatu hodinu sme zaznamenali výrazný pokles v obsahu tuku v kolostre prasníc na hodnotu 3,66 %. Autori zaoberajúci sa obsahom tuku v kolostre a mlieku prasníc popisujú v období od pôrodu až do konca laktácie mierny vzostup v koncentrácii tuku (Čanakyová et al., 2009; Klobasa et al., 1987). Čanakyová et al. (2009) uvádza nasledovné hodnoty tuku v kolostre prasníc v prvých hodinách laktácie: 0.hodina 4,20 % a 12 hodina 4,55 % s miernym poklesom v 6 hodine na 4,08 % ako ďalej uvádzajú, negatívny vplyv na obsah tuku v kolostre má aplikácia oxytocínu prasniciam počas pôrodu. Nami stanovený obsah bielkovín (tabuľka 1) v kolostre prasníc sa pohybuje v podobných rozhraniach ako uvádzajú Klobása et al. (1987) a Csapó et al. (1996). Avšak Rolinec et al. (2009) stanovili vo svojich experimentoch vyššie hodnoty bielkovín v kolostre prasníc, 15,15 % na začiatku pôrodu a 13,20 % v dvanástej hodine po pôrode. Podobne ako tuk, tak sa aj obsah laktózy v priebehu laktácie zvyšuje (Klobasa et al., 1987). Obsahy laktózy stanovené v našom experimente (tabuľka 1) potvrdzujú predchádzajúce tvrdenie. Rolinec et al. (2008), Rolinec et al. (2008^a), Zou et al. (1992) a Klobasa et al. (1987) uvádzajú obsah laktózy v kolostre prasníc na začiatku pôrodu v rozmedzí 2,0 až 3,83 % a jej postupný vzostup v priebehu 12 hodín na hodnoty 3,86 až 5,1 %.

Záver

Obsah zložiek kolostra prasníc je veľmi rozdielny. Pri porovnaní zmien zložiek kolostra od 1. po 10. hodinu od začiatku pôrodu sme zistili tendenciu poklesu v obsahu sušiny, tuku a bielkovín a vzostup v obsahu laktózy.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená Grantovou agentúrou Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied: projekt č. 1/0662/11.

Literatúra

CSAPÓ, J.; MARTIN, T.G.; CSAPÓ-KISS, Z.S.; HÁZAS, Z. Protein, fats, vitamin and mineral concentrations in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days. In *International Dairy Journal*. 1996, vol. 6, s. 881-902.

ČANAKYOVÁ, Z.; ROLINEC, M.; KANKA, T.; DANKOVÁ, Z. Influence of oxytocin on farrowing process and on quality of sows colostrum. In *IV. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Nitra : SPU, 2009, s. 100-102.

DANKOVÁ, Z.; ČANAKYOVÁ, Z.; ROLINEC, M.; KANKA, T.; MINDEK, S. Postnatal transmission of colostrum lipids, lactose and total protein through enterocytes of the small intestine of piglets. In *XI. Konferencia mladých vedeckých pracovníkov s medzinárodnou účasťou*. Brno : VFU, 2009, s. 84-86.

GÁLIK, B.; BÍRO, D.; ŠIMKO, M.; JURÁČEK, M.; HORNIAKOVÁ, E.; ROLINEC, M. *Nutričná charakteristika krmív*. Nitra : SPU, 2011, 101 s.

GÁLIK, B.; ROLINEC, M. The effect of phytogenic feed additives on the performance of non-ruminants. In *International Ph.D. Workshop on Welfare, Biotechnology and Quality of Animal Production*. Book of abstract, 2011, s. 19.

KLAVER, J.; Van KEMPEN, G.J.M.; De LANGE, P.G.B.; VERSTEGEN, M.W.A.; BOER, H. Milk Composition and Daily Yield of Different Milk Components as Affected by Sow Condition and Lactation/Feeding Regimen. In *Journal of animal science*. 1981, vol. 52, s. 1091-1097.

KLOBASA, F.; WERHAHN, E.; BUTLER, J.E. Composition of Sow Milk During Lactation. In *Journal of animal science*. 1987, vol. 64, s. 1458-1466.

LE DIVIDICH, J.; ROOKE, J.A.; HERPIN, P. Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. In *Journal of Agricultural Science*. 2005, vol. 143, s. 469-485.

PAJTÁŠ, M.; BÍRO, D.; HORNIAKOVÁ, E.; BEŇUŠKA, N.; ŠIMKO, M.; JURÁČEK, M. *Výživa a kŕmenie zvierat terminologický náučný slovník*. Nitra : SPU, 2009, 150 s.

ROLINEC, M.; KANKA, T.; ČANAKYOVÁ, Z.; SLOBODOVÁ, Z. Oxytocin - the birth of sows - the quality of colostrum. In *X. Konferencia mladých vedeckých pracovníkov s medzinárodnou účasťou*. Brno : VFU, 2008, s. 67-69.

ROLINEC, M.; ŠŤASTNÝ, P.; KANKA, T. Influence of nutrition on health of neonatal pigs. In *Days of animal nutrition*. Nitra : SPU, 2008^a, 190-193.

ROLINEC, M.; MINDEK, S.; KANKA, T.; ČANAKYOVÁ, Z.; DANKOVÁ, Z.; SCHUBERTOVIÁ, Z. Effect of farrowing fortification on the content of proteins in sows colostrum. In *XI. Konferencia mladých vedeckých pracovníkov s medzinárodnou účasťou*. Brno : VFU, 2009, s. 72-74.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the newborn piglet. In *Livestock Production Science*. 2002, vol. 78, s. 13-23.

TRAKOVICKÁ, A.; BUJKO, J.; ŽITNÝ, J.; STRAPÁKOVÁ, E.; BOBČEK, B. Analýza genetických a negenetických faktorov na produkciu mäsa ošípaných. In: 4th International congress on Ethology in Animal Production. Nitra : SPU, Zborník referátov na CD-ROM, 2005, s. 212-217.

XU, R.J.; WANG, F.; ZHANG, S.H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. In *Livestock Production Science*. 2000, vol. 66, s. 95-107.

ZOU, S.; McLAREN, D.G.; HURLEY, W.L. Pig colostrum and milk composition: comparisons between Chinese Meishan and US breeds. In *Livestock Production Science*. 1992, vol. 30, s. 115-127.

Kontaktná adresa: Peter Ševčík, Ing., Katedra výživy zvierat, FAPZ, SPU, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: peter.sevcik@uniag.sk

Chemical composition of antlers of Red Deer (*Cervus elaphus*) and differences in their particular parts

¹Jámbor Márk, ²Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹Állatorvosi rendelő Székesfehérvár

²Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The aim of this study was a determination of chemical composition of whole deer antler and of its particular parts, which have an influence on the total weight of antlers, which is one of the most significant criterion during an assesment of a trophy value. In this study we are concerned with determination of particular chemical parameters, i. e. dry matter, crude protein (CP), organic matter, ash and macroelements calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), sodium (Na) and potassium (K). The analysis was carried out on 16 pieces of antlers from deer at the age of 4 years, which were received by cooperation with University in Kaposvar. Results of chemical analysis are expressed in particular parts of antler and in whole antler. Differences in chemical composition in particular parts of antler will be observed in the point of view of cognition of storing of these substances in the antler during its development. Results will be used as a groundwork for optimization of feed mixtures for deer in game enclousers and on deer farms.

Keywords: Red Deer; antlers and parts of antlers; chemical composition

Introduction

During an assesment of a trophy value lots of indicators are judged, also weight of antler belongs to them. Weight of antler is significantly influenced by its chemical composition, which was a subject of work of Jeon et al.(2009), Landete-Castillejos et al. (2007) or Dobrowolská (2002).

Own chemical composition of red deer antlers is influenced by lots of factors. The most important internal factor is a genetic disposition, from the external factors primarily nutrition. Significant differences between chemical composition of antlers, which were received from red deers in nature and from red deers kept in captivity on pasture with a supplementary feed, are point of work of Estevez et al. (2008). Also works of Ceacero et al. (2010), Landete-Castillejos et al. (2010), Gomez J.A., et al., (2008)., Estevez JA (2009), Jeon, B. T, et al. (2006) are concerned with the effect of nutrition on growth and development of red deer antlers.

The aim of this work is a presentation of results of chemical composition of particular parts of red deer antlers.

Material and Methods

In total, 16 samples of left antlers of red deers at the age of 4 years were analysed. These antlers were received by cooperation with University in Kaposvar in 2010, a red deer farm Zselice (Hungary).

For chemical analysis the particular parts of antlers were transformed to the homogeneous powder in which the content of dry matter was determinated by drying the sample at $103 \pm 2^\circ\text{C}$ to the constant weight, the content of crude protein by Kjehldal method (multiplied with a coeficient of 6.24, using the Buchi analyser, Centec

automatika, spol. s. r. o.), the content of ash by weighing the residue after burning at 550 °C, the content of calcium (Ca), magnesium (Mg) sodium (Na) and potassium (K) by burning and infusing and by subsequent titration and content of phosphorus by a spectrophotometric determination.

Results and Discussion

Subject of chemical analysis was a complex of 16 antlers from the population of red deers at the age of 4 years, i. e. antler's particular parts - lower and upper base of beam, crown tine, royal antler, brow tine, bay antler.

Table 1: Average content of particular chemical parameters (g/kg) in antlers of red deer

n	Lower base	Upper base	Crown tine	Royal antler	Brow tine	Bay antler
	16	16	16	10	16	15
Dry matter	940,9 ± 15,024	937,4 ± 17,890	935,6 ± 17,432	930,3 ± 16,740	934,9 ± 16,190	933,2 ± 16,100
CP	387,7 ± 15,654	392,4 ± 23,913	388,0 ± 24,641	357,9 ± 25,708	368,7 ± 13,738	372,7 ± 28,858
Organic matter	394,3 ± 15,773	395,8 ± 24,547	392,8 ± 23,258	362,4 ± 0,912	370,3 ± 15,112	377,0 ± 24,992
Ash	546,7 ± 22,637	540,4 ± 29,969	542,9 ± 28,969	567,9 ± 15,031	564,6 ± 17,645	556,2 ± 27,360
Ca	173,3 ± 29,688	178,3 ± 14,681	171,8 ± 16,343	187,2 ± 16,088	177,2 ± 20,521	184,2 ± 18,761
P	55,1 ± 0,516	54,7 ± 0,736	55,1 ± 0,646	54,9 ± 0,770	55,0 ± 0,649	56,9 ± 7,313
Mg	15,8 ± 19,427	11,7 ± 4,926	15,4 ± 9,861	10,5 ± 5,826	22,4 ± 20,235	12,0 ± 8,993
Na	5,3 ± 0,247	5,2 ± 0,297	4,9 ± 0,358	5,1 ± 0,225	5,1 ± 0,200	5,1 ± 0,278
K	0,6 ± 0,122	0,6 ± 0,145	0,6 ± 0,129	0,5 ± 0,084	0,5 ± 0,130	0,6 ± 0,168

Parameters, which were analysed, included the content of dry matter of specific parts of antler that ranged from 930,3 g to 940,9 g, content of crude protein that ranged from 357,9 g to 392,4 g, content of organic matter that ranged from 362,4 g to 395,8 g, content of ash that ranged from 540,4 g do 567,9 g, calcium content from 171,8 g to 187,2 g, phosphorus content from 54,7 g to 56,9 g, magnesium content from 10,5 g to 22,4 g, sodium content from 4,9 g to 5,3 g and potassium content from 0,5 to 0,6 g.

It follows from the results, presented in Table 1, that the highest average content of dry matter and sodium was found in lower base of beam, the highest average content of crude protein and organic matter was in upper base of beam, the highest content of ash and calcium was monitored in royal antler, the highest average content of phosphorus was analysed in bay antler and brow tine had the highest average content of magnesium. Potassium was monitored in the same highest content in lower and upper base of beam, crown tine and in bay antler.

Conclusion

It is obvious, on the basis of the results of chemical analysis of deer antlers, that there are significant differences in chemical composition of their individual parts. Chemical composition is in close relation to the total weight of antler, which is an important criterion during an assesment of a trophy value.

References

- JEON, B., KIM, S., LEE, S., PARK, P., SUNG, S., KIM, J., MOON, S. Effect of antler growth period on the chemical composition of velvet antler in sika deer (*Cervus nippon*). *Mammalian Biology* 2009, vol. 74, no. 5, p. 374-380.
- LANDATE-CASTILLEJOS, T., GARCIA, A., GAJEGO, L. Body weight, early growth and antler size influence antler bone mineral composition of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Bone* 2007, vol. 40, no. 1, p. 230-235.
- DOBROWOLSKA, A. Chemical composition of the red deer (*Cervus elaphus*) antlers, with a particular reference to the toxic metal contents. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 2002, vol. 48, p. 48-155.
- ESTEVEZ, J.A., LANDATE-CASTILLEJOS, T., GARCIA, A.J., CEACERO, F., GALLEGO, L. Population management and bone structural effects in composition and radio-opacity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) antlers. *European Journal of Wildlife Research* 2008, vol. 54, no. 2, p. 215-223.
- CEACERO, F., LANDATE-CASTILLEJOS, T., GARCIA, A.J., ESTEVEZ, J.A., GALLEGO, L. Physiological variables explain mineral intake in Iberian red deer. *Physiology & Behavior* 2010, vol. 100, no. 2, p. 122-127.
- LANDATE-CASTILLEJOS, T., Currey, J.D., ESTEVEZ, J.A., Fierro, Y., Calatayud, A., Ceacero, F., Garcia, A.J., Gallego, L. Do drastic weather effects on diet influence changes in chemical composition, mechanical properties and structure in deer antlers? *Bone* 2010, vol. 47, no. 4, p. 815-825.
- GOMEZ, J.A., LANDATE-CASTILLEJOS, T., GARCIA, A.J., GASPER-LOPEZ, E., ESTEVEZ, J.A., GALLEGO, L. Lactation growth influences mineral composition of first antler in Iberian red deer *Cervus elaphus hispanicus*. *Wildlife Biology* 2008, vol. 14, no. 3, p. 331-338.
- ESTEVEZ, J.A., LANDATE-CASTILLEJOS, T., MARTINEZ, A., GARCIA, A.J., CEACERO, F., GASPER-LOPEZ, E., CALATAYUD, A., GALLEGO, L. Antler mineral composition of Iberian red deer *Cervus elaphus hispanicus* is related to mineral profile of diet. *Acta Theriologica* 2009, vol. 54, no. 3, p. 235-242.
- Jeon, B.T., Kim, M.H., Lee, S.M., Moon, S.H. Effects of dietary protein level on dry matter intake, and production and chemical composition of velvet antler in spotted deer fed forest by-product silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2006, vol. 19, no. 12, p. 1737-1741.

Contact address: Márk Jámboř, MVDr., Állatorvosi rendelő Székesfehérvár, jambor.mark@seznam.cz

SEKCE 3

Veterinární ekologie

Stanovení syntetických vonných látek ve vodě Determination of synthetic fragrances in water

Komárková Petra, Vávrová Milada

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Synthetic fragrances are artificially synthesized organic compounds which are used as fragrant substances in personal care products, perfumes, cosmetics, soaps, detergents, cleansing articles, etc. Recently great attention is devoted to musk compounds because they were proved in different units of environment. The aim of thesis was optimization of selected method for determination of this analytes (citronellol, Fresco Menthe, 2-cyclohexylethanol, isobornylacetat) belonging linear musk compounds group. Analytes were extracted by solid phase microextraction (SPME) from spike sample of water. Method of gas chromatography with mass spectrometry was used for own analysis.

Keywords: synthetic fragrances; musk compounds; SPME; GC/MS

Úvod

Musk sloučeniny (syntetické analogy pižma) se používají jako alternativa drahého přírodního pižma a zahrnují širokou škálu strukturně heterogenních sloučenin (Roosens et al., 2007). Na základě chemické struktury se dělí na nitro, polycyklické, makrocyclické a alicyklické musk sloučeniny.

Syntetické musk sloučeniny jsou ve značné míře používány jako vonné přísady do různých produktů osobní péče a čisticích prostředků. V současné době je zaznamenáván ubikvitární výskyt těchto látek v životním prostředí (Yin et al., 2011). Zejména kontaminace vodního ekosystému, tj. vody, sedimentu i bioty, se stává vážným ekotoxikologickým problémem (Villa et al., 2012).

Musk sloučeniny jsou považovány za nové mikropolutanty, které se vyznačují lipofilitou, perzistencí a bioakumulačním potenciálem. Pravidelně jsou detekovány v odpadních vodách, které tak znamenají konstantní expoziční zdroj těchto látek. V nízkých koncentracích se nacházejí v ovzduší a prachu. Popsány byly rovněž v tukové tkáni, krvi a mateřském mléce (Chase et al., 2012; Hutter et al., 2009).

Materiál a metodika

Tato práce byla zaměřena na sledování čtyř vybraných zástupců lineárních musk sloučenin pocházejících z produkce společnosti AROMA, a.s., konkrétně se jednalo o citronellol, Fresco Menthe, 2-cyclohexylethanol a isobornylacetat. Cílem studie bylo vhodným způsobem optimalizovat celý analytický postup pro následnou identifikaci a kvantifikaci těchto látek v odpadní vodě.

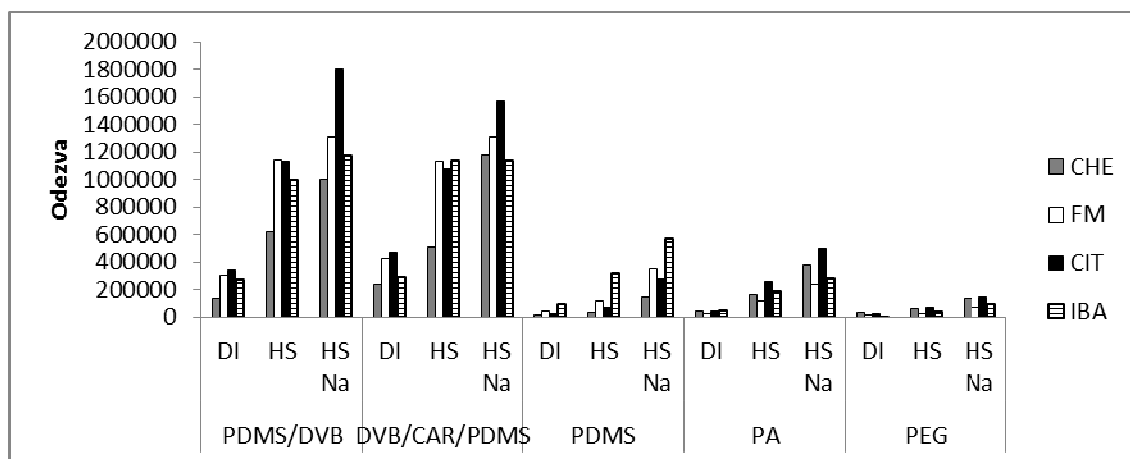
Jako modelový vzorek byla použita destilovaná voda smíchaná s roztokem standardů o známé koncentraci. Metoda zahrnovala extrakci lineárních musk sloučenin pomocí SPME (solid phase microextraction) s následným stanovením metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). Vlastní analýza proběhla za následujících chromatografických podmínek: kolona DB-5MS (20 m x 180 μ m x 0,18 μ m), nosný plyn He 6.0, nástřík metodou splitless, nástříkové množství 1 μ l,

teplota injektoru 250 °C, tlak nosného plynu v injektoru 116 kPa, průtok nosného plynu v injektoru 28,5 ml/min, průtok nosného plynu v koloně 0,8 ml/min, lineární rychlost nosného plynu 40 cm/sec, teplota transferu 285 °C.

Výsledky a diskuse

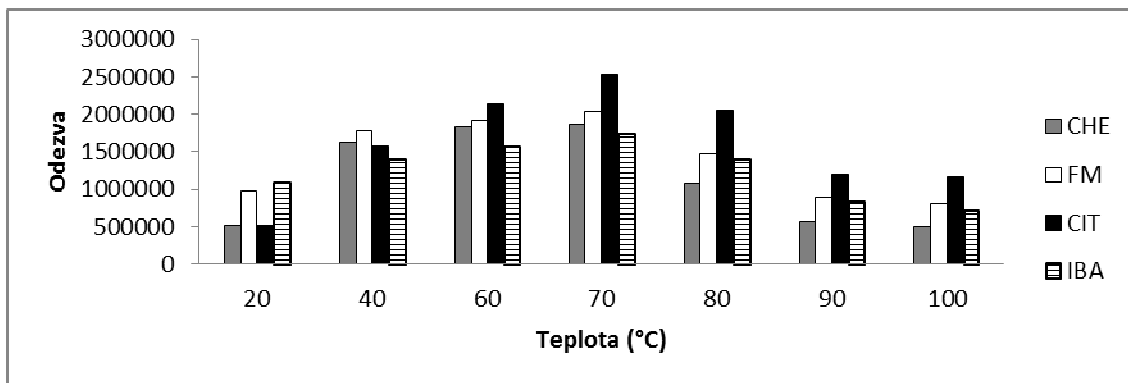
Nejprve byly jednotlivé roztoky standardů proměřeny v režimu SCAN. Tím byly zjištěny jejich retenční charakteristiky a hmotnostní spektra. Účinné separace analytů je dosaženo zejména optimalizací teplotního programu. Jelikož se musk sloučeniny vyskytují v reálných vzorcích v nízkých koncentracích, byl pro samotnou optimalizaci nastaven režim SIM. Celkem bylo vyzkoušeno šest různých teplotních programů, ze kterých byl nakonec vybrán ten, při kterém docházelo k nejlepší separaci analytů. Výsledný teplotní program má následující podmínky: 50 °C po dobu 3 min, 5 °C/min do 105 °C (zádrž 5 min), 30 °C/min do 280 °C (zádrž 2 min). Celková doba analýzy byla 26,83 min.

Poté následovala optimalizace SPME. Jedním z nejdůležitějších kroků je výběr vhodného vlákna. Celkem bylo ověřováno 5 druhů vláken s různými stacionárními fázemi: DVB/CAR/PDMS (50/30 μm), PDMS (100 μm), PA (85 μm), PDMS/DVB (65 μm) a PEG (60 μm). Pro každý typ vlákna byla provedena přímá a head-space extrakce. Dalším sledovaným ukazatelem byl vliv vysolování. Ke vzorku bylo přidáno 3,75 g NaCl a byla provedena extrakce metodou head-space. Přídavkem soli se zvýší iontová síla roztoku a dochází k účinnější extrakci některých analytů. Porovnání jednotlivých typů vláken a účinnosti extrakce při přímém ponoření (DI), head-space (HS) a head-space s přídavkem NaCl uvádí graf 1. Z tohoto grafu vyplývá, že nejlepší výsledky bylo dosahováno při použití vlákna PDMS/DVB (65 μm) a metody extrakce head-space za současného přídavku NaCl. Všechny následující kroky optimalizace byly proto provedeny pouze s použitím těchto parametrů.



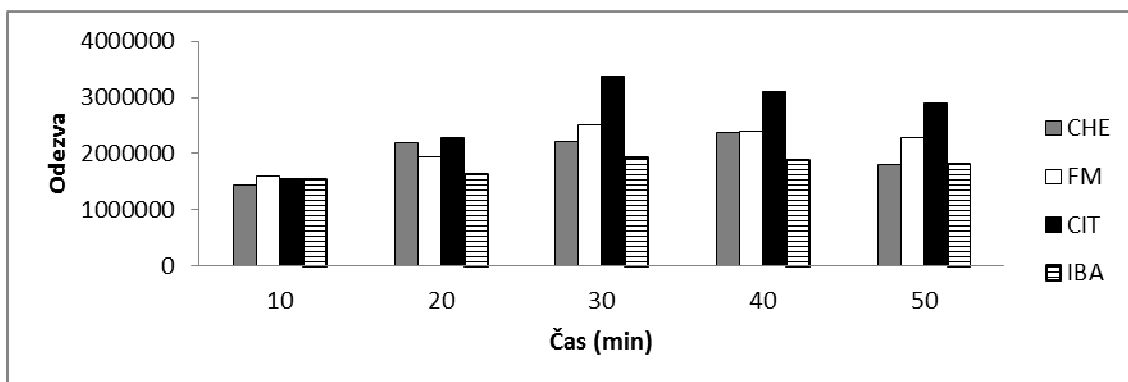
Graf 1: Optimalizace typu vlákna, způsobu provedení a vlivu vysolování

Pro určení nejvhodnější teploty sorpce byla sledována teplotní řada 20 °C, 40 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C a 100 °C. Výsledky uvádí graf 2, ze kterého je patrné, že výtěžnost extrakce byla pro všechny analyty nejvyšší při teplotě 70 °C. Při nižších teplotách látky hůře přecházejí do plynné fáze, odkud jsou sorbovány na vlákno. Protože se však jedná o látky těkavé, při vyšší teplotě naopak dochází k jejich úniku prostorem kolem vzorkovací jehly a problém nastává i při ustanovování rovnováhy.



Graf 2: Závislost odezvy na teplotě sorpce

Posledním parametrem, který bylo nutné optimalizovat, byla doba sorpce. Jedná se o čas potřebný k dosažení rovnováhy mezi maticí vzorku a vláknem. Testovaná řada byla 10, 20, 30, 40 a 50 minut. Z grafu 3 je patrné, že odezvy se s časem zvyšovaly až do doby 30 minut. Proto byl tento čas vyhodnocen jako optimální doba sorpce.



Graf 3: Závislost odezvy na době sorpce

Výsledné parametry optimalizované metody SPME jsou následující: typ vlákna PDMS/DVB (65 μ m), provedení head-space, přidavek 3,75 g NaCl, objem vialky 22 ml, objem vzorku 14 ml, rychlost míchání 900 ot./min, teplota 70 °C, doba ustálení rovnováhy 5 min, doba sorpce 30 min.

Závěr

Musk sloučeniny se vyskytují téměř ve všech složkách životního prostředí, proto je nutné tuto skupinu látek neustále sledovat. Pro jejich stanovení se osvědčilo použití sorpčně desorpční metody SPME, jejíž optimalizace pro vybranou skupinu lineárních musk sloučenin byla i cílem této práce.

Literatura

K dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Petra Komárková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11470@vfu.cz.

Determination of abiotic and biotic samples from the environment

Štílárková Edita, Vávrová Milada, Chárvátová Michaela

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The work was focused on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biotic and abiotic components of aquatic ecosystems. PAHs persist in the environment for a long time, they are toxic, carcinogenic and mutagenic properties. The catch of fish was carried out in accordance to valid legislation. The analysis was performed on samples of fish (skin and muscle), water, algae and soil from two locations. The first site is the confluence of Svratka and Svitava rivers in the town of Modřice and the second location is close to the town of Rajhradice. For the determination of PAHs were selected following isolation procedures: extraction (pressurized solvent extraction, cold extraction and sonication), clean-up by column chromatography and for determination was used gas chromatography with mass spectrometer (GC/MS). The values of determined compounds were measured in muscle tissue below the skin. The bioconcentration factor was also calculated.

Keywords: PAHs; fish; soil; water; algae; PSE; GC/MS

Introduction

PAHs are considered as typical representatives of persistent organic pollutants (POPs). PAHs persist in the environment for a long time, they are toxic, carcinogenic and mutagenic properties. PAHs are comes of anthropogenic and non-anthropogenic activity. The largest sources of PAHs are combustion processes. They can come of as a product of metabolism of fytoplankton or at biosynthesis of algae and bakteria (Pitter, 2009; Tomaniová et al., 1997).

Time of remain PAHs in the atmosphere is different. The vegetation display these contaminants about 45 %, 10 % is deposited into the soil, 5% is deposited into water and the rest (about 40 %) is chemically transformed, or transported by wind to more distant areas. To the transmission of these contaminants in the environment occurs mainly air flow and in the water ecosystem it is resuspension of contaminated sediments (Velíšek, 2009).

Material and Methods

The work was focused on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biotic (algae and fish) and abiotic (water and soil) components of aquatic ecosystems.

Samples of water, sediment, algae and fish (muscle and skin) from two locations were analyzed. The first location was influence of Svratka and Svitava rivers in Brno-Modřice, situated before the wastewater treatment plant and the second sampling place was behind the wastewater treatment plant, in Rajhradice town. The catch of fish was carried out by the workers of Morava River Company, in accordance with current legislation.

Preanalytical section of method included isolation of analytes using the pressurized solvent extraction (PSE), cold extraction, sonication and clean up by column chromatography. As extraction reagens used dichlormethane (DCM).

Table 1: Preanalytical part of analysis

sample	extraction	conditions	solvent	clean-up
water	cold extraction	0,5 l of sample 3 x 45 min	DCM	silicagel
soil	pressurized solvent extraction	2 g of sample 100°C, 100 bar, 2 x 5 min	DCM	silicagel
algae	pressurized solvent extraction	2 g of sample 100°C, 100 bar, 2 x 5 min	DCM	silikagel:Al ₂ O ₃ 2:1
fish	cold extraction and sonication	20 g of sample, dry up by Na ₂ SO ₄ , 2 x 45 min cold extraction 1 x 45 min sonication	DCM	silikagel:florisil 1:1
skin	cold extraction and sonication	20 g of sample, dry up by Na ₂ SO ₄ , 2 x 45 min cold extraction 1 x 45 min sonication	DCM	silikagel:florisil 1:1

Self determination was performed by gas chromatography with mass spectrometer GC/MS on the instrument of Agilent Technologies, model 6890N USA, with mass detektor 5973N (Agilent Technologies, USA) under the following chromatographic conditions: capillary column DB5-MS (20 m x 0.18 mm x 0.18 µm), J & W Scie (USA), injection by splitless method, transfer line temperature 50 °C, injected volume 1 µl. Temperature mode of oven was: 70 °C (2 min), 8 °C/min to 120 °C (0.1 min), 5 °C/min to 300 °C (5 min). Total analysis time was about 50 min. Helium was used as carrier gas with a constant flow 0.8 ml.min⁻¹.

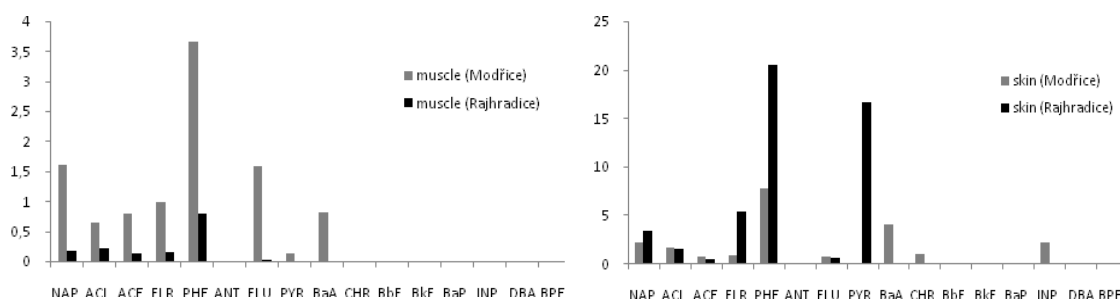
Results and Discussion

The results are presented in table 2; these results were compiled from a total of 20 fish. Data (nd) in the table represent values below the detection limit and for the average values - was nd calculated as a half of detection limit. The table contains calculated bioconcentration factor, too.

Table 2: Average concentrations of PAHs [µg.l⁻¹, µg.kg⁻¹]

		water	soil	algae	muscle	skin	BCF
naphtalene	NAP	5.687	nd	0.389	0.903	2.850	0.159
acenaphtylene	ACL	nd	2.290	1.978	0.442	1.663	-
acenaphtene	ACE	nd	1.348	1.071	0.480	0.622	-
fluorene	FLR	4.972	1.227	0.644	0.588	3.191	0.118
phenanthrene	PHE	33.65	24.62	11.83	2.238	14.28	0.067
anthracene	ANT	12.75	0.307	nd	0.011	nd	0.001
fluoranthene	FLU	8.666	42.03	10.82	.811	0.710	0.094
pyrene	PYR	0.742	32.05	7.141	0.086	8.399	0.116
benzo[a]anthracene	BaA	23.24	26.73	7.820	0.412	2.052	0.018
chrysene	CHR	nd	12.90	nd	nd	0.505	-
benzo[b]fluoranthene	BbF	nd	25.29	nd	nd	nd	-
benzo[k]fluoranthene	BkF	nd	5.858	nd	nd	nd	-
benzo[a]pyrene	BaP	nd	12.68	nd	nd	nd	-
indeno[1,2,3-c,d]pyrene	INP	nd	16.30	nd	nd	1.101	-
benzo[a,h]anthracene	DBA	nd	nd	nd	nd	nd	-
benzo[g,h,i]perylene	BPE	nd	8.749	nd	nd	nd	-

PAHs are lipophilic organic pollutants, thus a content of fat in tissues was detected. The content of fat in fish muscle was determined in the range from 0.9 % to 3.7 % and from 5.49 % to 15.89 % in skin of fish. Muscle was assessed as a food, on the other hand skin as a matrix that can be evaluated for its bioaccumulation of water ecosystem. Calculation of concentrations of the PAHs was made by method of calibration curve using standards ($1 - 1000 \text{ ng.ml}^{-1}$). The highest concentrations were calculated for fluoranthene in algae and for phenanthrene in algae, sediment, muscle and skin. The bioconcentration factor was calculated too, $\text{BCF} = c\text{PAHs}_{\text{muscle}}/c\text{PAHs}_{\text{water}}$ (Velíšek, 2002). The content of PAHs in the fish muscle was higher in fish from the first site and contrarily concentration of PAHs in skin was higher in samples from the second site (graph 1).



Graph 1: Average concentrations of PAHs in fish muscle and skin [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]

Conclusion

The work was focused on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biotic (algae and fish) and abiotic (water and soil) components of aquatic ecosystems. The highest concentration was calculated in soil, the lowest concentration was calculated in fish muscle. The content of PAHs in the fish muscle was higher in samples from the first site situated before the wastewater treatment plant and contrarily concentration of PAHs in fish skin was higher in samples from the second site behind the wastewater treatment plant.

Acknowledgements

The study was prepared with the financial support of the MSMT of the Czech Republic, research plan no. MSM 6215712402.

References

- PITTER, P. Hydrochemie. 4. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. 592 p. ISBN 978-80-7080-701-9.
- TOMANIOVÁ, M.; KOCOUREK, V.; HAJŠLOVÁ, J. Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. Chemické listy. 1997, vol. 91, pp. 357-366.
- VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin 2. 3. vyd. Tábor: Osis, 2009. 644 pp. ISBN 978-80-86659-16-9.

Contact address: Edita Štilárková, Mgr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09004@vfu.cz

Stanovení bisfenolů ve vodě

Determination of bisphenols in water

Tesařová Simona, Charvátová Michaela, Vávrová Milada

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Bisphenol A (BPA) is one of the frequently discussed residues of packaging materials. Much of researches pursue leaching of BPA from packaging materials (mainly plastic) into food, beverages or environment. Negative properties of BPA are subject of many studies, too. I focused on determination of BPA and its related compounds (bisphenol F-BPF, bisphenol A diglycidyl ether-BADGE and bisphenol F diglycidyl ether-BFDGE) in my work. Solid phase microextraction (SPME) with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) as method for determination of observed analytes was optimized. Condition of optimized method SPME are following: 7,6 ml sample is 10min mixing in laboratory temperature and then 10min sorption on DVB/CAR/PDMS fibre. Sample is mixing by whole time of sorption. Detection limit of this optimized method SPME was in range 0,029 - 3,393 ug/l and determination limit was in range 0,097 - 11,310 ug/l. Found quantity of determined analytes in real samples was in range 7,575 - 20,393 ug/l.

Keywords: *bisphenol A; bisphenol F; bisphenol A diglycidyl ether; bisphenol F diglycidyl ether; solid phase microextraction; gas chromatograph; mass spectrophotometry*

Úvod

Bisfenol A je mezinárodní triviální název pro 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan, zkratka BPA. Tato látka patří mezi hydroxysloučeniny fenolů, ve kterých je hydroxidová skupina připojena na uhlík aromatického kruhu. Bezbarvou bílou hmotu s fenolickou vůní poprvé připravil v roce 1891 ruský chemik Alexandr P. Dianin (Ballesteros-Gomez et al., 2009; Fikr a Kahovec, 2004, Kang et al., 2006, Patočka, 2010).

Bisfenol A byl vyráběn ve velkých množstvích a více než 90 % byl využíván jako monomer k výrobě polykarbonátových plastů nebo epoxidových pryskyřic, dále do zpomalovačů hoření nebo do nenasycených polyester-styrenových pryskyřic. Tyto produkty se používají k pokrytí plechovek, do práškových barev, jako aditiva do termopapíru, jako antioxidanty v plastech nebo do zubních výplní (Fromme et al., 2002).

Bisfenol A je zařazen mezi toxické látky, a proto bylo v mnoha zemích zakázáno jeho použití do materiálů přicházejících do styku s potravinami pro děti do tří let, zejména těch, které byly podávány v kojeneckých lahvích. Mezi jeho nejzávažnější účinky patří endokrinní aktivita, karcinogenita a estrogenní aktivita (Kapoun, 2011, Zafra et al., 2003, Xiangli et al., 2006).

Materiál a metody

Studie byla zaměřena na stanovení bisfenolů ve vzorcích vod. Bisfenoly byly zjišťovány v modelovém vzorku a následně také v reálných vzorcích, kterými byly balené pitné vody perlivé a neperlivé o objemu 0,5 l a 1,5 l, vzorek odpadní vody z čistírny odpadních vod VFU Brno, vzorek znečištěné vody z potoka v Křepicích u Hustopečí,

vzorek vody z řeky Svratky odebraný v Židlochovicích a vzorek pramenité vody z Křepic u Hustopečí.

Výše jmenované vzorky byly analyzovány následovně: izolace analytů pomocí SPME (solid phase microextraction neboli mikroextrakce tuhou fází), vlastní stanovení plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS).

K zakoncentrování analytů ve vzorku byla optimalizována metoda SPME. Protože bisfenoly nepatří mezi těkavé látky, byla použita technika přímé SPME. Podmínky optimalizované metody jsou následující: 100 µl směšného standardu bylo nadávkováno do 7,5 ml destilované vody, 10 min probíhalo předmíchání, za stálého míchání probíhala i samotná sorpce na vlákne DVB/CAR/PDMS (divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan 50/30 µm), a to po dobu 10 min.. Vliv derivatizace, zahřívání vzorku, úprava pH nebo soli se neprojevil, a proto nebyly do optimalizované metody zařazeny.

Analýza GC/MS probíhala na plynovém chromatografu 6890N firmy Agilent Technologies, USA, na koloně DB-5MS (20 m x 0,180 mm x 0,18 m) s hmotnostně spektrometrickým detektorem 5973N firmy Agilent Technologies, USA. Teplotní program byl zvolen následovně: 150°C po dobu 2 minut, 30°C/min do 270°C, zadrž 6 minut, doba analýzy 16 minut. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium o konstantním průtoku 1,1 ml/min. Technika nástřiku byla splitless, vlákna bylo vloženo do nástřikového prostoru o teplotě 260°C. Teplota iontového zdroje a Transfer Line byla 230°C. Režim SIM-snímané ionty m/z: 228 pro BPA, 200 pro BPF, 325 pro BADGE, 312 pro BFDGE.

Tabulka 1: Charakteristiky metody GC/MS a SPME

Analyt	RSD [%]	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]
BPA	15,03	1,358	4,527
BPF	10,49	3,393	11,31
BADGE	15,73	0,029	0,097
BFDGE	10,40	0,760	2,535

Výsledky a diskuse

Chromatogramy získané při analýze jednotlivých vzorků byly vyhodnocovány metodou kalibračních křivek o 5ti bodech (koncentrace kalibračních roztoků: 50, 250, 500, 750 a 1000 ng/ml).

V balených vodách byly zjištěny nejvyšší koncentrace sledovaných analytů ve vzorku vody perlivé o objemu 0,5 l, a to BPA 7,575 µg/l, BPF 22,78 µg/l, BADGE 19,07 µg/l a BFDGE 20,39 µg/l. U ostatních vzorků balených vod byly hodnoty BPF, BADGE a BFDG nižší a BPA pod mezí detekce. Lze proto předpokládat, že jsou tyto analyty více zakoncentrované v menším objemu.

Při analýze reálných vzorků povrchových vod a modelového vzorku vody byly zjištěny koncentrace BPA pod mezí detekce nebo stanovitelnosti, zatímco hodnoty ostatních analytů se u všech vzorků (pramen, potok, řeka, čistírna odpadních vod, modelový vzorek) pohybovaly v rozmezí 14,63 – 20,42 µg/l. Obecně byly nejvyšší koncentrace

prokázány ve vzorku z potoka a nejvyšší zastoupení u všech vzorků představoval analyt BADGE.

Obecně platí, že kontaminace vod bisfenolem A je velmi nízká, zatímco u ostatních sledovaných látek bývá zjištěná kontaminace několikanásobně vyšší. To odpovídá i výsledkům studie hodnotící kontaminaci jednotlivými analyty vody řek ve Španělsku. Tam byly zjištěny následující koncentrace analytů: BPA 0,02 – 0,5 µg/l, BPF 0,06 – 2,5 µg/l, BADGE 0,45 – 50,0 µg/l a BFDGE 0,30 – 50,0 µg/l (Vílchez et al., 2001). Naše výsledky, stejně jako údaje z literatury nám umožňují konstatovat, že větší nebezpečí než BPA pravděpodobně představují jeho deriváty.

Závěr

Byla provedena optimalizace metody SPME, přičemž byly zjištěny nové podmínky pro vlastní chromatografickou analýzu. Během optimalizace byl sledován vliv těchto parametrů: typ vlákna, úprava pH, přídavek soli, doba sorpce, míchání vzorku, teplota, doba předmíchávání vzorku a derivatizace. Pro optimalizovanou metodu byla zjištěna opakovatelnost, která se pohybovala v rozmezí 10 – 15 %. Protože byly podmínky metody optimalizovány tak, aby se mohly stanovit všechny sledované analyty (BPA, BPF, BADGE a BFDGE), je pravděpodobné, že úpravou individuálních podmínek pro jednotlivé látky by byly získány ještě lepší výsledky. Optimalizovaná metoda SPME byla ověřena na modelových i reálných vzorcích. Hodnoty analytů byly naměřeny v následujícím rozmezí koncentrací: BPA od nedetekovatelné po 7,575 µg/l, BADGE 18,78 – 19,07 µg/l, BPF 14,63 – 22,78 µg/l a BFDGE 14,85 – 20,39 µg/l. U reálných vzorků se ukázalo být problémem stanovení BPA (vliv matrice), avšak všechny ostatní analyty byly stanoveny bez problémů. Relativně vysoké koncentrace BADGE oproti jiným analytům mohou být důsledkem rozkladu BPA na tento derivát.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena VZ MŠMT ČR č. MSM 6215712402.

Literatura

K dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Simona Tesařová, Mgr., Ústav veterinární ekologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H11004@vfu.cz

Extraction procedures and their optimization for isolation of sulfonamide antibiotics from environmental matrices

Járová Kateřina, Vávrová Milada, Charvátová Michaela

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The work was focused on the optimization of preanalytical methods for isolation of selected sulfonamides from water and sediment samples. Specifically, it is the method of Solid Phase Extraction and Pressurized Solvent Extraction, that are advanced, environmentally friendly processes, which also reduce the general complexity and difficulty of the whole experiment. Final analytical determination was performed by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector. There were detected and calculated yields of individual steps procedures of both methods using standard addition to model water and sediment samples.

Keywords: *pharmaceuticals; sulfonamides; water; sediment; SPE; PSE; HPLC/DAD*

Introduction

Antibiotics, including sulfonamides, are in both human and animal body metabolized and excreted in the urine or faeces, while 30 to 90 % of them are excreted in active form. Thus, antibiotics in their original or metabolized form enter the environment where they are toxic especially to aquatic organisms. For the environment are often more hazardous veterinary antibiotics than those used to treat people. Animals consume up to 60 % of antibiotics not only for veterinary treatment, but also as a feed supplement. The occurrence of residual antibiotics in the environment then results in an increased incidence of resistant bacteria, which may in future become a potential threat to human health (Cooper et al., 2008; Costanzo et al., 2005; Watkinson et al., 2009).

Modern preanalytical methods are procedures saving the environment, because they use less solvent than conventional extraction methods. Their other advantage is the reduction of time needed to complete the entire analytical procedure. Specifically, it is the method of Solid Phase Extraction (SPE) performed in the liquid-solid system that can operate on the principle of adsorption or elution chromatography; and the method of Pressurized Solvent Extraction (PSE) that combines the elevated temperature and pressure in conjunction with liquid solvents (Klouda, 2003; Štulík, 2004).

Material and Methods

Samples and standards: As a model sample of water was distilled water intentionally contaminated with sulfonamides standard, specifically it was a mixed standard containing 6 different sulfonamides at concentration of 25 µg.ml⁻¹. Sediment samples were taken from the Medlov pond. The following sulfonamide standards were used: sulfadiazine SDIA, sulfapyridine SPY, sulfadimidine SDM, sulfaclozine SCL, sulfaguanidine SGN and sulfadoxine SDX.

Extraction of water samples using SPE: To optimize and select the most appropriate method, different SPE procedures shown in Table 1 were tested.

Table 1: SPE procedures used for water extraction

procedure no.	1	2	3	4	5	
column	Supel-Select HLB	Supel-Select HLB	Supel-Select HLB	PEP Plus	PEP Plus	
conditioning	MetOH - 2 ml DI water - 2 ml	MetOH - 2 ml DI water - 2 ml	0,1M HCOOH in MetOH - 2 ml 5% MetOH - 2 ml	0,1M HCOOH in MetOH - 2 ml 5% MetOH - 2 ml	MetOH - 5 ml DI water pH 4 (using HCl) - 5 ml	WASTE CONTAIN ER
sample loading	100 ml, flow rate 1-2 drops/sec.	100 ml, flow rate 1-2 drops/sec.	100 ml, flow rate 1-2 drops/sec.	100 ml, flow rate 1-2 drops/sec.	100 ml, flow rate max. 4 ml/min.	
washing	10% MetOH-2 ml	5% ACN - 2 ml	5% MetOH - 2 ml	5% MetOH - 2 ml	2% MetOH - 2 ml	
drying	5-10min. vacuum	5-10min. vacuum	5-10min. vacuum	5-10min. vacuum	5-10min. vacuum	
elution	MetOH:ACN (1:1) 5 ml	MetOH:ACN (1:1) 5 ml	0,1M HCOOH in MetOH 5 ml	0,1M HCOOH in MetOH 5 ml	MetOH - 2 x 5 ml two elutions	COLLECT. CONT.

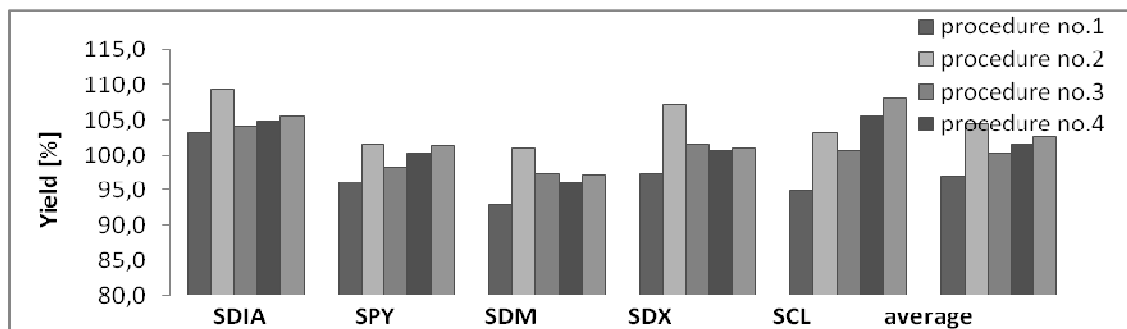
MetOH = methanol, DI = deionized water, ACN = acetonitrile, HCOOH =formic acid, HCl = hydrochloric acid

Extraction of sediment samples using PSE and SPE: The sample for analysis was prepared according to the published method (Final report of FRVŠ no. 2180/2011/G4). Here are mentioned only temperature and pressure of basic method conditions, that were changed during the optimization (40 °C, 60 bar; 50 °C, 60 bar; 60 °C, 60 bar; 40 °C, 70 bar and 40 °C, 80 bar). Methanol was used as a suitable solvent. After first extraction, sediment was dried and extracted again with the addition of sulfonamides standard. Second extractions were carried out under the same conditions as first ones. Sample purification using SPE followed. The procedure and conditions of the individual steps are part of the optimized SPE method.

Analytical determination: Analysis was performed using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD). The ZORBAX Eclipse XDB-C18 column was used to determination. The mobile phase was 0.1 M formic acid and acetonitrile; column temperature 20 °C; detection wavelength 270 nm; length of analysis 12 minutes.

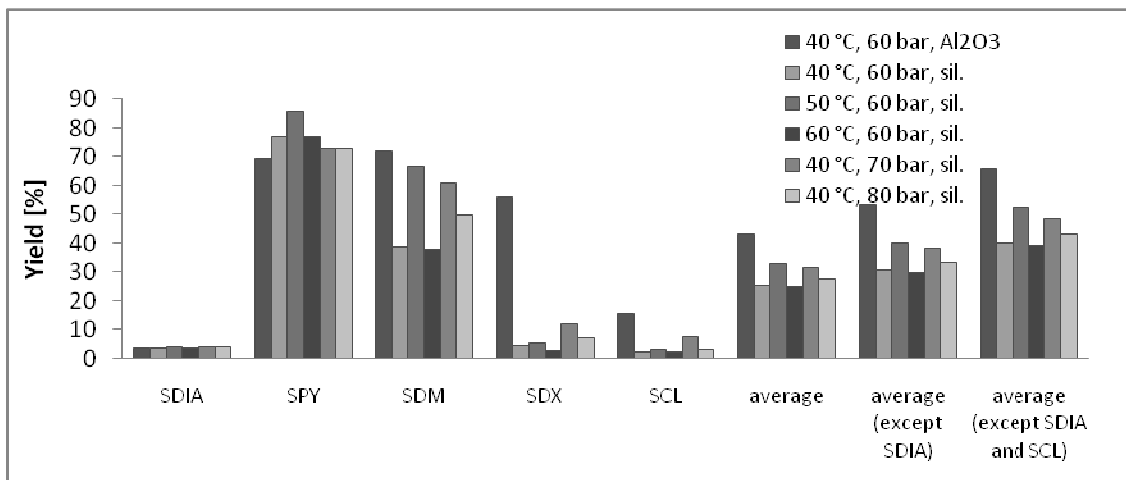
Results and Discussion

Calculation of concentrations of each sulfonamide in samples was performed using the calibration range of the mixed standard in the concentration range 1 - 70 µg.ml⁻¹. Yields were compared and compiled in Graph 1. Procedure no.2, in which the highest yields for all investigated sulfonamides were achieved, was evaluated as optimal. This procedure was recommended in the application manufacturer's instructions of the SPE columns Supel-Select HLB. The second appropriate procedure using SPE was procedure no. 3 using the PEP-Plus columns.



Graph 1: Yields comparison of SPE procedures for individual sulfonamides - water

Sediment samples were first extracted by PSE, while two parameters were changed - temperature and pressure. The obtained extracts were purified and concentrated using procedure no.2 of SPE extraction. Yields of PSE extractions and their comparison show Graph 2. Based on these results, the most appropriate conditions for the extraction of sulfonamides from sediments were selected.



Graph 2: Yields comparison of PSE procedures for individual sulfonamides - sediment

We can see from results that the optimal variant of PSE extraction was procedure using a temperature of 40 °C, pressure 60 bar and Al₂O₃, that was placed on the bottom of the extraction thimble instead of silica gel. For this procedure it was achieved the highest average yield (65.6 %). The second appropriate option was the PSE extraction procedure combining 50 °C, 60 bar and silica gel. The highest yield was achieved for sulfonamide sulfapyridine.

Conclusion

The results of water analysis show that all used procedures achieved yields approaching 100 % and therefore are suitable for SPE extraction of sulfonamides from water. Procedures used for the analysis of sediment did not achieved high yields. Therefore, it was verified another procedure with use of Al₂O₃. On the basis of obtained results, the most suitable methods for the extraction of sulfonamides from water and sediments were selected.

Acknowledgements

The work was supported by the financial contribution of the project FRVŠ MŠMT of the Czech Republic no. 2180/2011/G4.

References by the authors.

Contact address: Kateřina Járová, Mgr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic, H09369@vfu.cz

Determination of methylmercury and total mercury in water ecosystem

Králová Zuzana, Vávrová Milada, Charvátová Michaela, Zúfalá Michaela

Fakulty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

*Objective of this study was to evaluate the aquatic environment for the presence of methylmercury. Methylmercury and total mercury was determined in water, sediment, algae, and in the muscle and skin of fish species *Leuciscus cephalus*. Methylmercury is considered to be the most toxic form of mercury, there is methylation of inorganic forms of mercury by certain bacteria living in sediments. Methylmercury enters aquatic organisms from water and accumulate in the food chain. After extraction of the tissues methylmercury was determined by gas chromatography with electron capture detector (GC/ μ ECD). Methylmercury was extracted from the water using SPME and determined by gas chromatography with mass spectrometry detector (GC/MS). Total mercury was determined on the AMA 254. The resulting values were calculated to be a bioconcentration factor.*

Keywords: methylmercury; GC/ μ ECD; total mercury

Introduction

The mercury is one of the most harmful environmental pollutants among the toxic trace metals. The mercury exists as diverse chemical forms such as elementary Hg (Hg^0), inorganic Hg (Hg^{2+} , Hg_2^{2+}) and organic methylmercury and dimethylmercury (Jung et al., 2008). It's getting into the environment from both natural sources and anthropogenic activities (Cibulka et al., 1986; Remy, Prudent, Probst, 2006).

MeHg^+ , the most toxic form of mercury, can accumulate in living organisms and at high concentrations causes central nervous system disorders (Beceiro-González et al., 2009). Inorganic mercury compounds can be converted to methylmercury by biomethylation process (Wright, Welbourne, 2002); biological methylation of mercury is microbially driven process that occurs under aerobic and anaerobic conditions. Presence of the organism in the sediment is necessary for this important process. The bacteria methylation mercury include species of the genera *Bifidobacterium*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, etc. (Velíšek, Hajšlová, 2009; Houserová et al., 2006). Mercury also biomagnifies through the food chain. Large predatory fish species tend to have higher levels than non-predatory fish species at lower levels in the food chain (Voegborlo, Akagi, 2005).

Among the best known methylmercury poisoning include environmental disaster in Minamata Bay in Japan (Marsalek, 2006).

Material and Methods

The fish species *Leuciscus cephalus* were used to determine. Fish were caught by Morava River workers who have accreditation for this activity; sampling sites was the confluence of the Svatka and Svitava and location near the village Rajhradice. Immediately after killing the fish gutted and undergo a health examination. The skin and muscle of fish were marked, the beginning of the analysis were stored in a freezer at

-18 ° C. Water and algae were collected at the same sampling locations. These samples were processed immediately to determine.

For the determination of methylmercury, the chosen method involving extraction of analytes in toluene, extract purification and determination by gas chromatography with electron capture detector. The same methodology was used to prepare extracts of muscle and skin. Chromatographic conditions used are presented in Table 1. The column was adjusted by 10 sprayings 30 mM HBr before the actual measurement of the calibration solutions and samples.

Table 1: Optimized experimental conditions for GC / μ ECD

Column	DB-17 capillary, 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m film, J & W Scientific, Folsom, CA, USA
Program	80°C - 1 min zadrž, 15°C/1 min do 180°C, 5°C/1 min do 220°C
Detector	280°C
Injected volume	1 μ l

Total mercury was determined in samples of the atomic absorption spectrometer AMA 254 (Advanced Mercury analyser). Terms of the determination are listed in Table 2.

Table 2: Optimized experimental conditions for AMA 254

Sample	drying [s]	decomposition [s]	waiting [s]
water	60	150	45
sediment	80	200	45
algae	15	200	45
muscle	90	210	55
skin	90	210	55

Results and Discussion

The obtained results are summarized in the following tables and graphs.

Table 3: Results of methylmercury and total mercury in fish muscle and skin from the No. 1 catch

Sample No.	Muscle MeHg [μ g.kg ⁻¹]	Muscle Total Hg [μ g.kg ⁻¹]	Skin MeHg [μ g.kg ⁻¹]	Skin Total Hg [μ g.kg ⁻¹]
1	241,9	87,66	76,27	63,27
2	637,5	183,2	144,9	91,75
3	256,3	99,88	44,94	44,74
4	161,5	119,4	73,04	67,33
5	124,3	109,9	72,01	45,83

Table 4: Results of methylmercury and total mercury in fish muscle and skin from the No. 2 catch

Sample No.	Muscle MeHg [μ g.kg ⁻¹]	Muscle Total Hg [μ g.kg ⁻¹]	Skin MeHg [μ g.kg ⁻¹]	Skin Total Hg [μ g.kg ⁻¹]
6	199,2	102,1	84,17	46,60
7	171,9	150,5	62,42	67,34
8	110,9	107,3	38,99	42,28
9	82,56	107,8	74,92	48,51
10	138,7	109,8	84,31	38,14

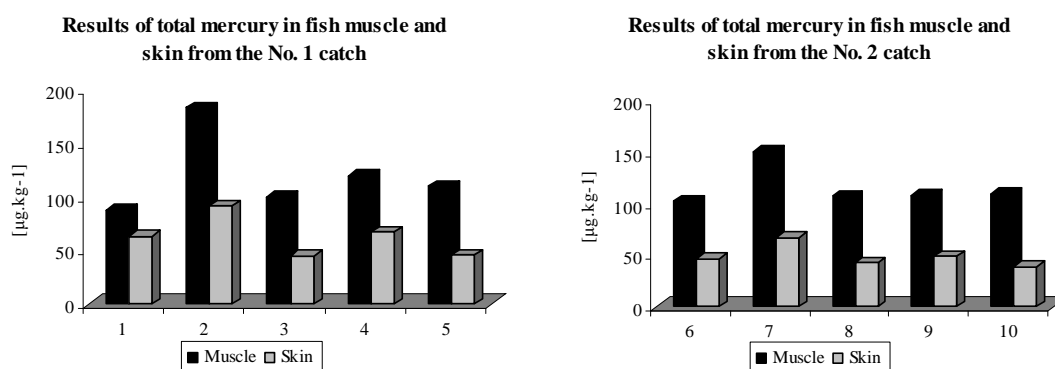
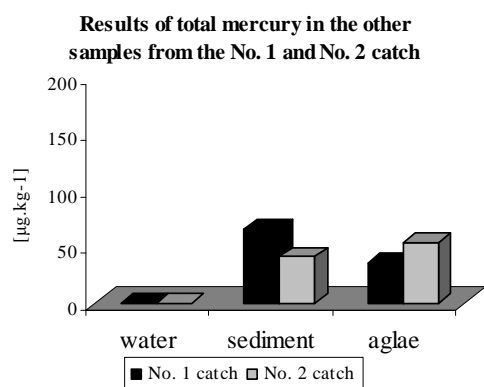


Table 5: Results of total mercury in the other samples from the No. 1 and No. 2 catch

Sample	Total Hg No 1 catch [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Total Hg No. 2 catch [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
water	0,466	0,518
sediment	66,08	40,931
aglae	35,872	53,799



Conclusion

The present study addresses the issue of determination of total mercury and methylmercury throughout the aquatic ecosystem. We analyzed the water, sediment, algae, and fish muscle and skin. The lowest concentration of mercury was found in the water sample, the highest, as expected, in the muscle of fish. The specified values meet the limits given in the Regulation of the European Commission 1881/2006/ES. The results of this study show that it is still necessary to monitor the level of the aquatic ecosystem, because the amount of contaminants in this ecosystem continues to grow.

Acknowledgement

The study was financially supported by VZ MSMT CR No. MSM 6215712402.

References

List of references for the author.

Contact address: Zuzana Králová, Mgr., Veterinary Ecology and Environment Protection, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, e-mail: zuzanakralova@centrum.cz

Detekce druhu *Mycobacterium avium* v sedimentech nádrží s pitnou vodou, v úpravnách vod a v domácnostech v ČR

Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in reservoir sediments, water-treatment sludge and households in Czech Republic

¹Klanicová Barbora, ²Sed'a Jaromír, ¹Slaná Iva, ¹Kantorová Krystýna, ¹Slaný Michal, ¹Pavlík Ivo

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

²Biologické centrum AV ČR, Hydrobiologický ústav, České Budějovice

Summary

In this study culture, quantitative real-time PCR (qPCR) and *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) duplex PCR were used to detect *Mycobacterium avium* subspecies in samples tracing the pathway of possible transmission to humans and animals. Samples out of four drinking water reservoirs in the Czech Republic, 52 dam sediments, 34 water treatment plant sludge and 38 household water tank sediments, were analyzed. The presence of *M. a. avium*, *M. triplex*, *M. gordonae* and *M. sp.* was confirmed by culture in these samples. Dam sediments tested positive for *M. avium* subspecies DNA in 90% of samples, water treatment plant sludge contained *M. avium* subspecies DNA in 24% of samples and household water tank sediments contained *M. avium* subspecies DNA in 16% of qPCR analyzed samples. Concentrations ranged from 10^0 to 10^4 copies/gram. Altogether 68% out of 90 samples were found to be positive for non-tuberculous mycobacteria by MTC duplex. In this study it was thus confirmed that here exists pathway where drinking water from reservoirs might represent a transmission route of potentially pathogenic mycobacteria to animals and immunosuppressed humans.

Keywords: non-tuberculous mycobacteria; drinking water; dam

Úvod

Netuberkulózní mykobakterie (NTM) jsou původci onemocnění známých jako mykobakteriózy u lidí a zvířat. Druh *Mycobacterium avium* se dělí na poddruhy *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) a *M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel et al., 1990). Přirozený rezervoár těchto potenciálně patogenních mykobakterií (PPM) představuje půda a voda jako například vodní toky, vodovodní systémy s pitnou vodou, biofilmy a aerosol. *M. avium* může být vymýváno z půdy přímo do vodních systémů, a tak kontaminovat vodu pro pitné účely (Kazda et al., 2009). V minulosti již také byly publikovány studie zkoumající možnou re-suspenzi sedimentů do vod nad nimi které potvrdily, že sedimenty mohou být rezervoárem patogenních bakterií, a tak představovat možné zdravotní riziko (Craig et al., 2004).

Zástupci druhu *M. avium* již byli detekováni například v městských distribučních systémech s pitnou vodou, ve vodovodních kohoutcích nemocnic, v bazénech a vířivkách (Havelaar et al., 1985; Du Moulin et al., 1988; Von Reyn et al., 1994; Covert et al., 1999; Falkinham III. et al., 2001). Rezistence druhu *M. avium* k dekontaminačním metodám jako je chlorace či ozonizace by mohla být vysvětlením pro stále častější detekci tohoto druhu v pitné vodě.

Cílem naší studie bylo sledovat výskyt poddruhů *M. avium* v sedimentech čtyř přehradních nádrží, v na ně navazujících kalesích z úpraven vod a v domácnostech

odebírajících tuto pitnou vodu v České republice pomocí kultivace a kvantitativní real-time PCR (qPCR). Dále bylo cílem zjistit v těchto vzorcích prevalenci NTM pomocí *Mycobacterium avium tuberculosis* komplex duplexní PCR metody (MTC duplex).

Materiál a metody

Celkem bylo ze čtyř oblastí odebráno 52 sedimentů z nádrží, 34 vzorků kalů z úpraven vod a 38 vzorků z nádržek na pitnou vodu v domácnostech. Sběr vzorků sedimentů probíhal pomocí gravitačních korů (vrchní 2 cm). Kal ze čtyř úpraven vod byl odebírán ze spádových filtrů během čištění. Sediment z nádržek na pitnou vodu v domácnostech byl odebírán pomocí Pasteurovy pipety.

Kultivace vzorků byla provedena pomocí dekontaminace HCl-NaOH a následnou inokulací na Herroldovo vaječné médium s ATB a Mykobaktinem J (Fischer et al., 2001). Inkubace probíhala při 25 °C, 30 °C a 37 °C.

Izolace DNA ze vzorků prostředí byla uskutečněna dle již dříve popsané metodiky (Kaevska et al., 2010). Pro kvantifikaci *MAP* byl použit systém duplex qPCR pro detekci specifické inserční sekvence *IS900* (Slana et al., 2008). Kvantifikace *MAA* a *MAH* probíhala pomocí systému triplex qPCR pro detekci *IS901* a *IS1245* (Slana et al., 2010). Pro specifické rozlišení zástupců MTC byla použita metoda MTC duplex, která využívá amplifikace oblasti genu *rpoB* (Mokaddas and Ahmad, 2007).

Výsledky

Kultivačně byly nejčastěji zachyceny mykobakteriální druhy jako *M. gordonae*, *M. triplex*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* a *MAA*. Z celkově 124 vyšetřených vzorků metodou qPCR bylo DNA druhu *M. avium* detekováno v 49 % vzorcích (61/124). Z toho bylo DNA *MAP* identifikováno v 69 % přehradních nádrží, 21 % úpraven vod a v 5 % domácností. DNA poddruhu *MAA* bylo identifikováno v 27 % nádrží, pouze ve 3 % úpraven vod a v 5 % domácností. Zatímco DNA *MAH* bylo detekováno v 50 % nádrží a v 11 % domácností, nepodařilo se jej prokázat v žádném vzorku kalu z úpraven vod. Celkově se detekované koncentrace pohybovaly v rozmezí 10^0 - 10^4 kopií mykobakteriální DNA/g. MTC duplex systémem byla prokázána pozitivita u 68 % vyšetřovaných vzorků (61/90).

Diskuse

DNA druhu *M. avium* jsme nejčastěji identifikovali ve vzorcích sedimentů přehradních nádrží. Statisticky významně vyšší podíl detekované DNA byl zjištěn v sedimentech přehradních nádrží, než v kalech z úpraven vod a v sedimentech z domácností. U *MAP* se podařil prokázat významný trend poklesu podílu DNA pozitivních vzorků ve směru nádrž – úpravna – domácnost. V tomto směru platil trend poklesu výskytu DNA druhu *M. avium* obecně. Statisticky byl také významný rozdíl z hlediska kvantifikace mezi dvěma ze čtyř celkově vyšetřovaných lokalit. DNA NTM byla prokázána v 68 % testovaných vzorků prostředí, která byla posléze potvrzena i kultivačně u 19 vzorků, což poukazuje na vyšší výskyt mykobakterií v těchto čtyřech zkoumaných lokalitách.

Závěr

Jelikož sedimenty a vodovodní systém jako takový mohou představovat jisté riziko pro osoby i zvířata se sníženou imunitou, naše studie se soustředila na detekci PPM právě

v těchto systémech. Naší studií jsme potvrdili výskyt PPM jak v přehradních nádržích, tak v kalech z úpraven vod a v pitné vodě; ovšem s klesajícím trendem směrem ke spotřebiteli.

Poděkování

Projekt byl financován grantem MZe0002716202 a projektem AdmireVet CZ 1.05/2.1.00/01.0006/ED0006/01/01.

Literatura

- COVERT, T.C.; RODGERS, M.R.; REYES, L.A.; STELMA, G.N., JR. Occurrence of nontuberculous mycobacteria on environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, no. 6, s. 2492-2496.
- CRAIG, D.L.; FALLOWFIELD, H.J.; CROMAN, N.J. Use of macrocosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, vol. 96, no. 5, s. 922-930.
- DU MOULIN, G.C.; STOTTMEIER, K.D.; PELLETIER, P.A.; TSANG, A.Y.; HEDLEY-WHYTE, J. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA: Journal of the American Medical Association*. 1988, vol. 260, no. 11, s. 1599-1601.
- FALKINHAM III., J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*. 2009, vol. 107, no. 2, s. 356-367.
- FISCHER, O., MATLOVA, L., DVORSKA, L., SVASTOVA, P., BARTL, J., MELICHAREK, I., WESTON, R.T.; PAVLIK, I. Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Medical and Veterinary Entomology*. 2001, vol. 15, no. 2, s. 208-211.
- HAVELAAR, A.H.; BERWALD, L.G.; GROOTHUIS, D.G.; BAAS, J.G. (1985) Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. *Zentralblatt fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology*. 1985, vol. 180, no. 5-6, s. 505-514.
- KAEVSKA, M.; SLANA, I.; KRALIK, P.; REISCHL, U.; OROSOVA, J.; HOLCIKOVA, A.; PAVLIK, I. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in neck lymph nodes of children and the tracing of infection in the environment by culture and triplex quantitative real time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, vol. 49, no. 1, s. 167-172.
- KAZDA, J.; PAVLIK, I.; FALKINHAM III., J.O.; HRUSKA, K. The Ecology of Mycobacteria: Impact on animal's and human's health. 2009. Springer, c2009. ISBN 978-1-4020-9412-5.
- MOKADDAS, E.; AHMAD, S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2007, vol. 60, s. 140-144.
- SLANA, I.; KAEVSKA, M.; KRALIK, P.; HORVATHOVA, A.; PAVLIK I. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*. 2010, vol. 144, no. 3-4, s. 437-443.
- SLANA, I.; KRALIK, P.; KRALOVA, A.; PAVLIK I. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 128, no. 2, s. 250-257.
- THOREL, M.F.; KRICHEVSKY, M.; LEVY-FREBAULT, V.V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1990, vol. 40, no. 3, s. 254-260.
- VON REYN, C.F.; MASLOW, J.N.; BARBER, T.W.; FALKINHAM III., J.O.; ARBEIT, R.D. Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *The Journal-Lancet*. 1994, vol. 343, no. 8906, s. 1137-1141.

Kontaktní adresa: Barbora Klanicová, MSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, klanicova@vri.cz

Rezistencia mikroorganizmov na dezinfekční prostriedky

Resistance of microorganisms to disinfectants

**Kachnič Ján, Ondrašovič Miloslav, Gregová Gabriela, Holičková Miroslava,
Koščo Ján**

*Katedra životného prostredie, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva
a farmácie v Košiciach*

Summary

*Listeriosis is an infectious bacterial disease of mammals and birds which belong to the group of diseases that are transmissible to humans. From existing species, only *Listeria monocytogenes* is pathogenic to humans and we can find it in a soil, plants and faeces. The most common transmission is caused by food (alimentary infection). Older people, pregnant women and people who have problems with immune systems are the most endangered group. In an effort to avoid complications of the character which is indicate, we were participating on the monitoring occurrence of *L. monocytogenes* in the meat factory with slaughterhouse. In the initial examinations we found positive findings from the floor, which we obtained from the places in the slaughterhouse, meat processing rooms and cold stores. Sanitation has been performed regularly. However it was found, that the temperature of water used for cleaning was ranged between 41-45°C. In the next microbiological examinations we found that the transmission of *L. monocytogenes* from slaughterhouse to another parts of meat factory was caused by contaminated footwear and by wheels of the carts. After application of HACCP rules, disinfection and adjustment critical points in the next time period, we found occurrence of *Listeria* only in the slaughterhouse. In another parts of meat factory the findings were negative.*

Keywords: *resistance; microorganisms; disinfectant; *Listeria monocytogenes**

Úvod

Podiel sanitácie na plnení spoločenských úloh formulovaných v oblasti ochrany zdravia a výživy obyvateľstva, ako aj rozsah a zložitosť činností, ktoré sa robia v rámci sanitácie, zvyrazňuje význam a potrebu jej všestranného zabezpečenia. Sanitáciu zaraďujeme medzi opatrenia, ktorými sa snažíme dosiahnuť zdravotnú nezávadnosť a čo najvyššiu kvalitu výrobkov, predĺžiť trvanlivosť výrobkov a znížiť straty pri spracovaní a preprave (Ondrašovič a kol., 1999).

Rozdielne spracovateľské procesy a dlhé dopravné cesty od výrobcu ku spotrebiteľovi, môžu zväčšovať riziko kontaminácie potravín rozkladajúcimi zárodkami a ich rozmnožovanie vo výrobku. Rozsah tohto rizika je závislý na množstve faktorov, z ktorých má najväčší význam mikrobiálna kontaminácia vstupných výrobných surovín, prídavných látok a pomocných látok a potom sekundárna kontaminácia všetkých surovín a látok, ktorá vzniká v priebehu ich opracovania a spracovania.

Národná implementácia nariadení EU (európskej únie) pre potraviny znamená pre producentov, výrobcov a distribútorov potravín nevyhnutnosť zabezpečiť systém ochrany spotrebiteľa založený na princípoch HACCP (hazard analysis critical control point). Jeden z rozhodujúcich kontrolných bodov HACCP programu je program analýzy rizika, ktorého zmyslom je zaručenie vyššej bezpečnosti potravín.

Na základe tohto princípu sa začal zdôrazňovať nie inšpekčný prístup (chemická a mikrobiologická analýza), ale systémový prístup k výrobe potravín živočíšneho pôvodu a zaobchádzaniu s nimi, ktorý je založený na prevencii.

Dezinfekcia technologických zariadení a pracovného priestoru môže byť rozhodujúci kontrolný bod v HACCP systéme a z toho dôvodu je stanovovanie možných biologických rizík. Zmyslom HACCP programu je zaručenie vyššej bezpečnosti potravín.

Materiál a metodika

Odber vzoriek bol vykonávaný pomocou sterilných tampónov do 10 ml sterilného fyziologického roztoku v objekte pred a po dezinfekcii po uplynutí požadovanej expozície. Odber vzorky pri kvantitatívnom vyšetrení bol urobený dôkladným sterom z plochy 10 cm² ohraničenej sterilnou šablónou. Pri kvalitatívnom vyšetrení sa ster odobral z plochy 100 cm². Vzorky boli odobraté z podlahy, bočných stien, stropu, ale aj z príslušenstva, ktoré sa nachádzali v objekte. Vzorky boli spracované do štyroch hodín po odbere. Stanovenie prítomnosti listerií bolo založené na ich zistení pomocou selektívneho agarového média Palcam po ich resuscitácii v tekutom selektívnom médiu Fraser (STN EN ISO 11290-1/A1). Pre stanovenie celkových počtov mikroorganizmov bola použitá agarová živná pôda s tryptónom, kvasnicovým extraktom a glukózou, kde sa mikroorganizmy kultivovali 72 hod. pri teplote 30°C (STN ISO 4833). Stanovenie koliformných mikroorganizmov bolo založené na počítaní kolónií mikroorganizmov po kultivácii na tuhom agarovom kultivačnom médiu VRBL (STN ISO 4832). Stanovenie počtu plesní bolo založené na počítaní kolónií mikroorganizmov po kultivácii na agarovom médiu Sauborad (STN ISO 7954).

Výsledky

Podiel sanitácie na plnení spoločenských úloh formulovaných v oblasti ochrany zdravia a výživy obyvateľstva, ako aj rozsah a zložitosť činností, ktoré sa robia v rámci sanitácie, zvyrazňujú význam a potrebu jej všestranného zabezpečenia. Kvalita mäsových produktov a výrobkov závisí od kvality prostredia, v ktorom sa spracováva, balí a distribuuje.

Sanitačná činnosť v prevádzkových podmienkach sa posudzovala na základe sterov odoberaných v pravidelných intervaloch z prevádzky, kde sa zvieratá porážajú a na to nadväzovala kontrola rozrábky mäsa a výroba. Z jednotlivých častí výroby boli z rôznych miest, najmä z častí podlahy, pracovných plôch a zariadení odoberané stery, kde sa predpokladalo mikrobiologické riziko pre danú výrobu.

Odbery boli vykonané z týchto úsekov: bitúnok, chladiareň, spojovacie chodby s rozrábkou, spojovacia chodba s výrobou tepelne opracovaných výrobkov, miestnosť na výrobu škvarkov, udiareň, baliareň a miestnosť na uskladnenie tepelne opracovaných výrobkov a expedičné chladiarne.

Diskusia

Listerióza je infekčné bakteriálne ochorenie cicavcov a vtákov ktoré patrí do skupiny zoonózných ochorení t.j. ochorení, ktoré sú prenosné na človeka. Z existujúcich druhov je pre človeka patogénna len *Listeria monocytogenes*. V prírode je značne rozšírená a nachádza sa v pôde, rastlinách a fekáliách. Najčastejší je prenos spôsobený potravou

(alimentárna infekcia). Najviac sú ohrození starší ľudia, tehotné ženy a ľudia s poruchami imunitného systému (Ondrejková a kol., 2003).

Nariadenie komisie ES č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pri kontrole potravín definuje postupy pri sledovaní prítomnosti *L. monocytogenes* v potravinách. Úradné kontroly zabezpečujú inšpektori ŠVPS SR. Pri zistení listérií v rámci následných opatrení je infikovaná potravinu stiahnutá z trhu a prijímajú sa opatrenia na zistenie príčin výskytu listérií, aby sa predišlo opakovanému výskytu a následného ochorenia spotrebiteľa. Nakoľko výskyt listérií v potravinárskom priemysle pretrváva, je prirodzenou snahou výrobcov predísť komplikáciám uvedeného charakteru. V rámci uvedeného sme sa podieľali na monitoringu výskytu listérie v prevádzke mäsokombinátu s bitúnkou (Pistl a kol. 2009).

V úvodných vyšetreniach boli zistené pozitívne nálezy z podlahy získané z priestorov od bitúнку cez priestor spracovania, ale aj v chladiarňach. Prehodnotená bola celková sanitácia ako aj možná cesta šírenia sa listérie v prevádzke. Pri hodnotení sanitácie, čo sa týka jej kvalitatívnej stránky bola vykonávaná pravidelne. Zistené však bolo, že teplota vody používaná na očistu sa pohybovala od 41- 45°C, pričom minimálna teplota vody pri mechanickej očiste by mala byť minimálne 65°C.

Ďalším mikrobiologickým vyšetrením bolo zistené, že prenos listérie bol z priestorov bitúнку do ďalších častí prevádzky spôsobený znečistenou obuvou a kolieskami vozíkov. Uplatnením zásad HACCP a úpravou kritických miest v ďalšom období bola prítomnosť listérie zaznamenávaná len na bitúнку, avšak v ďalších častiach mäsokombinátu boli nálezy negatívne.

Záver

Na základe uvedených zistení boli prijaté nasledovné opatrenia: kapacitne bol doriešený prísun dostatočného množstva vody s požadovanou teplotou, v rámci celej prevádzky a používané boli aj vysokotlakové zariadenia s možnosťou ohrevu vody, dobudované boli dezinfekčné brody na chodbách medzi bitúnkou a ďalšími časťami objektu, vrátane chodby pre odvoz konfiškátu. Konštruované boli tak, aby ich nebolo možné obísť, vykonaná bola celková dezinfekcia objektu postrekom ale aj aerosólom. Dezinfekcia vyžaduje použitie vhodného dezinfekčného prostriedku, ale zároveň jej účinnosť závisí od mechanickej očisty vykonanej pred dezinfekciou. Pri mechanickej očiste sa doporučuje použiť vysokotlakové zariadenia s možnosťou ohrevu vody minimálne na 65°C.

Literatúra

ONDRAŠOVIČ, M. a kol.: Využitie persterilu na dezinfekciu v potravinárskom priemysle, Zborník prednášok a posterov, *Hygiena alimentorum XX*, 1999, s. 181.

ONDREJKOVÁ, A. a kol.: *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 9, (6), 280-283, 2003.

PISTL, J. a kol.: *Stále aktuálne zoonózy: prionózy, borelióza, salmonelóza a E. coli infekcie u ľudí a zvierat*, Košice, 2009.

Kontaktná adresa: Ján Kachnič, MVDr., Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, kachnic.jano@gmail.com

Porovnání účinků platiny, paladia a rhodia na vegetativní růst okřehku menšího (*Lemna minor*)

Comparison of platinum, palladium and rhodium effects on vegetative growth of duckweed (*Lemna minor*)

Němcová Barbora, Bednářová Ivana, Mikulášková Hana, Straková Lenka,
Beklová Miroslava

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Platinum group metals (PGM): platinum, palladium and rhodium are in foreground of current research interest in view of the pollution of the environment. These rare elements are used as catalytic effective substance in automotive catalysts to reduce polluting emissions originating from fuel combustion. The main source of contamination surface waters is rainfall runoff from roads with high traffic density.

*We have based our study on PtCl₄, PdCl₂, RhCl₃ effects on duckweed (*Lemna minor*) vegetative growth monitoring and comparison of inhibitory effects. The duckweed is a significant ecotoxicological bioindicator revealing changes in aquatic environment. The experiments were carried out on the basis of OECD 221 (ČSN ISO 20079). The growth inhibition and morphological changes in individual colonies of fronds have been found out as a result of the effect of platinum group metals. The EC₅₀ (effective concentration) was determined after 7 - day test. 168hEC₅₀ PtCl₄ was estimated on 12.2 μM. The higher inhibition effect of PdCl₂, RhCl₃ was found under the concentration 25 μM.*

Keywords: *duckweed (*Lemna minor*); platinum group metals; platinum; palladium; rhodium*

Úvod

Mezi aktuálně sledované environmentální polutanty patří skupina platinových kovů (PGM, zejména Pt, Pd a Rh). Za nejvýznamnější zdroje emisí platinových kovů je považována silniční doprava a odpadní vody z nemocničních zařízení obsahující rezidua cytostatik na bázi cisplatiny (Ravindra et al., 2004). Jedná se o vzácné prvky, které jsou využívány jako katalyticky účinná substance v automobilových katalyzátorech k redukci emisí škodlivin vznikajících při spalování pohonných hmot. Hlavní cestou kontaminace povrchových vod jsou splachy srážkových vod z povrchu komunikací s vysokou intenzitou dopravy (Šucmanová et al., 2008).

V půdě v blízkosti frekventovaných komunikací byly prokázány vysoké koncentrace platinových kovů. Chování a účinky platinových kovů zatím nejsou blíže prostudovány, zejména jejich distribuce v rámci potravního řetězce a schopnost bioakumulace. Tato situace je dána především velmi nízkým obsah těchto kovů ve vzorcích z životního prostředí a úskalími jejich detekce moderními analytickými přístroji. Mezi odborníky na tuto tematiku existuje názor, že emitované PGM, ať již ve formě kovů či sloučenin, vykazují pouze nízký toxický potenciál. Nicméně, mobilní část emitovaných kovů, stejně jako část, která podstoupí přeměnu na rozpustné formy v životním prostředí, představuje vážnou hrozbu jak pro rostliny, tak pro živočichy (Ravindra et al., 2004).

Pro získání objektivních informací o míře poškození jednotlivých složek životního prostředí je nezbytná ekotoxikologická analýza, která je založena na stanovení

toxických efektů (mortalita, imobilizace, inhibice apod.) u vhodných živočišných a rostlinných druhů (Beklová, 2003). Mezi bioindikátory ekotoxikologických změn ve vodním prostředí patří cévnaté rostliny z čeledi okřehkovitých (*Lemnaceae*), které mají pro tento účel mnoho vhodných vlastností a vzhledem ke schopnosti kumulovat kovy jsou vhodné pro použití při monitorování kvality vody a v laboratorních testech (Horvat et al., 2007).

Cílem naší studie bylo sledovat účinky PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 na morfologii a vegetativní růst kolonií vodní rostliny okřehku menšího (*Lemna minor*) a následně porovnat jejich inhibiční účinky.

Materiál a metody

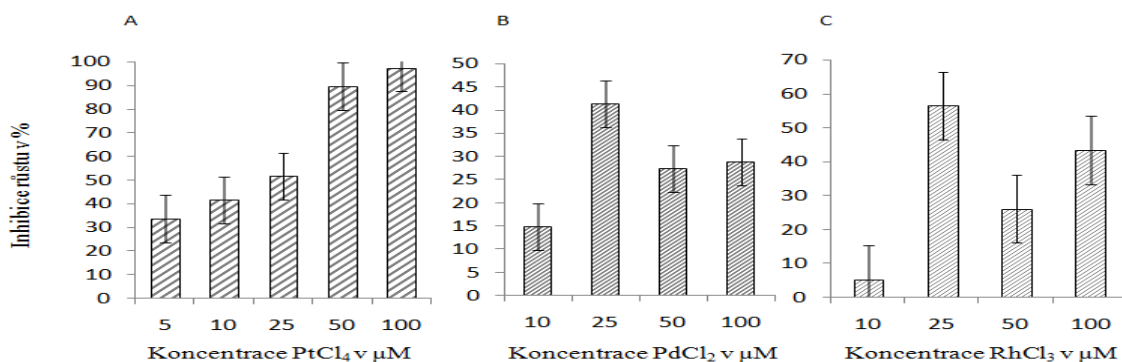
Experimenty byly provedeny na základě metodiky OECD 221 a ČSN EN ISO 20079 Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody na okřehku (*Lemna minor*). V experimentu byly kolonie lístků okřehku menšího (*Lemna minor*) vystaveny působení PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 v koncentracích 0; 5; 10; 25; 50 a 100 μM , ve třech opakováních pro každou koncentraci i kontrolu. Jednotlivé koncentrace platinových kovů byly připraveny za použití SIS media (pH $6,5 \pm 0,2$), ve kterém je také dlouhodobě kultivována zásobní kultura okřehku menšího v naší laboratoři. Pro každou koncentraci a kontrolu bylo na začátku testu vybráno 10 rostlin okřehku. Rostliny byly kultivovány po dobu sedmi dní pod světelným roštem při kontinuálním osvětlení (6 500 - 10 000 lux) a při teplotě 24 ± 2 °C.

Na konci testu, za 168 hodin se sledoval počet rostlin s cílem kvantifikovat účinek platinových kovů na vegetativní růst okřehku a morfologické změny, všechny anomálie a viditelné známky fytotoxicity jako např. abnormální velikost lístků, chloróza, nekróza, rozpadání kolonií. Provedli jsme výpočet růstových rychlostí a následně inhibice růstu ve srovnání s kontrolou. V průběhu testu byly dodrženy podmínky stanovené v metodikách a také byla splněna kritéria platnosti testů (OECD 221, ČSN EN ISO 20079).

Pomocí komerčně dostupného softwaru jsme na základě získaných inhibičních hodnot vyhodnotili 168hEC_{50} , tzn. koncentraci, vyvolávající 50% inhibici růstu okřehku menšího vystaveného podmínkám testu, který trvá 168 hodin, ve srovnání s kontrolou.

Výsledky a diskuse

Názorné porovnání vlivů jednotlivých kovů na okřehku menší ukazuje Obr. 1 A - C. Z grafu poukazujícího na vliv PtCl_4 Obr. 1 A, je možno konstatovat, že se vzrůstající koncentrací aplikovaného kovu dochází u okřehku menšího k výrazné inhibici růstu v porovnání s kontrolou. Hodnota 168hEC_{50} pro PtCl_4 byla stanovena na 12,2 μM . U PdCl_2 a RhCl_3 došlo u koncentrace 5 μM k mírné stimulaci růstu a k nejvýraznější inhibici růstu došlo u koncentrací 25 μM (Obr. 1 B a C). Z tohoto důvodu se nám nepodařilo stanovit hodnotu 168hEC_{50} . U koncentrací 25; 50 a 100 μM došlo k výskytu morfologických změn na jednotlivých koloniích (chloróza a nekróza lístků).



Obrázek 1: Inhibice růstu okřehku menšího (*Lemna minor*)

Závěr

Účinky platinových kovů na vegetativní růst okřehku menšího se projevily inhibicí růstu a morfologickými změnami lístků jednotlivých kolonií. Pomocí koeficientu bioakumulace, lze PGM zařadit mezi kovy špatně až středně dostupné pro rostliny. Hodnota 168hEC₅₀ pro PtCl₄ byla 12,2 µM. U PdCl₂ a RhCl₃ byla nejvyšší inhibice zaznamenána u koncentrace 25 µM, ve vyšších koncentracích 50 a 100 µM nastal pokles inhibice v důsledku vysrážení kovu do nerozpustného komplexu. Proto se nám nepodařilo potvrdit trend toxického působení udávaný literaturou (Rh(III) <<Pt(IV) <Pd(II)) (Farago and Parsons, 1994).

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 82/2012/FVHE a MŠMT 6215712402.

Literatura

- BEKLOVÁ, M. Využití okřehku menšího *Lemna minor* ve vodní toxikologii. In *Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*. 2003, s. 16-20.
- FARAGO, M.E., PARSONS, P.J. The effects of various platinum metal species on the water plant *Eichhornia Crassipes* (Mart.) solms. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 1994, vol. 6, no. 1, s. 1-12.
- HORVAT, T., VIDA KOVIC-CIFREK, Z., ORESCANIN, V., TKALEC, M., PEVALEK-KOZINA, B. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Science of the total environment*. 2007, vol. 384, s. 229-238.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals – Revised Proposal for a New Guideline 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. 221. 2002.
- RAVINDRA, K., BENCS L., VAN GRIEKEN R. Platinum group elements in the environment and their health risk. *Science of the Total Environment*. 2004, vol. 318, s.1-43.
- ŠUCMANOVÁ, M., ZISCHKA, M., ADAMEC, V. K metodám stanovení některých rizikových mikroelementů z dopravy v prachových částicích. 2008, poslední revize 31. 3. 2009 [cit. 26. 3. 2012]. Dostupné z URL: <http://www.cdv.cz/k-metodam-stanoveni-nekterych-rizikovych-mikroelementu-z-dopravy-v-prachovych-casticich/>.

Kontaktní adresa: Barbora Němcová, Mgr., Ústav veterinární ekologie a životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11006@vfu.cz

Vliv vybraných platinových kovů na antioxidační aktivitu u rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.) a kukuřice (*Zea mays* L.)

Influence of selected platinum metals on antioxidant activity in pea plants (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.)

Mikulášková Hana, Bednářová Ivana, Němcová Barbora, Beklová Miroslava

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Platinum metals are primarily used in automotive catalysts, which facilitate the oxidation-reduction reactions leading to the purification of exhaust gases. The increase in concentration of platinum metals in the environment raises issues mainly due to the adverse effects on human health through possible contamination of the food chain. This study is based on monitoring the impact of platinum (Pt), palladium (Pd) and rhodium (Rh) on the antioxidant activity of pea plants (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.) are an important part of the food chain. In the experiment, seeds of plants exposed to different concentrations of ions of platinum, palladium and rhodium (0, 5, 10, 25, 50, 100 μM) for eight and twelve days. Antioxidant activity was determined using spectrophotometric methods ABTS. The measured values of antioxidant stress point to different antioxidant activity not only at individual plants, but also above-ground parts and roots of plants.

Keywords: platinum group metals; *Zea mays*; *Pisum sativum*

Úvod

V životním prostředí dochází k postupnému nárůstu těžkých kovů díky antropogenní činnosti (Locatelli et al., 2005). Mezi hlavní činitele patří automobilová doprava, která má za následek nepříznivý dopad na základní složky ekosystému, jako je voda, půda a ovzduší. Hlavní příčinou tohoto znečištění jsou emise vzniklé spalováním uhlovodíkových paliv, při kterém vznikají vlivem nedokonalého spalování škodliviny, které jsou pak v podobě výfukových plynů emitovány do ovzduší. Následkem toho jsou do automobilů montovány katalyzátory za účelem snížení produkce plynných škodlivin. V kombinaci oxidačně-redukční reakce a vysoké teploty dochází k průniku vzácných kovů (zejména Pt, Pd, Rh) do životního prostředí (Sikorová et al., 2011). Proto se automobilové katalyzátory řadí mezi hlavní antropogenní zdroje znečištění životního prostředí platinovými kovy.

Z důvodu značného rozšíření do životního prostředí se platinové kovy staly celosvětovým problémem a nárůst koncentrací těchto kovů v životním prostředí vzbuzuje obavy z možného průniku kontaminantů do potravního řetězce a možných zdravotních rizik ve vztahu k obyvatelstvu (Labra et al., 2005).

Pro získání objektivních informací o míře zatížení životního prostředí škodlivými látkami, jsou vedle ekotoxikologických analýz důležité i analýzy chemické.

Materiál a metody

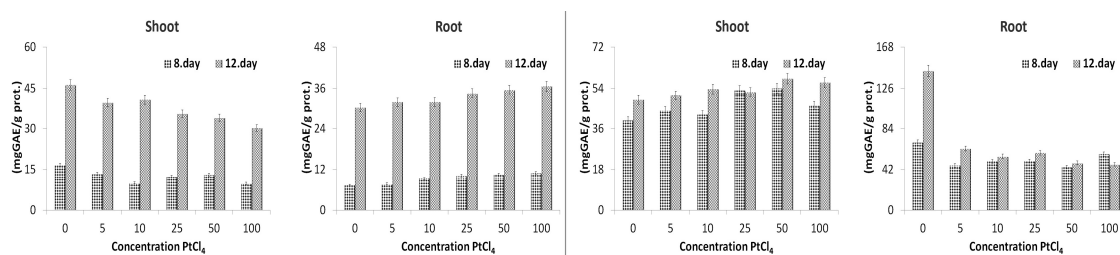
Ke stanovení inhibičních účinků platinových kovů (Pt), (Pd), (Rh) na klíčení a růst rostlin v počátečních stádiích vývoje, byla použita semena hrachu (*Pisum sativum* L.) a kukuřice (*Zea mays* L.). V experimentu byla semena rostlin vystavena působení PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 v koncentracích 0; 5; 10; 25; 50 a 100 μM . Pro každou koncentraci a

kontrolu bylo vybráno 100 semen rozmístěných na klíčních destičkách pokrytých buničinou. Klíční destičky byly umístěny do nádob o objemu 500 ml. Do každé nádoby bylo aplikováno 300 ml příslušné koncentrace kovu tak, aby konce buničiny byly smáčeny v roztoku a docházelo k jeho vzlínání k semenům. Jako ředící voda byla použita destilovaná voda. Následně byla semena klíčena v kultivačním boxu po dobu 8 a 12 dnů ve tmě při teplotě 25° C a vlhkosti 60 %. V 8. a 12. dnu experimentu byly provedeny odběry klíčků, u kterých byly zjištěny metrické údaje (délka, hmotnost) nadzemní a kořenové části.

Bioakumulace platinových kovů v rostlinách byla sledována pomocí biochemických a enzymatických analýz. Pomocí spektrofotometru BS-400 byla stanovena antioxidační aktivita ABTS.

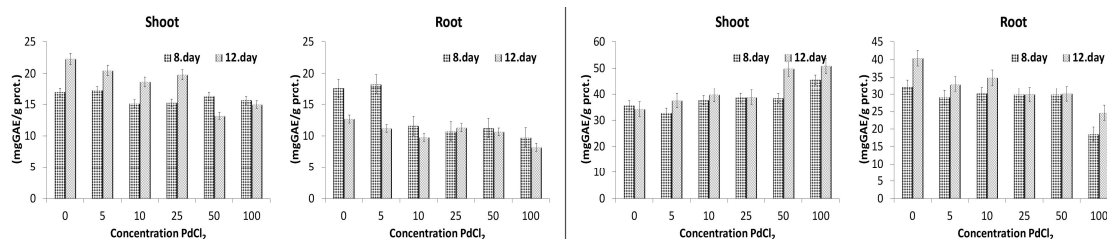
Výsledky a diskuse

Těžké kovy mohou svou přítomností podmínit vznik volných kyslíkových radikálů (O_2^- , O^{2-} , H_2O_2 , OH), které vyvolávají oxidativní stres peroxidací lipidů membrán a změnami v proteinových řetězcích. Ochrannou funkci proti volným kyslíkovým radikálům mají antioxidační enzymy (Gratao et al., 2005). Pro zhodnocení míry stresu u rostlin byla stanovena antioxidační aktivita pomocí metody ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina)), která patří mezi základní a rychlé metody stanovení antioxidační aktivity (Fogliano, 1999; Paulová, 2004). Naměřené výsledky byly přepočteny na množství kyseliny gallové a 1g proteinu, který byl stanoven podle metody Bradford. Názorné porovnání vlivů jednotlivých kovů na rostliny hrachu a kukuřice ukazují obrázky 1 – 3. Z grafu poukazující na vliv $PtCl_4$ Obr. 1 A je možno konstatovat, že se vzrůstající koncentrací aplikovaného kovu dochází u rostlin hrachu v nadzemních částech k poklesu antioxidační aktivity ABTS v 8. dnu o 43 % a ve 12. dnu o 35 % v porovnání s kontrolou, naopak v kořenových částech došlo k prudkému nárůstu této aktivity (Obr. 1B). V případě rostlin kukuřice je z grafů (Obr. 1 C, D) patrný znatelný nárůst aktivity ABTS u nadzemních částí, v kořenových částech pak došlo ke snížení ABTS v 8. dnu o 17 % a 12. dnu o 67 %.



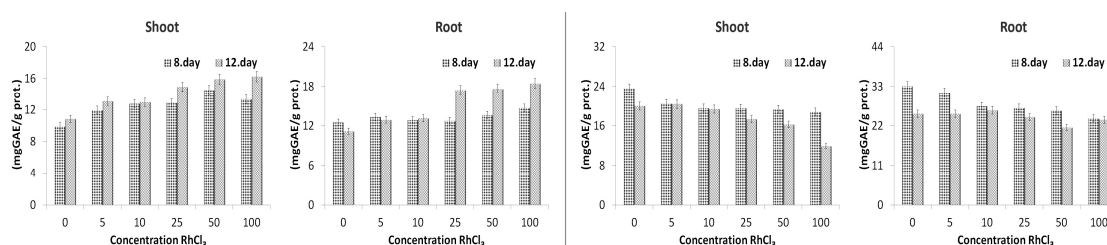
Obrázek 1: ABTS hrách (A,B), kukuřice (C,D)

Při hodnocení výsledků vlivu $PdCl_2$ jsme dospěli k následujícím závěrům (Obr. 2 A,B). U rostlin hrachu došlo v nadzemních i kořenových částech k poklesu aktivity ABTS, a to u nadzemních částí v 8. dnu o 8 % a ve 12. dnu o 33 %, u kořenových částí v 8. dnu o 44 % a ve 12. dnu o 35 %. Naopak u kukuřice došlo v nadzemních částech k nárůstu aktivity ABTS, a to v 8. dnu o 29 % a ve 12. dnu o 47 %, u kořenů pak bylo patrné snížení měřené aktivity v 8. dnu o 44 % a ve 12. dnu o 40 % (Obr. 2 C,D).



Obrázek 2: ABTS hrách (A,B), kukuřice (C,D)

Dále byl hodnocen vliv $RhCl_3$ na antioxidační aktivitu ABTS hrachu a kukuřice (Obr. 3), kde rostliny hrachu reagovaly na přítomný kov zvýšením aktivity ABTS a to v 8. dnu o 44 % a ve 12. dnu o 60 % u nadzemních částí a u kořenových v 8. dnu o 17 % a ve 12. dnu o 63 % (Obr. 3 A,B). U kukuřice naopak došlo k poklesům aktivity ABTS a to u nadzemních částí v 8. dnu o 25 % a ve 12. dnu 40 %, u kořenových částí pak v 8. dnu o 27 % a ve 12. dnu o 7 %.



Obrázek 3: ABTS hrách (A,B), kukuřice (C,D)

Závěr

Po vyhodnocení výsledků jsme došli k závěru, že jednotlivé aplikované kovy působí na aktivitu ABTS rozdílně, a to nejen u jednotlivých rostlin, ale i v nadzemních a kořenových částech rostlin. Ve vzorcích, u kterých byl pozorován nárůstu aktivity ABTS je pravděpodobné, že vlivem aplikovaných kovů došlo v rostlinách ke zvýšenému oxidativnímu poškození.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 25/2012/FVHE a MSM 6215712402.

Literatura

- GATAO, PL., POLLE, A., LEA, PJ., AZEVEDO, RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 2005, 32(6), s. 481 - 94.
- LABRA, M., GIANAZZA, E., EBERINI, I., SOZZI, A., REGONDI, S., GRASSI, F., AGRADI, E. Zea mays L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*. 2006, vol. 62, iss. 8, s. 1234 - 1244.
- LOCATELLI, C., MELUCCI, D., TORSI, G. Determination of platinum-group metals and lead in vegetable environmental bio-monitors by voltammetric and spectroscopic techniques: critical comparison. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005, vol. 382, iss. 7, s. 1567 - 1573.
- PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *IN VITRO*. *Chemické Listy*. 2004, Volume:98, s. 174 - 179.
- SIKOROVÁ, L., LIČBINSKÝ, R., ADAMEC, V. Platinové kovy z automobilových katalyzátorů v životním prostředí. *Chemické Listy*, 2011, vol. 105, s. 361 - 366.

Kontaktní adresa: Hana Mikulášková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H10007@VFU.cz

Hodnotenie pôsobenia nízkych dávok ionizujúceho žiarenia a glyfosatu na *Artemia franciscana*

Valuation of the effect of low doses of ionising radiation and of glyphosate on *Artemia franciscana*

¹Špalková Michaela, ²Falis Marcel, ³Žďárský Michal, ¹Renčko Andrej

¹Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

²Ústav toxikológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

³Ústav biochemie, chemie a biofyziky, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The goal of our study was to observe the effect of low doses of ionising radiation and of glyphosate on the lethality of *Artemia franciscana*. Significant increase of the lethality was observed as in the group of solitary ionising radiation at doses of 40 and 50 Gy at 96th hour, as in the group of combination of glyphosate and of ionising radiation at doses of 20, 40 and 50 Gy at 48th, 72nd and 96th hour. On the other hand, in the group of combination of glyphosate and of ionising radiation at a dose of 30 Gy we observed significant decrease of the lethality in compare with the combined group of glyphosate and of ionising radiation at doses of 20, 40 and 50 Gy at 48th, 72nd and 96th hour. These results could support the theory of radiation hormesis at the level of a dose of 30 Gy.

Keywords: *Artemia franciscana*; glyphosate; ionising radiation; lethality; radiation hormesis

Úvod

Súčasným trendom je znižovanie počtu pokusov na zvieratách na minimum. Preto sme v tejto práci využili alternatívny biotest II. Generácie na *Artemia franciscana* (Dvořák a Beňová, 2002).

Zintenzívňovanie poľnohospodárskej výroby má za následok zvýšené využívanie pesticídov, a tým zvýšené zaťaženie ekosystému a značné hospodárske problémy. Glyfosát patrí medzi neselektívne herbicídy. Prípravky na jeho báze obsahujú účinnú látku prirodzene v 41% a 1% koncentracii. Okrem účinnej látky prípravky obsahujú aj zmes soli isopropylamínu (IPA), činidiel rôznych prídavných zložiek, ako napr. protipeniacich a farebných prísad, biocídov a anorganických iónov na úpravu pH (Bradberry a kol., 2004).

Materiál a metódy

V experimente boli použité *Artemia franciscana* vyliahnuté v morskej vode (Dvořák a kol., 2005). 10 ks čerstvo vyliahnutých naupliových štádií sme umiestnili do polystyrénových Petriho misiek o priemere 60 mm pri celkovom objeme morskej vody 10 ml (vrátane vzorky). V pokuse bol použitý roztok glyfosatu v koncentrácii 500 mg.l⁻¹. Skúmaný roztok bol riedený v morskej vode. Naupliové štádiá boli ožiarené gama lúčmi a absorbovali dávku 20, 30, 40 a 50 Gy (⁶⁰Co, Chisostat, Chirana) pri dávkovom príkone 11,36 Gy.min⁻¹. Experiment bol rozdelený do jednej kontrolnej a 9 pokusných skupín (tabuľka 1).

V každej skupine bolo 50 jedincov, ktorí boli rozdelení do 5 samostatných skupín (misiiek) po 10 jedincoch. V experimente bolo celkovo použitých 500 jedincov. Petriho

misky boli po predchádzajúcej dezinfekcii termostatu (Kočišová, 2005) umiestnené pri teplote 20 ± 1 °C.

Tabuľka 1: Pokusné objekty boli rozdelené do 10 skupín nasledovne

Rozdelenie pokusných skupín	Koncentrácia glyfosatu (mg.l^{-1})	Dávka ionizujúceho žiarenia (Gy)
K	0	0
20Gy	0	20
30Gy	0	30
40Gy	0	40
50Gy	0	50
G	500	0
G20Gy	500	20
G30Gy	500	30
G40Gy	500	40
G50Gy	500	50

V časovom intervale 24, 48, 72 a 96 hod. sme vykonali odčítanie živých artémií. Výsledky sme porovnali oproti kontrolnej skupine a štatisticky vyhodnotili. Zároveň boli štatisticky porovnané ožiarené skupiny s glyfosatom. Na vylúčenie odľahlých hodnôt sme použili Deanov-Dixonov test (Dvořák, 1995). Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme testovali pomocou signifikantných rozdielov preukázateľnosti (Wayland, 1991).

Výsledky

Tabuľka 2: Letalita (%) *Artemia franciscana*

Skupina experimentu	24 hod.			48 hod.			72 hod.			96 hod.		
	x	N	s	X	n	s	X	N	S	X	N	S
K	0	5	0	0	5	0	0	5	0	2	5	4,3
20Gy	3	5	8,6	3	5	8,6	3	5	8,6	4	5	4,3
30Gy	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0
40Gy	0	5	0	1	5	4,3	5	5	4,3	16*	5	8,6
50Gy	3	5	4,3	3	5	4,3	3	5	4,3	17*	5	4,3
G	0	5	0	0	5	0	0	5	0	1	5	4,3
G20Gy	3	5	4,3	14*	5	8,6	**18*	5	12,9	**20*	5	4,3
G30Gy	0	5	0	3	5	4,3	3	5	4,3	4	5	4,3
G40Gy	0	5	0	**20*	5	8,6	**20*	5	8,6	**27*	5	4,3
G50Gy	0	5	0	**25*	5	8,6	**26*	5	4,3	**26*	5	4,3

x - priemerná letalita v %

n - počet testovaných skupín

s - smerodajná odchýlka

* - štatistická významnosť preukázaná v porovnaní s kontrolnou skupinou

** - štatistická významnosť preukázaná v porovnaní so skupinou G30Gy

V kontrolnej skupine sme pozorovali maximálnu letalitu *Artemia franciscana* na úrovni 2%, a to po 96 hodinách. Po 24 hodinách expozície sme nepozorovali štatisticky významné zmeny letality medzi kontrolou a experimentálnymi skupinami. Po 48 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zmeny letality v skupinách

s glyfosatom po ožiarení dávkami 20 (G20Gy), 40 (G40Gy) a 50 Gy (G50Gy). Po 72 a 96 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality oproti kontrolnej skupine v rovnakých skupinách ako po 48 hodinách. Po 96 hodinách expozície sme však v porovnaní s kontrolnou skupinou pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality ešte aj v skupinách po samotnom ožiarení s dávkami 40 (40Gy) a 50 Gy (50Gy). V skupine vystavenej glyfosatu a žiareniu na úrovni 30 Gy (G30Gy) sme zaznamenali štatisticky významné zníženie letality oproti skupine s glyfosatom a žiarením na úrovni 40 Gy (G40Gy) a 50 Gy (G50Gy) po 48 hodinách. Po 72 a 96 hodinách sme pozorovali v skupine G30Gy štatisticky významné zníženie letality oproti skupinám s glyfosatom a žiarením na úrovni 20 (G20Gy), 40 (G40Gy) a 50 Gy (G50Gy).

Diskusia

Glyfosat má široké spektrum herbicídneho účinku proti jednoročným a viacročným burinám. Environmentálne vlastnosti tohto herbicídu ako jeho imobilita v pôde, rýchla pôdna inaktivácia a pôdna biodegradácia nie sú známe. Tento herbicíd je prakticky netoxický na „nerastlinné“ formy života, ako napr. pre vodné organizmy, vtáky, zvieratá a ľudí (Malik a kol., 1989). Aj výsledky nášho experimentu dokazujú, že pre vodné kôrovce nie je toxický.

Herbicídy na báze glyfosatu (napr. Roundup ®) sú často využívané vo vodnom životnom prostredí. Skúmala sa toxicita štyroch foriem glyfosatu na vodné organizmy (*Vibrio fischeri*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Tetrahymena pyriformis*, *Euplotes vannus*, *Ceriodaphnia dubia* a *Acartia tonsa*). Toxicita chemikálií bola nasledovná: POEA (polyoxyetylén amín) > Roundup ® > kyselina glyfosatu > isopropylamínova soľ glyfosatu (IPA). Toxicita kyseliny glyfosatu bola spôsobená jeho veľkou kyslosťou (Tsui a Chu, 2003). V našom experimente bol použitý produkt Roundup ®. Mann a Bidwell (1999) sledovali akútnu toxicitu kyseliny glyfosatu, IPA a troch solí glyfosatu na dospelých žabách a žubrienkach štyroch druhov juhozápadných austrálskych žiab s výraznou senzitivitou juvenilných foriem druhu *Litoria moorei*. Relyea (2005) pozoroval toxicitu Roundup ® na severoamerických druhoch žiab. Výsledkom bol úhyn 96 – 100% larválnych foriem a 68 – 86% juvenilných foriem. Negatívny vplyv ionizujúceho žiarenia potvrdzujú aj výsledky experimentu Beňovej a kol. (2007), kde boli dosiahnuté podobné hodnoty letality pri žiarení s dávkou 50 Gy ako v našom experimente. V našom experimente sa pri účinku glyfosatu a ionizujúceho žiarenia s dávkami 20, 40 a 50 Gy sumovali negatívne účinky faktorov. V prípade žiarenia na úrovni 30 Gy sa prejavil účinok radiačnej hormézie (Hrnčič, 1999). Obdobné výsledky potvrdzujúce radiačnú horméziu boli zaznamenané v štúdiu Beňovej a kol. (2007) na úrovni dávky 10 Gy, kde sa však zisťovali účinky interakcií ťažkých kovov (Cd, Cr) a žiarenia.

Pod'akovanie

Prezentovaná práca vznikla za podpory Národného referenčného laboratória pre pesticídy UVLF-KE a projektu Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy ČR IGA VFU Brno 92/2011/FVHE, (IG212112).

Literatúra

Beňová, K., Dvořák, P., Falis, M., Sklenář, Z., 2007: Interaction of Low Dosis of Ionizing Radiation, Potassium Dichromate and Cadmium Chloride in *Artemia franciscana* Biotest. Acta Vet. Brno, 76, 35 – 40.

- Bradberry, S., M., Proudfoot, A., T., Vale, J., A., 2004: Glyphosate poisoning. *Toxicol. Rev.*, 23, 3, 159 – 167.
- Dvořák, P., 1995: Modifikovaný test s *A. salina* pro sledování vlivu interakcí cizorodých látek. Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí (sborník). Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický a Aqachemie, Milenovice, 25-29.
- Dvořák, P., Beňová, K., 2002: The investigation of interactions of low doses of ionizing radiation and risk factors by means of *Artemia salina* biotest. *Folia Veterinaria*, 46, 4, 195 - 197.
- Dvořák, P., Šucman, E., Beňová, K.: The development of a ten day biotest using *artemia salina* nauplii. *Biologia*, Bratislava, 60/5; 593-597, 2005.
- Kočišová, A.: Dezinfekcia prostredia – súčasť preventívnych opatrení pri infekčných chorobách a parazitózach v chovoch zvierat, *Dezinfekce, Dezinspekce, Deratizace*, 4, ročník XIV, 2005, str. 149 – 153.
- Malik, J., Barry, G., Kishore, G., 1989: The herbicide glyphosate. *BioFactors*, 2, 1, 17 – 25.
- Mann, R., M., Bidwell, J., R., 1999: The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 2, 193 – 199.
- Relyea, R., A., 2005: The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol. Appl.*, 15, 4, 1118 – 1124.
- Tsui, M., T., K., Chu, L., M., 2003: Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of enviromental factors. *Chemosphere*, 52, 7, 1189 – 1197.
- Wayland, J., Hayes, Jr. Dosage and Other Factors Influencing Toxicity. In *Handbook of Pesticide Toxicology. Volum 1. General Principles*. Academic Press 1991. p. 39-97.
- Kontaktná adresa:** Michaela Špalková, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, SR, mimika.pu@gmail.com

Spolupůsobení arsénu a sinic na hematologické parametry *Oncorhynchus mykiss*

Interaction of arsenic and cyanobacteria on haematological parameters of *Oncorhynchus mykiss*

Navrátil Lukáš, Palíková Miloslava, Navrátil Stanislav

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Development of cyanobacteria is a worldwide problem. Cyanotoxins are products of secondary metabolism of cyanobacteria. Cyanotoxins affect haematological parameters in blood of fish. Arsenic is a toxic element that is commonly found in feed mixtures for fish. The aim of this study was to find new information about the interaction of arsenic and cyanobacteria on haematological parameters of rainbow trout.

Keywords: cyanobacteria; arsenic; leukocytes; opsonization; recirculation

Úvod

Arsén

V mnoha rozvojových zemích jsou vysoké koncentrace arsénu v podzemních vodách. V dnešní době se využívá arsén a sloučeniny arsénu většinou v průmyslu na výrobu skla, různých emailů, pigmentů a v metalurgii (Szkoda et al., 2009). Toxicita arsénu závisí na chemické formě, toxičtější je jeho anorganická forma. Chronické účinky arsénu mohou způsobovat leukopenii, anémii, rakovinu kůže a plic. Arsén do prostředí vstupuje díky znečištění vodního prostředí, zejména antropogenní činností. Arsén do sebe mohou naakumulovat ryby i měkkýši, a pokud jsou konzumovány lidmi, tak se dostává arsén dále do potravního řetězce (Martin et al., 2012). Arsén ve vodním prostředí může ovlivnit vodní bionty a tím představuje riziko pro ryby (Kumar et al., 2011). Arsén způsobuje u ryb snížení počtu červených krvinek a snížení počtu leukocytů (Abernathy et al., 2003).

Sinice

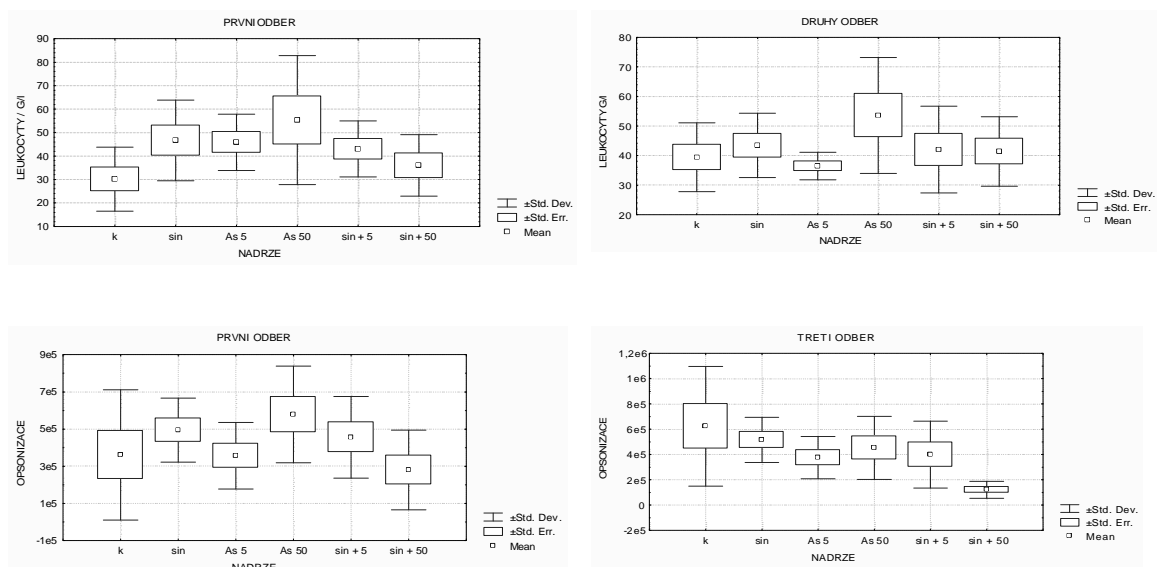
Celá řada druhů cyanobakterií produkuje několik variant microcystinů, v daném kmeni obvykle převládá jedna až tři varianty. Nejběžnější formou jsou microcystiny –LR, -YR a –RR, jedná se o zkratky aminokyselin v poloze 2 a 4 a jejich desmethylovaných derivátů (Sivonen and Jones, 1999). Microcystiny jsou globálně distribuované ve sladkých vodách a to ve formě vodního květu. Tento květ narušuje vodní ekosystémy celého světa, především eutrofizované (Yang et al. 2010). Microcystiny mohou způsobit oxidační stres u koryšů (Vinagre, 2003) a ten je spojen s imunosupresí u ryb (Rymuszka, 2008).

Hematologické změny parametrů byly zjištěny v některých studiích, v nichž byly ryby vystaveny přirozeným účinkům cyanotoxinů (Kopp et al, 2005; Kopp et al.2009; Kopp et al 2010). Tyto účinky jsou přirozenější, ale pozorované změny mohou mít za následek nejen toxicitu cyanotoxinů, ale také další vedlejší účinky jako je hypoxie, vyšší pH, vysoké koncentrace čpavku a možné další, které jsou ve vodě (Sieroslawska et al., 2011).

Materiál a metodika

V pokusu bylo použito 125 kusů *Oncorhynchus mykiss*. Po dobu pokusu byly ryby umístěny v recirkulačních nádržích v počtu šesti kusů. Nádrže byly rozděleny následovně: 1) kontrolní, 2) se sinicemi, 3) 5 ppm As, 4) 50 ppm As, 5) se sinicemi a 5 ppm As, 6) se sinicemi 50 ppm As. Pokus probíhal po dobu jednoho měsíce na přelomu listopadu a prosince 2011. Odběry se prováděly celkem třikrát s odstupem 10 dní. Z každé nádrže se při jednom odběru odebralo 7 ryb. V průběhu pokusu se monitorovaly chemické parametry vody. Po humánním usmrcení se odebrala rybám krev. Ke stanovení počtu bílých krvinek se použilo baničkové metody s následným počítáním v Bürkerově komůrce. Dále byla stanovována opsonizace.

Výsledky



k-kontrola, sin-sinice, As5- arsén 5 ppm, As50- arsén 50 ppm, sin+5-sinice a arsén, sin+50-sinice a arsén 50 ppm

Diskuze

U *Oncorhynchus mykiss* byl sledován počet leukocytů po vystavení účinkům sinic a arsénu. Dále se sledoval parametr opsonizace. Fyziologické rozmezí je u leukocytů 10 – 60 $G.l^{-1}$. Statistické vyhodnocení se provedlo metodou jednocestné Anovy. S následným dohodnocením pomocí Schiffova testu. U leukocytů byly zaznamenány statistické rozdíly v prvním odběru $F(5,35)=1,86$; $p<0,1269$, u kontroly {0,008696}, dále u arsénu 50 ppm {0,008696; 0,04807}. Dále byly zaznamenány statistické rozdíly u druhého odběru $F(5,36)=1,42$; $p<0,2407$ a to u kontroly {0,048926}, dále pak u arsénu 5 ppm {0,01836} a u arsénu 50 ppm {0,048926; 0,01836}. Zaznamenány byly rovněž statisticky významné rozdíly u opsonizace a to jednak v prvním odběru $F(5,36)=1,43$; $p<0,2375$, u nádrže s arsénem 50 ppm {0,026076} a u nádrže s kombinací sinice a arsénu 50 ppm {0,026076}. Statistický rozdíl byl rovněž zaznamenán v třetím odběru $F(5,36)=2,86$; $p<0,0284$ u kontroly {0,0011}, dále u nádrže se sinicemi {0,008496}. Statistické rozdíly byly zaznamenány v nádrži s arsénem 50 ppm {0,02493} a u nádrže se sinicemi a arsénem 50 ppm {0,0011; 0,008496; 0,02493}. Tyto údaje poukazují na vliv arsénu a sinic na počty leukocytů a opsonizační schopnost.

Závěr

Ze zjištěných údajů je patrných jistý vliv arsenu na leukocyty *Oncorhynchus mykiss*. Jistý vliv arsenu, sinic a kombinace obou, je patrný na opsonizační schopnost. I přes všechny opatření nelze plně vyloučit vliv některého faktoru na biologický materiál. Uvedené údaje jsou součástí širšího výzkumu.

Literatura

ABERNATHY, C.O., THOMAS J.D. a CALDERON L.R., Health and risk assessment of arsenic. *J. Nutr.* 2003, č. 133, 1536–1538.

KOPP R, MARES J, KUBICEK Z, BABICA P. The influence of toxic cyanobacterial water blooms on the hematological indicators of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Oceanol Hydrobiol.* 2005 č. 34, 85–92

KOPP R, MARES J, PALIKOVA M, NAVRATIL S, KUBICEK Z, ZIKOVA A, HLAVKOVA J, BLAHA L Biochemical parameters of blood plasma and content of microcystins in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from a hypertrophic pond with cyanobacterial water bloom. *Aquacult.* 2009 č. 40, 1683–1693

KOPP R., PALIKOVÁ M., NAVRATIL S., KUBICEK Z., ZIKOVA A., MARES J. Modulation of biochemical and haematological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to toxic cyanobacterial water bloom. *Acta VetBrno.* 2010 č. 79, 135–146

KUMAR B., MUKHERJEE D.P., KUMAR S., MISHRA M., PRAKASH D., SINGH K.S. a SHARMA S.C., Bioaccumulation of heavy metals in muscle tissue of fishes from selected aquaculture ponds in east Kolkata wetlands. *Annals of Biological Research.* 2011, č. 125, s. 125-134. ISSN 0976-1233.

MARTIN K., WHALEY J., KOCH I., MORIARTY M.M. a REIMER J. K., Arsenic Speciation in Blue Mussels (*Mytilus edulis*) Along a Highly Contaminated Arsenic Gradient. *Environ. Sci. Technol.* 2012, č. 10.

RYMUSZKA, A., SIEROSLAWSKA., A, BOWNIK, SKOWROŃSKI, T., Immunotoxic potential of cyanotoxins on the immune system of fish, *Centr. Eur. J. Immunol.* č.33, 2008, 150-152.

SIEROSLAWSKA A., RYMUSZKA A., VELÍŠEK J., SKOWROŃSKA P.B., SVOBODOVÁ Z., SKOWROŃSKI T., Effects of microcystin-containing cyanobacterial extraction hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) *Fish Physiol Biochem.* 2011.

SIVONEN, K., and JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to public health, consequences, monitoring and management.*, London, New York, 41 - 111, I. Chorus and J. Bertram, eds (London, New York: E & FN Spon), 1999, pp. 41-111.

SZKODA J., ŽMUDZKI J., NAWROCKA A. a KMIĘCIK M., Arsen w żywności zwierzęcego pochodzenia – ocena narażenia arsenic in food of animal origin – exposure assessment. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych.* 2009, č. 41.

VINAGRE, T.M., ALCIATI, J.C., REGOLI, F., BOCCHETTI, R., YUNES, J.S., BIANCHINI, A. MONSERRAT, J.M. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae), *Comp. Biochem. Phys.* č. 135, 2003, 67-75.

YANG Z. , XIANG, F., MINTER, E.J.A, L'U K., CHEN Y., MONTAGNES D.J.S, The interactive effects of microcystin and nitrite on life-history parameters of the cladoceran *Daphnia obtusa*, *Journal of Hazardous Materials* 2010.

Kontaktní adresa: Lukáš Navrátil, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10011@vfu.cz

Vliv kombinované expozice cyanotoxiny, inhibitory acetylcholinesterázy a antikoagulanty na biochemické parametry krve ptáků

Effect of combined exposure by cyanotoxins, acetylcholinesterase inhibitors, and anticoagulants on biochemical parameters of bird's blood samples

Ondráček Karel, Pikula Jiří, Band'ouchová Hana, Damková Veronika, Král Jiří, Osičková Jitka

Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The major of this research is combined exposure by cyanotoxins, acetylcholinesterase inhibitors, and anticoagulants on biochemical parameters of quail's blood samples. Nowadays, the ecological researches are not focused on overall problematic as on set of individual risks, but they are focused on the influence possibilities of individual substances in mixtures. The major of our research group was the same. This research compares gained biochemical results of blood samples after application of toxic substances with their combinations, and it points out the possibilities of mutual influence of these substances in their mixtures.

Keywords: *blood samples; acetylcholinesterase inhibitors; anticoagulants; cyanotoxins; biochemical parameters; Japanese quail*

Úvod

V životním prostředí mohou být ptáci vystaveni mnoha rizikům včetně přírodních toxinů a antropogenních kontaminantů. Z přírodních toxinů se mohou uplatňovat toxiny sinic (cyanotoxiny) z antropogenních polutantů např. inhibitory acetylcholinesterázy a antikoagulanty. Kromě případových studií se toxicitou sinic zabývaly i experimentální studie (Skocovska et al., 2007); stejně tak u antikoagulantů (Beklová et al., 2007). Nejčastěji byly demonstrovány převážně subletální efekty na úrovni biochemických odpovědí a subcelulární histopatologické změny u jednotlivých sledovaných látek.

V současné době je aktuální nenazírat na danou problematiku jako na soubor jednotlivých rizik, ale pochopit možnosti kombinací jednotlivých stresorů. V prostředí se většina toxických látek dostává do potravního řetězce v subletálních dávkách, kdy můžeme uvažovat o ovlivňování jejich účinků jinou toxickou látkou nebo infekčním agens ve směsi. Jejich účinky se pak mohou sčítat nebo potencovat. Na toto téma již někteří autoři upozorňují (Kortenkamp et al., 2007), (Pikula et al., 2010).

Cílem tohoto projektu bylo ověření hypotézy, že koexpozice ptáků subletálními dávkami cyanotoxinů, inhibitorů acetylcholinesterázy a antikoagulantů ovlivní klinické příznaky, biochemické a histopatologické změny, kumulaci jednotlivých toxinů případně úmrtnost více, než jednotlivé expozice těmito látkami.

Materiál a metodika

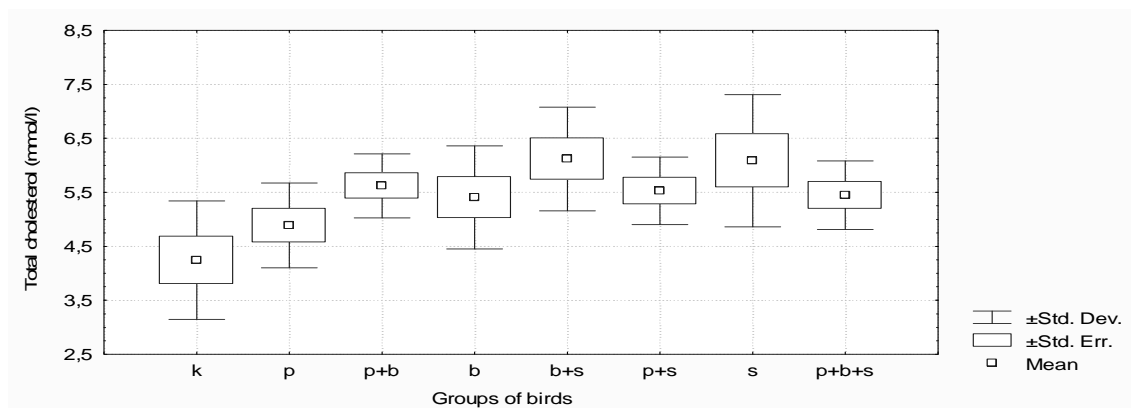
Experiment byl prováděn dle metodiky OECD 205 s drobnými modifikacemi pro naše experimentální podmínky. Modelovým ptačím druhem byla křepelka japonská

(*Coturnix coturnix japonica*). Do pokusu byli zařazeni jedinci ve věku 2 měsíce a rozděleni po párech do skupin po šesti kusech. Celkem bylo použito 48 experimentálních ptáků (8 skupin po šesti jedincích, poměr pohlaví 1:1). Experimentální skupiny byly sestaveny následovně: 1. Kontrola, 2. Expozice cyanotoxinům, 3. Expozice inhibitorům acetylcholinesterázy, 4. Expozice antikoagulantům, 5. Kombinovaná expozice cyanotoxinům a inhibitorům acetylcholinesterázy, 6. Kombinovaná expozice cyanotoxinům a antikoagulantům, 7. Kombinovaná expozice inhibitorům acetylcholinesterázy a antikoagulantům, 8. Kombinovaná expozice cyanotoxinům, inhibitorům acetylcholinesterázy a antikoagulantům. Test zahrnoval 10 dní aklimatizace a 10 dní vlastního testu.

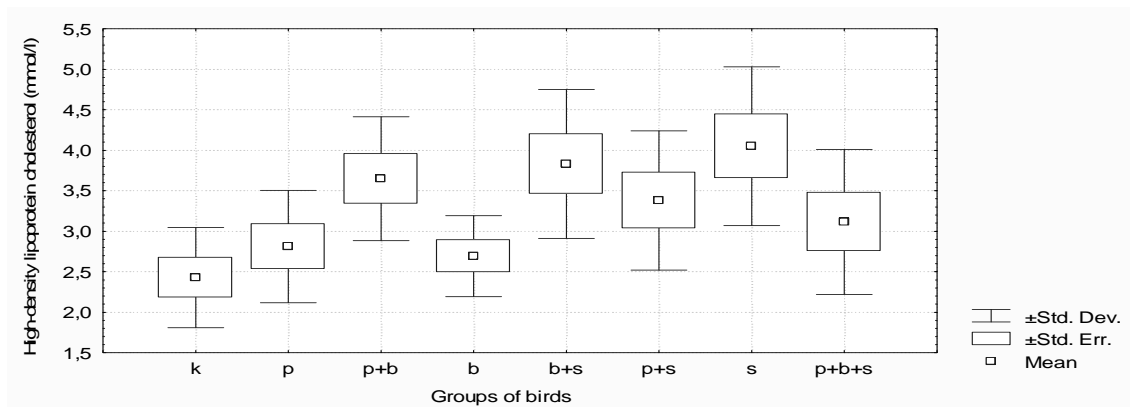
Expozice sinicím byla prováděna formou přídatku lyofilizované cyanobakteriální biomasy do kompletní krmné směsi. Expozice inhibitory acetylcholinesterázy a antikoagulanty byla prováděna aplikací bromadiolone a paraoxonu perorálně. Po uplynutí desetidenní expozice byl u všech exponovaných i kontrolních jedinců proveden odběr krve pro hematologické a biochemické vyšetření a ptáci byli utraceni pro odběr vzorků tkání na histopatologii, elektronovou mikroskopii, stanovení parametrů oxidativního stresu a analýzu obsahu mikrocystinů, inhibitorů acetylcholinesterázy a antikoagulantů.

Výsledky

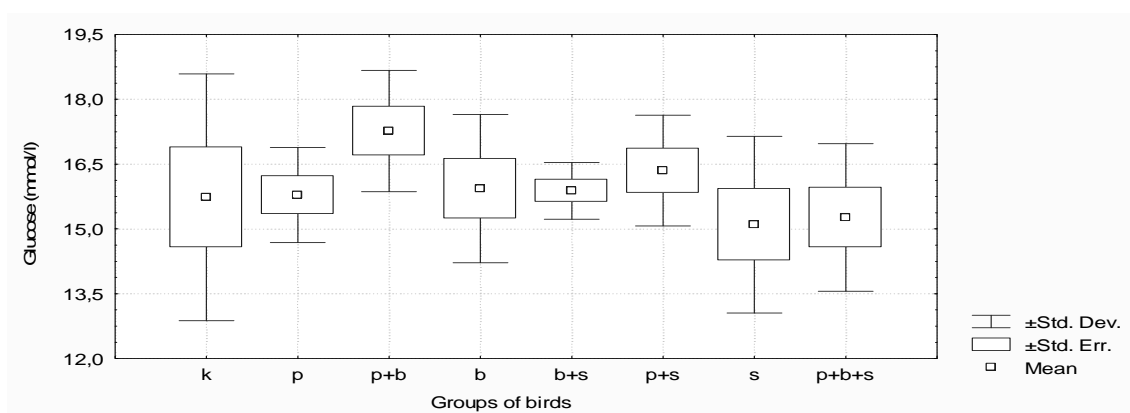
V průběhu pokusu nebyla zaznamenána změna chování exponovaných skupin oproti kontrole ani úhyn testovaných jedinců. I přes absenci klinických příznaků byl zjištěn významný vliv bromadiolonu, paraoxonu a cyanotoxinů na biochemické parametry krve podílejících se na energetickém metabolismu organismu, především u celkového cholesterolu, high-density lipoprotein cholesterolu a glukosy. Dále byly odebrány vzorky tkání ke stanovení parametrů oxidativního stresu a analýze obsahu mikrocystinů, inhibitorů acetylcholinesterázy a antikoagulantů pro ucelení informací.



Graf 1: Celkový cholesterol: porovnání parametru celkového cholesterolu v krvi u jednotlivých skupin ptáků: k-kontrola, p-paraoxon, p+b-kombinace paraoxon a bromadiolone, b-bromadiolone, b+s-kombinace bromadiolone a biomasa sinic, s-biomasa sinic, p+b+s-kombinace paraoxon, bromadiolon a biomasa sinic.



Graf 2: HDL cholesterol: porovnání parametru High-density lipoprotein cholesterolu v krvi u jednotlivých skupin ptáků.



Graf 3: Glukosa: porovnání parametru glukosy v krvi u jednotlivých skupin ptáků.

Závěr

Jak je zřejmé z výsledků jednotlivé toxické látky i jejich kombinace mají vliv na biochemické parametry krve křepelky. V tomto výzkumu byla navíc sesbírána a hodnocena i další data, např. histopatologické údaje. Vyšetření množství jednotlivých toxických látek i anatomické vlastnosti sledovaných orgánů u jednotlivých experimentálních skupin. Dané téma jistě v dnešní době ještě není vyčerpáno a je možnost ho dále rozvíjet.

Literatura

SKOCOVSKA B, HILSCEROVA K, BABICA P, ADAMOVSKY O, BANDOUCHOVA H, HORAKOVA J, KNOTKOVA Z, MARSALEK B, PASKOVA V, PIKULA J: Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon*, 2007, vol. 49, s. 793–803.

BEKLOVA M, KRIZKOVA S, SUPALKOVA V, MIKELOVA R, ADAM V, PIKULA J, KIZEK R: Determination of bromadiolone in pheasants and foxes by differential pulse voltametry. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*. 2007, vol. 87, s. 459-469.

KORTENKAMP A, FAUST M, SCHOLZE M, BACKHAUS T: Low-Level Exposure to Multiple Chemicals: Reason for Human Health Concerns? *Environmental Health Perspectives*, 2007, vol. 115, s. 106-114.

PIKULA J, BANDOUCHOVA H, HILSCEROVA K, PASKOVA V, SEDLACKOVA J, ADAMOVSKY O, KNOTKOVA Z, LANY P, MACHAT U, MARSALEK B, NOVOTNY L, POHANKA M, VITULA F: Combined exposure to cyanobacterial biomass, lead and the Newcastle virus enhances avian toxicity. *Science of the Total Environment*, 2010, vol. 408, s. 4984–4992.

Kontaktní adresa: Karel Ondráček, Mgr., Ústav veterinární ekologie a životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42, h10006@vfu.cz

Vliv olova a nesteroidních antiflogistik na ptáky

Effects of lead and non-steroidal anti-inflammatory drugs on birds

Osičková Jitka, Král Jiří, Ondráček Karel, Band'ouchová Hana, Pikula Jiří

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

*Diclofenac, non-steroidal anti-inflammatory drug is currently considered as a significant environmental contaminant. It is widely used mainly as an analgesic, antiphlogistic and antipyretic in veterinary medicine. It is extremely toxic to vultures and has caused visceral gout, kidney failure and subsequent death of an individual for several days after exposure. A hypothesis was formulated that the consumption of carcasses of cattle previously treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs may cause renal silure necrophagous birds. Lead affects erythrocytes and the metabolism of hemoglobin. In this review have been monitored effects of combined exposure of lead and non-steroidal anti-inflammatory drugs on Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).*

Keywords: diclofenac; non-steroidal anti-inflammatory drugs; lead; birds; toxicity

Úvod

Volně žijící ptáci mohou být vystaveni kombinovanému účinku řady stresorů včetně přirozených toxinů, antropogenních polutantů či infekčních agens, jejichž negativní účinky se mnohou sčítat či potencovat. Zatímco toxicita olova pro vodní i terestriální ptáky je podrobně prostudována, účinky nesteroidních antiflogistik na ptáky byly popsány jen formou případových studií a obecně se touto problematikou zabývalo jen málo autorů. Hypotézou tohoto projektu je, že subletální kombinovaná expozice nesteroidním antiflogistikům a olovu způsobí větší efekty a úhyn ptáků než expozice jednotlivé.

Materiál a metodika

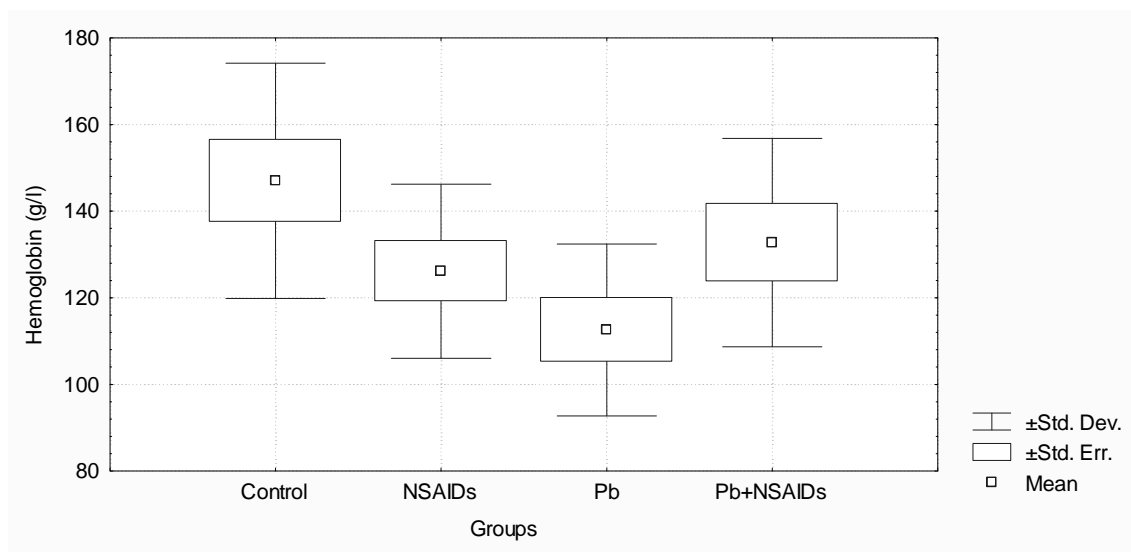
Do pokusu bylo zařazeno 40 jedinců křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*) ve stáří 2 měsíců o průměrné hmotnosti 180 g, kteří byli dále rozděleni do 4 experimentálních skupin po 10 jedincích (1. Kontrola, 2. Expozice olovu, 3. Expozice nesteroidním antiflogistikům, 4. Expozice nesteroidním antiflogistikům a olovu).

Expozice olovu byla provedena vložím šesti olovených broků o celkové hmotnosti 1,5 g do volete, broky se poté stávají součástí gritu svalnatého žaludku. Expozice nesteroidním antiflogistikům proběhla intramuskulární aplikací přípravku Dolmina (Zentiva, a.s.) v množství 2,5 mg·kg⁻¹. Kontrolní skupině bylo podáno stejné krmivo bez přísady olova a nebylo provedeno podání přípravku Dolmina. U všech jedinců byla sledována úmrtnost, váhové parametry na začátku a na konci pokusu a v neposlední řadě také příznaky intoxikace či projevy abnormálního chování.

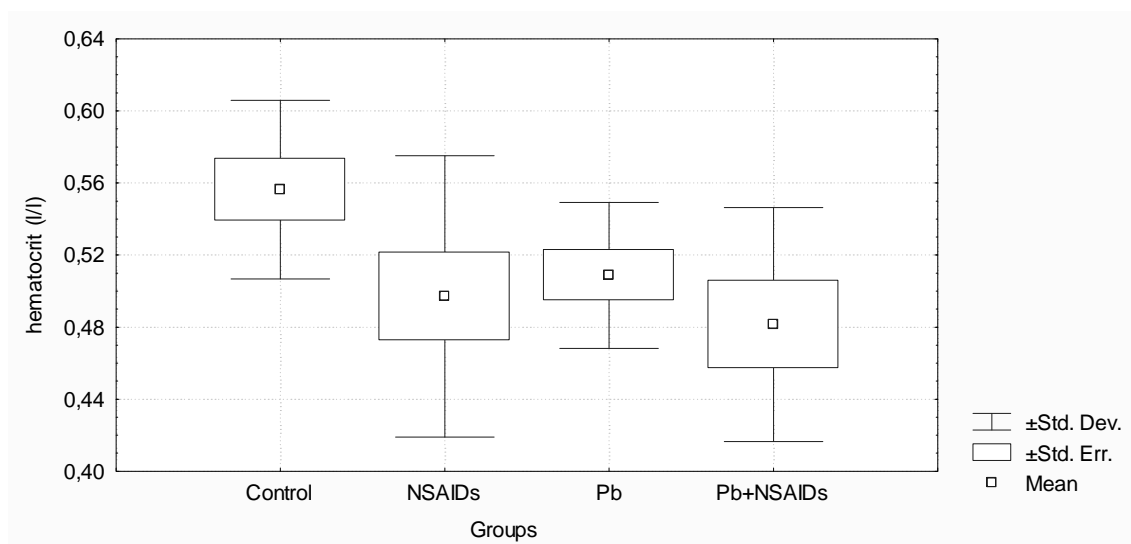
Před zahájením testu proběhla sedmidenní aklimatizace, po které začal vlastní pokus, a to v délce 10 dnů. Zvířata bylo podáváno krmivo obsahující olovo v periodě pěti dnů, od šestého dne byli ptáci krmeni potravou bez olova, a to minimálně po dobu dalších tří dnů. Denně byly zaznamenávány úhyny a příznaky toxicity.

Výsledky a diskuze

V průběhu experimentu byly zaznamenány žádné abnormality chování a nedošlo ani k žádným úhynům. Z toho důvodu lze předpokládat, že uvedené dávky olova a nesteroidních antiflogistik byly pro exponované jedince subletální. Na základě hematologického vyšetření byly zjištěny nižší hodnoty hemoglobinu u jedinců exponovaných olovu (Graf 1). To potvrzuje vliv olova na metabolismus hemoglobinu. Hodnoty hematokritu byly nejnižší u jedinců exponovaných olovu a kombinací olova a nesteroidních antiflogistik (Graf 2). Dále byly odebrány vzorky jater, plic, srdce, ledvin, mozku, sleziny a pohlavních orgánů k histologickému vyšetření, ke stanovení parametrů oxidativního stresu a analýzu obsahu reziduí olova.



Graf 1: Zjištěné hodnoty hemoglobinu (g/l)



Graf 2: Zjištěné hodnoty hematokritu

Závěr

V experimentu jsme sledovali účinky kombinované expozice olova a nesteroidních antiflogistik na ptáky. Během pokusu nebyly zaznamenány žádné úhyny jedinců, což potvrzuje, že uvedené dávky zkoušených látek byly pro sledované jedince subletální.

Zjištěné hodnoty hematologického vyšetření exponovaných ptáků potvrzují naši hypotézu o účinku kombinované expozice olova a nesteroidních antiflogistik.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno.

Literatura

Todd PA, Sordin EM. Diclofenac sodium. A reappraisal pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1988, 35: 244-285.

Rattner BA, Whitehead MA, Gasper G, Meteyer CU, Link WA, Taggart MA, Meharg AA, Pattee OH, Pain DJ. Apparent tolerance of turkey vultures (*Cathartes aura*) to the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(11): 2341-2345.

Fisher IJ, Pain DJ, Thomas VG. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation*, 2006, 131: 421-432.

Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson, RT, Meteyer, CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arsha M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 2004, 427: 630-633.

Pikula J, Bandouchova H, Hilscherova K, Paskova V, Sedlackova J, Adamovsky O, Knotkova Z, Lany P, Machat J, Marsalek B, Novotny L, Pohanka M, Vitula F. Combined exposure to cyanobacterial biomass, lead and the Newcastle virus enhances avian toxicity. *Science of the Total Environment*, 2010, 408: 4984-4992.

Svobodová Z. a kol. Veterinární toxikologie v klinické praxi (2008). Profi Press, Praha, 253 stran.

Kontaktní adresa: Jitka Osičková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10375@vfu.cz

Pilotná štúdia hniezdnej ornitofauny univerzitného parku Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Pilot study of nesting ornithofauna of university campus of The University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice

**Korytár Ľuboš, Ondrejka Róbert, Ondřejková Anna, Prokeš Marián,
Slepecká Eva, Čechvala Peter**

*Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva
a farmácie v Košiciach*

Summary

The aim of this article is to bring first systematical information about nesting ornithofauna of university campus of The University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice. During field work the nest area monitoring scheme and bird trapping and bird banding were used. On area of the university campus 15 nesting species were confirmed. Nesting of other 5 species is very likely.

Keywords: *UULF in Košice; university campus; nesting ornithofauna; nest areas; bird trapping*

Úvod

Na výskum ornitofauny urbánneho prostredia sa kladie zvýšený dôraz približne od druhej polovice dvadsiatych rokov. Jednu z prvých rozsiahlych kvantitatívnych a kvalitatívnych štúdií hniezdných ornitocenóz na Slovensku vykonali Feriancová-Masárová a Ferianc v osemdesiatych a deväťdesiatych rokoch 20. Storočia, pričom v 21 okresných mestách západného a stredného slovenska zistili 63 hniezdiacich druhov vtákov (Lučeničová a Országhová, 2010).

Charakteristika územia

Skúmaný areál o rozlohe cca. 10 ha je situovaný v priemernej nadmorskej výške 215 m v severnej časti mesta Košice. Univerzitný park sa vyznačuje roztrúseným zmiešaným listnatým (lipa, platan, breza, javor) aj ihličnatým (smrek, borovica, tis) stromovým porastom s prímiesou kríkov zväčša tvoriacich živé ploty a vyskytujú sa tu aj trávnaté porasty. Vhodné podmienky pre hniezdenie vtákov poskytujú aj jednotlivé budovy univerzity.

Materiál a metodika

Za účelom zistenia počtu druhov hniezdičov a ich hniezdných okrskov sme použili metódu mapovania hniezdných okrskov podľa Jandu a Řepu, (1986). Podstatou metódy je uskutočnenie viacerých kontrol na vymedzenej ploche v priebehu hniezdného obdobia. Metóda je vhodná na mapovanie hniezdných populácií teritoriálnych nekoloniálnych druhov, ako napr. spevavce. Počas každej kontroly sa do mapy územia značkami zakresľujú pozície pozorovaných vtákov. Zvláštny dôraz sa kladie na spievajúce samce. Pri vyhodnocovaní výsledkov sa prekreslia údaje o jednom druhu zo všetkých kontrol do druhovej mapy. Viaceré registrácie toho istého druhu v mape, ležiace blízko pri sebe spoja sa v zhluk registrácií druhu. Zhluk registrácií druhu predstavuje hniezdne teritórium jedného páru. Na základe zistených hniezdných teritórií sa stanovuje početnosť hniezdnej populácie (Janda a Řepa, 1986).

V priebehu hniezdnej sezóny (máj – jún 2011) bolo vykonaných 5 kontrol (snímok), z toho štyri ranné kontroly (05⁰⁰ – 09⁰⁰ hod.), a jedna večerná kontrola na zachytenie druhov s výraznou večernou aktivitou (18⁰⁰ – 20³⁰ hod.). Jednotlivé hniezdne okrsky boli vyhodnotené na základe spevu samcov, alebo nájdania hniezda.

Ako doplnková metóda na zisťovanie druhovej diverzity hniezdnej ornitofauny bola použitá metóda odchyty do nárazových ornitologických sietí. Túto činnosť vykonával prvý autor na základe držby krúžkovateľskej licencie a povolenia a rozhodnutia MŽP SR č. 269/132/05-5.1 pil, ktorým sa udelila pre krúžkovateľov združených pri Slovenskej ornitologickej spoločnosti výnimka zo zákona č. 543/2002 na odchyt a krúžkovanie voľnežijúceho vtáctva na území SR.

Boli použité nylonové päťpolové siete o rozmeroch 2,5X10 m a 2,5X12 m o priemere ôk 16X16 mm. U odchytených vtákov bola evidovaná druhová príslušnosť a pohlavie a vek ak to bolo možné. Každý odchytený jedinec bol označený ornitologickým krúžkom a späť vypustený.

Pri snímkaní výskytu vtákov počas jednotlivých kontrol a pri vyhodnocovaní výsledkov boli použité mapové podklady voľne dostupné online prostredníctvom programu Google Earth.

Výsledky

Metódou mapovania hniezdných okrskov bolo potvrdené hniezdenie 12 druhov vtákov (Tabuľka 1). Najvyššiu hniezdnú hustotu vykazovali drozd čvíkotavý a drozd čierny. Medzi druhy pri hniezdení uprednostňujúce koruny stromov patria drozd čvíkotavý (*Turdus pilaris*), pinka lesná (*Fringilla coelebs*), zelienka obyčajná (*Carduelis chloris*), škorec obyčajný (*Sturnus vulgaris*), krovinnú etáž, resp. kríky obsadzovali drozd čierny (*Turdus merula*), penica čiernohlavá (*Sylvia atricapilla*), penica popolavá (*Sylvia curruca*), kolibkárík čipčavý (*Phylloscopus collybita*) a budovy žltochvost domový (*Phoenicurus ochruros*), muchár sivý (*Muscicapa striata*), sýkorka veľká (*Parus major*). Sýkorky veľké obsadzovali aj búdky rozmiestnené v areáli. Hniezdenie ďalších druhov, ako drozd plavý (*Turdus merula*), trasochvost biely (*Motacilla alba*), hrdlička záhradná (*Streptopelia decaocto*), straka obyčajná (*Pica pica*) a dážd'ovník tmavý (*Apus apus*) je pravdepodobné.

Tabuľka 1: Hniezdiče a počet hniezdných okrskov v parku UVLF v Košiciach r. 2011

	Vedecký názov	Slovenský názov	Hniezdne okrsky
1.	<i>Turdus pilaris</i>	drozd čvíkotavý	7
2.	<i>Parus major</i>	sýkorka veľá	5
3.	<i>Turdus merula</i>	drozd čierny	5
4.	<i>Fringilla coelebs</i>	pinka lesná	4
5.	<i>Sturnus vulgaris</i>	škorec obyčajný	4
6.	<i>Phoenicurus ochruros</i>	žltochvost domový	4
7.	<i>Serinus serinus</i>	kanárik poľný	3
8.	<i>Carduelis chloris</i>	zelienka obyčajná	3
9.	<i>Sylvia stricapilla</i>	penica čiernohlavá	2
10.	<i>Phylloscopus collybita</i>	kolibkárík čipčavý	1
11.	<i>Sylvia curruca</i>	penica popolavá	1
12.	<i>Muscicapa striata</i>	muchár sivý	1

Do nárazových sietí bolo odchytených 19 jedincov 9 druhov spevavcov (Tabuľka 2). Pravidelnými nidifikantmi univerzitného areálu UVLF v Košiciach sú aj vrabec poľný (*Passer montanus*), vrabec domový (*Passer domesticus*) a lastovička domová (*Hirundo rustica*). Pre mapovanie týchto druhov nie je metodika mapovania hniezdných okrskov vhodná.

Tabuľka 2: Prehľad odchytených druhov

	Vedecký názov	Slovenský názov	Odchytené jedince
1.	<i>Passer montanus</i>	Vrabec poľný	3
2.	<i>Sturnus vulgaris</i>	Škorec obyčajný	1
3.	<i>Turdus pilaris</i>	Drozd čvíkotavý	4
4.	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Žltochvost domový	1
5.	<i>Carduelis chloris</i>	Zelienka obyčajná	2
6.	<i>Fringilla coelebs</i>	Pinka lesná	1
7.	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Sýkorka belasá	2
8.	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	Glezg hrubozobý	1
9.	<i>Turdus merula</i>	Drozd čierny	3

Diskusia

Ide o prvé systematicky získané poznatky o avifaune univerzitného areálu UVLF v Košiciach. Na ploche skúmaného areálu bolo zistených 15 druhov nidifikantov. Z tohto pohľadu je na Slovensku asi najlepšie preskúmaná mestská zeleň Bratislavy. V rokoch 1990 – 1992 tu bolo v troch parkoch (Sad J. Kráľa, Botanická záhrada a Medická záhrada) zistených 35 druhov hniezdiacich vtákov (Kocian a Franeková, 1993). Podobne, ako je tomu v parku UVLF v Košiciach, aj v parkoch Bratislavy prevažujú stromové hniezdiče (Polievková-Ličková a Kocian, 2000).

Okrem zaujímavých faunistických údajov sme počas realizácie štúdie získali informácie významnom faktore spôsobujúcom vysokú mortalitu predovšetkým novovyletených mláďat viacerých druhov. Sú to úhyny po náraze na veľké presklené plochy pavilónov. Dôvodom fatálnych vtáčích zrážok s oknami je zrkadlový obraz okolitej zelene v oknách vyvolávajúci u letiacich, častokrát ešte neskúsených mláďat dojem, že letia do voľného priestoru. Takto bolo v priebehu troch cielených pochôdzok areálom v časovom rozpätí 2 týždňov pod oknami nájdených celkom 7 uhynutých mláďat. Jednalo sa o 3 drozdy čierne (*Turdus merula*) (pavilóny č. 2, 6 a 10), 3 drozdy čvíkotavé (*Turdus pilaris*) (pavilóny 1 a 12) a 1 sýkorku belasú (*Cyanistes caeruleus*) (pavilón 1).

Literatúra

JANDA, J.; ŘEPA P. Metody kvantitatívneho výskumu v ornitológii. Okresní vlastivědné muzeum J.A. Komenského MOS v Přerově, Krajské středisko památkové péče a ochrany přírody Ostrava, Státní zemědělské nakladatelství Praha. 1986, s. 157.

KOCIAN, L.; FRANEKOVÁ, M. Príspevok k poznaniu hniezdnej ornitocenózy troch parkoch v Bratislave. *Tichodroma*. 1993, no. 6, s. 8–89.

LUČENIČOVÁ, T.; ORSZÁGHOVÁ, Z. Hniezdne ornitocenózy vybraných plôch stupavy. *Folia faunistica slovacica*. 2010, no. 15 (14); s. 119–126.

POLIEVKOVÁ-LIČKOVÁ, M.; KOCIAN, L. Hniezdne ornitocenózy malých plôch zelene Bratislavy. *Tichodroma*. 2000, no. 13, s. 61–67.

Kontaktná adresa: Ľuboš Korytár, MVDr., Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, korytar.uvm@gmail.com

SEKCE 4

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

Leukogram po účinku gama žiarenia u *Poecilia reticulata*

Leukogram after efekt ionising radiation in *Poecilia reticulata*

¹Renčko Andrej, ¹Daňová Denisa, ¹Falis Marcel, ¹Ondrašovičová Silvia,
²Vankúšová Miroslava, ¹Špalková Michaela

1 Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
2 Štátny veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne

Summary

The aim of this work was to establish mutual effect of ionising radiation in dose 20 Gy to leukocytes order and compared with control group during 20 days.

Hematological parameters always belonged to the basic parameters of health and in the organism. Changes in the various components of the blood occur after effects end with toxic factors biological and abiological sources. Between these eminent pollutants and factors affecting quality and length of living period in individual belong to also ionising radiation. Gamma radiation is one of the hardest radiation to know.

Keywords: leukocytes; *Poecilia reticulata*; ionising radiations

Úvod

Ionizujúce žiarenie je využívané v mnohých ľudských oblastiach. Okrem pozitívnych vlastností má aj negatívne účinky, ktoré už boli pomerne dobre popísané u cicavcov a vtákov (Beňová a kol. 1998, Toropila a kol. 1998, Beňová a kol. 2007). Práve s rozvojom jadrovej energetiky sa začala rozvíjať aj radiačná ochrana životného prostredia a zároveň aj ochrana zdravia ľudí pred negatívnymi účinkami ionizujúceho žiarenia (Dvořák a kol. 2006, Beňová a kol. 2008). Hematologické parametre patrili vždy k základným ukazovateľom zdravotného stavu organizmu a vnútorného prostredia v ňom. V našej práci sme sledovali účinok ionizujúceho žiarenia o dávke 20 Gy na leukocytovú radu a porovnávali v priebehu 20 dní. Zmeny v jednotlivých zložkách krvi nastávajú po pôsobení toxického noxy či už biologického alebo abiotického pôvodu. Medzi takéto významné polutanty a faktory ovplyvňujúce kvalitu a dĺžku života jedinca patrí i žiarenie. Najcitlivejšie na žiarenie sú bunky a tkanivá s vysokou mitotickou aktivitou, čiže tie, ktoré sa najviac delia. Medzi takéto tkanivá patrí i krv a krvotvorné orgány (Lešník a Danko, 2005). Abnormálna odpoveď, ako napríklad neutropénia pri poškodení kostnej drene, infekcií, pôsobení niektorých liekov, alebo toxínov môže navodiť podmienky pre sekundárnu bakteriálnu infekciu. Prekurzory fagocytov môžu podľahnúť malígnemu bujneniu, čo navodí stav akútnej, alebo chronickej myeloidnej leukémie (Merck veterinary manual, 1997).

Materiál a metódy

Použili sme samice ryby druhu *Poecilia reticulata* z laboratórneho chovu s priemernou hmotnosťou 6 g a vekom 2 roky. Chov sme udržiavali za konštantných podmienok: voda o teplote 24°C, 3,9°N, pH 7,04, umelé vzduchovanie, filtrácia vody, fotoperiódka 12 hod/deň (ČSN 1974, Dvořák, 2004). Ryby sme krmili živou a sušenou potravou. Pokusné ryby náhodne vybrané a rozdelené do skupín sme chovali za rovnakých podmienok. Pre 1 chovnú skupinu sme použili akvárium o objeme 15 litrov. Na udržiavanie konštantnej teploty sme použili ponorný akvarijný ohrievač s termostatom

F 4010. Filtrovanie vody v akváriu bol zabezpečovaný vzduchovacím akvariijným motorčekom AT-A 1500. Na kŕmenie experimentálnych rýb sme použili vložkové krmivo Super Zmes 1000ml, mrazený špenát, mrazené strúhané filé a *Artemia franciscana*. Fotoperiódou bola zabezpečovaná 40 W žiarovkou.

Kontrolnú skupinu, pre stanovenie fyziologických leukokritových hodnôt sme zostavili z 10 kusov samíc *Poecilia reticulata*. Experimentálnu skupinu sme zostavili z rýb ožiarených dávkou 20 Gy gama lúčmi ⁶⁰Co-zdroj Chisostat pri dávkovom príkone 1,04761666 Gy.min⁻¹. Ryby sme ožiarili v sklenej Petriho miske v akváriovej vode, pri výške vodného stĺpca 1 cm. Zdanlivo boli ožarované aj kontroly, t.j. podrobili sa všetkým procedúram manipulácie ako ožarované, s výnimkou samotného ožarovania gama lúčmi. Týmto rybám bola odoberaná krv postupne na 3., 7., 10., 15., a 20. deň po ožiarení. Vždy bola odoberaná krv z 10 kusov rýb z ktorých sa spracoval krvný náter a stanovili sa leukogramy a z nich priemerný leukogram na porovnanie s kontrolnou skupinou.

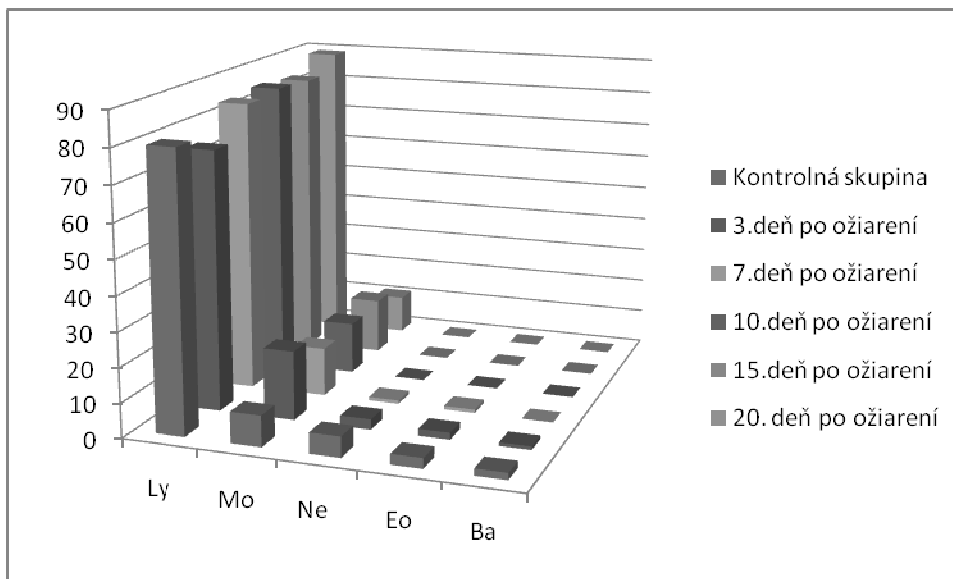
Pri odbere natívnej krvi vpichom cez medzižiabrový priestor do srdca (intrakardiálnou punkciou) sme do heparizovanej (kvôli monolayeru, a tiež rýchlejšiemu zrážaniu krvi rýb) zabrusenej kapiláry o objeme 60 µl nasali krv, ktorú sme následne kvapli na podložné sklíčko a druhým podložným sklíčkom sme pripravili preparát, ktorý sme najskôr nechali zaschnúť pri laboratórnej teplote a neskôr ofarbili. Farbili sme klasickou panoptickou metódou podľa Pappenheima.

Výsledky a diskusia

Vyšetrovali sme bielu zložku krvného obrazu a pomerné zastúpenie jednotlivých zložiek bieleho krvného obrazu, čiže diferenciálny krvný obraz. Z leukogramov rýb chovaných za fyziologických podmienok sme vypočítali priemerné hodnoty jednotlivých elementov bielej krvnej zložky kontrolnej ryby druhu *Poecilia reticulata*: Ly-80% , Mo-9%, Eo-3%, Ne-6%, Ba-2%. Čo zodpovedá údajom iných autorov (Svobodová a kol.,1986, Doubek a kol., 2003) až na nevýrazné zvýšenie migrujúcich monocytov. To je pravdepodobne spôsobené zvýšeným stresom pri manipulácii a odbere krvi.

Pri vyšetrení krvných preparátov odobratých na tretí deň po ožiarení sme zistili nasledujúce hodnoty: Ly-75% , Mo-20, Eo-2%, Ne-3%, Ba-1% 7. deň po ožiarení sme zaznamenali tieto priemerné hodnoty leukogramov: Ly-84% , Mo-14, Eo-1%, Ne-1%, Ba-0% 10. deň po ožiarení boli zistené nasledovné hodnoty bielych krviniek: Ly-85% , Mo-15%, Eo-0%, Ne-0%, Ba-0% Neskôr 15.deň po ožiarení: Ly-84 % , Mo-16 % , Eo-0% , Ba- 0 % , Ne-0 % A na 20. deň po ožiarení sme zistili tieto hodnoty: Ly-89 % , Mo-11 % , Eo- 0 % , Ba- 0 % , Ne-0 %.

Na grafe 1 môžeme vidieť, že pokles lymfocytov a monocytov je súmerný až na výnimku 3. Deň po ožiarení, kedy bol tento pomer narušený v prospech monocytov, čo svedčí o vyššej mortalite lymfocytov, neskôr, od siedmeho dňa po ožiarení je tento pokles súmerný až do konca experimentu, čiže do 20. dňa po ožiarení.



Graf 1: Zastúpenie jednotlivých elementov bielej krvnej zložky v kontrolnej skupine a v nasledujúce dni po ožiarení dávkou 20 Gy gama lúčmi ^{60}Co -zdroj Chisostat pri dávkovom príkone $1,04761666 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$.

Ly-Lymfocyty, Mo-monocyty, Eo-Eozinofilné granulocyty, Ne-Neutrofilné granulocyty, Ba-Bazofilné granulocyty

Záver

O celkových číselných zmenách v počtoch jednotlivých fragmentov leukocytov sa vie pomerne dosť, no o ich pomerných zmenách v leukograme po ožiarení máme u rýb strohé informácie. V našej štúdií sme dokázali a potvrdili že nielen v hustote leukocytov v krvi sú zmeny, ale aj v pomernom zastúpení sú v bielej krvnej zložke významné a výrazné zmeny. Do 10. dňa po ožiarení došlo v organizme *Poecilia reticulata* prakticky k úplnej absencii všetkých foriem granulocytov. Zistili sme tiež, že lymfocyty klesajú hneď po ožiarení, ale monocyty až o pár dní neskôr. Za zaujímavý tiež pokladáme masívny rozpad a vakuolizáciu lymfocytov a neprehliadnuteľný je tiež markantný pokles lymfocytov a monocytov v krvnom preparáte, kde sme v celom preparáte s veľkými ťažkosťami napočítali 100 elementov bielej krvnej zložky.

Pod'akovanie

Prezentovaná práca vznikla za podpory Národného referenčného laboratória pre pesticídy UVLF-KE.

Literatúra

Beňová K., Toropila M., Sesztáková E.: Hemopoéza a jej ovplyvnenie nízkými dávkami gama žiarenia. In: Aktuálne problémy súčasnej biologie a radiobiologie. Košice 1998, s. 176-178.

Beňová K., Strišková K., Dvořák P.: Postirradiation changes in hematologic parameters and in intestinal microflora in rats. Acta Facultatis Ecologiae, 16: Suppl. 1,33-36, 2007

Beňová K., Almášiová V., Cigánková V., Halán M.: Morfológické zmeny pečene u guppy chovej po kombinovaných účinkoch gama žiarenia a dichromanu draselného. 11. Košický morfológický deň 2008, ISBN 978-80-8077-090-7, 30-31.

Doubek a kol. 2003.: Veterinární hematologie, Noviko a. s., Brno, 2003, ISBN-80-86542-02-5, 464 s.

Dvořák, P., 2004: Selected specificity of Aquarium fish disease. Bulletin VÚRH Vodňany 40(3)-2004, 101-108

Dvořák P., Kunová V., Beňová K.: Exponential drop of radiocesium activity in mushrooms due to the effect of acetic acid. Eur. Food Res. Technol (2006) 222: 139-143.

Lešník, Danko, 2005.: Medicínska lymfológia, vydavateľstvo Hajko a Hajková, Bratislava, 415s.

Merck veterinary manual,1997.: eighth edition, ISBN 0-91-1910-29-8,2231 s.

Svobodová, Z, Pravda, D, Paláčková, J., 1986 : Jednotné mtódy hematologického vyšetřování ryb, Vodňany., 36 s.

Toropila M., Ahlers I., Ahlersová E, Beňová K.: Changes in activities of adaptive liver enzymes in rats after non-lethal X-irradiation. Folia veterinaria, 42, 1:7-11, 1998

Kontaktná adresa: Andrej Renčko, MVDr., Katedra biológie a genetiky, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, rencko@uvlf.sk

SEKCE 6

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

Stanovení 5-nitroimidazolů v krevním séru za použití polymerů s molekulovými otisky

Determination of 5-nitroimidazoles in blood serum samples using the Molecularly Imprinted Polymer Purification

Zelníčková Hana

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Rapid and sensitive method based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry using positive electrospray ionisation have been developed for determination of nine 5-nitroimidazoles and their three hydroxylated metabolites in blood serum samples. The method use a new type of columns based on a molecularly imprinted polymer (MIP) for the clean-up of primary extracts of samples. The validation study was carried out according to criteria (accuracy, linearity, repeatability, reproducibility, ruggedness, specificity) and the requirements of Commission Decision 2002/657/EC. This method with MIPs is simple, fast and selective for extraction of 5-nitroimidazoles. It provides high recovery, good reproducibility, clean extracts and low background.

Keywords: *nitroimidazoles; molecularly imprinted polymer; liquid chromatography - tandem mass spectrometry*

Úvod

Nitroimidazoly se dříve využívaly k léčení protozoárních infekcí u drůbeže, prasat a skotu. Používaly se taktéž k léčbě trichomoníazy u skotu a enterohepatitidy u krůt a prasat a jako profylaxe v krmivech pro krůty k prevenci a terapii histomonózy (černohlavosti krůt). Tyto látky mají karcinogenní a mutagenní účinky [1]. Nyní je jejich použití pro potravinová zvířata v zemích Evropské Unie zakázáno (dle Rozhodnutí Komise 96/22/EC).

Nejvíce využívanými technikami vhodnými na stanovení těchto sloučenin jsou plynová nebo kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a to díky jejich selektivitě, specifitě a citlivosti [2]. Většina postupů je kvůli odstranění nečistot založena na čištění extraktu metodou extrakce tuhou fází [3-4]. Od roku 2009 se na trhu objevuje nový typ kolonek produkovaný firmou Sigma-Aldrich – Polymery s molekulovými otisky (Molecularly imprinted polymer, MIP), ve kterých funkci sorbentu plní molekulárně otištěné polymery [5].

Tato práce popisuje rychlou a jednoduchou analytickou metodu na stanovení 12 nitroimidazolů (Dimetridazol, Metronidazol, Ronidazol, Ipronidazol, Ternidazol, Secnidazol, Tinidazol, Carnidazol, Ornidazol a jejich metabolity 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazol a Hydroxymetronidazol, Hydroxy-ipronidazol) v krevním séru. Metoda je plně validovaná dle požadavků Evropské Směrnice 2002/657/EC [6].

Materiál a metoda

Příprava vzorku: 2,5 ml séra bylo napipetováno do zkumavky a k němu byl přidán pracovní roztok vnitřních standardů; kalibrační řada byla připravena v rozsahu 0 až 20 ng/ml. Ke vzorku bylo poté přidáno 5 ml acetonitrilu a 1 g NaCl. Vzorek byl důkladně protřepán a centrifugován 10 min. při teplotě 20 °C a 3000 x g. Supernatant byl

převeden do zkumavky a odpařen při 50°C do sucha. Odparek byl následně rozpuštěn v 2 ml vody a bez vakua nanesen k přečištění na SPE kolonku SupelMIP.

Kolonky bylo nutno kondicionovat postupným promytím 1 ml toluenu, 1 ml acetonitrilu a 1 ml 10 mM octanu amonného. Následně byl na kolonku nanesen vzorek. Rychlost průtoku promývacích roztoků byla 0,5 - 1 ml/min. Kolonka byla poté promyta 1 ml deionizované vody, dále 2 x 1 ml hexanu a 1 ml směsi heptan:toluen (3:1). Analyty byly eluovány 2 x 1 ml směsi acetonitril:voda (60:40) s 0,5% kyselinou octovou.

Extrakt s obsahem stanovované látky byl odpařen pod jemným proudem dusíku při 50°C do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 250 µl roztoku 0,05% kyseliny mravenčí s acetonitrilem (70/30) a přefiltrován přes stříkačkový filtr do vialky.

Stanovení na přístroji LC-MS/MS: Vzorky byly měřeny na kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1200 Series ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem Agilent Technologies 6460. Separace byla provedena při 45°C na koloně Zorbax Eclipse XDB-C₈ 5µm, 4.6 x 150 mm.

Výsledky a diskuze

Tato práce se zabývala vývojem metody pro stanovení 5-nitroimidazolů ve vzorcích krevního séra. Bylo nutné vyvinout ji tak, aby splňovala kritéria pro konfirmační metody uvedené v Rozhodnutí Komise 2002/657/EC.

Pro identifikaci a kvantifikaci byly proto použity moderní analytické metody - a to spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Identifikace analytů ve vzorku byla provedena srovnáním retenčních časů a hmotnostních spekter s analyty měřenými samostatně. Retenční čas analytu musel odpovídat retenčnímu času standardu s tolerancí dle Rozhodnutí Komise 2002/657/EC.

Popisovaná metoda užívá kvantifikaci metodou vnitřního standardu.

Metoda vykazuje vysokou extrakční selektivitu, zvýšení výtěžků analytů, vyšší stupeň přečištění vzorku, eliminaci matričních efektů, stabilitu v širokém rozsahu pH a teploty a dobrou citlivost umožňující detekci stopových množství nitroimidazolů.

Tabulka 1: Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

Analyt	Směrnice	Směrodatná odchylna interceptu	Korelační koeficient R	Koncentrace
DMZ	0.1905	0.0068	0.999	0-20 ng.ml ⁻¹
MNZ	0.3342	0.0164	0.997	
RNZ	0.2204	0.0167	0.994	
HMMNI	0.1837	0.0117	0.996	
MNZOH	0.0933	0.0038	0.998	
IPZ	0.6918	0.0272	0.998	
IPZOH	0.2686	0.0133	0.997	
CNZ	0.1524	0.0969	0.699	
TNZ	0.2238	0.0299	0.981	
SNZ	0.3458	0.0384	0.987	
TIZ	0.1045	0.0182	0.969	
ONZ	0.2178	0.0270	0.984	

Tabulka 2: Linearita a detekční limity $CC\alpha$ a $CC\beta$ uvedené v ng/ml

Analyt	Intercept	Směrnice	Korelační koeficient R	$CC\alpha$	$CC\beta$
DMZ	-0.0118	0.1952	0.999	0.08	0.14
MNZ	0.0321	0.3292	0.999	0.11	0.20
RNZ	0.0237	0.2284	0.999	0.18	0.30
HMMNI	0.01	0.1726	0.999	0.15	0.25
MNZOH	0.0146	0.0921	0.999	0.10	0.10
IPZ	0.0964	0.662	0.999	0.09	0.16
IPZOH	-0.0174	0.2792	0.999	0.12	0.20
CNZ	0.005	0.2204	0.998	1.48	2.52
TNZ	-0.0755	0.2611	0.995	0.31	0.53
SNZ	-0.1142	0.3946	0.996	0.26	0.44
TIZ	-0.0108	0.1194	0.998	0.41	0.69
ONZ	0.0852	0.1919	0.996	0.29	0.49

Závěr

Popsaná metoda je vhodná pro kvantitativní a konfirmační stanovení devíti nitroimidazolů a jejich tří metabolitů ve vzorcích krevního séra. Přečištění vzorků bylo provedeno pomocí kolonek SupelMIP, které jsou vhodné i na velmi znečištěné vzorky. Validační data prokázala dobrou přesnost a citlivost metody, vysokou výtěžnost a dobrou reprodukovatelnost. Hodnoty detekčních limitů stanovené při validaci metody musí být nižší než hodnoty doporučené (tj. 3 $\mu\text{g/l}$). Všechny získané a vypočítané hodnoty $CC\alpha$ a $CC\beta$ stanovovaných analytů těmto požadavkům vyhovovaly.

Literatura

- [1] CRONLY, M.; BEHAN, P.; FOLEY, B.; MALONE, E.; REGAN, L. Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, no. 46, s. 8101-8109.
- [2] MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2010, vol. 81, no. 4-5, s. 1273-1280.
- [3] POLZER, J.; STACHEL, C.; GOWIK, P. Treatment of turkeys with nitroimidazoles: Impact of the selection of target analytes and matrices on an effective residue control. *Analytica Chimica Acta*. 2004, vol. 521, no. 2, s. 189-200.
- [4] FRASELLE, S.; DEROP, V.; DEGROODT, J-M.; VAN LOCO, J. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxy metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 586, no. 1-2, s. 383-393.
- [5] Protocol for Extraction of Nitroimidazoles, Sigma-Aldrich.
- [6] Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002, p.8. Commission Decision 2002/657/EC.

Kontaktní adresa: Hana Zelníčková, Ing., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10029@vfu.cz

Riziká neuváženého použitia warfarínu

Risk from thoughtless usage of warfarin

Harkabus Juraj, Hromada Rudolf, Sasáková Nad'a, Veszelits-Laktičová Katarína, Kachnič Ján, Kišová Jana, Ondrašovičová Silvia

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky

Summary

This work was aimed to residues of anticoagulant rodenticides in plant bodies after its application on ground. We have used preparation KUMATOX G with active substance warfarin. Plants were planted on so prepared soil until time of harvesting. Collected samples from agricultural plant's were examined for amount of residues on HPLC chromatography.

Keywords: *anticoagulant; rodenticide; residues; warfarin*

Úvod

Už od pradávna sa človek snaží pretvoriť prírodu vo svojom okolí pre svoje osobné potreby. Týmto svojim počinom vnáša vo forme emisií do prírody odpad z priemyslu, ako aj poľnohospodárskej činnosti. Využíva pesticídy v poľnohospodárstve na kontrolu stavu škodlivých oranizmov, no neuvážene ich takto priamo, alebo nepriamo vnáša aj do potravinového reťazca. Použitie pesticídov preto musí byť cieleňé, aby nenarušili biologickú rovnováhu ekosystému (Ondrašovič a kol., 1996).

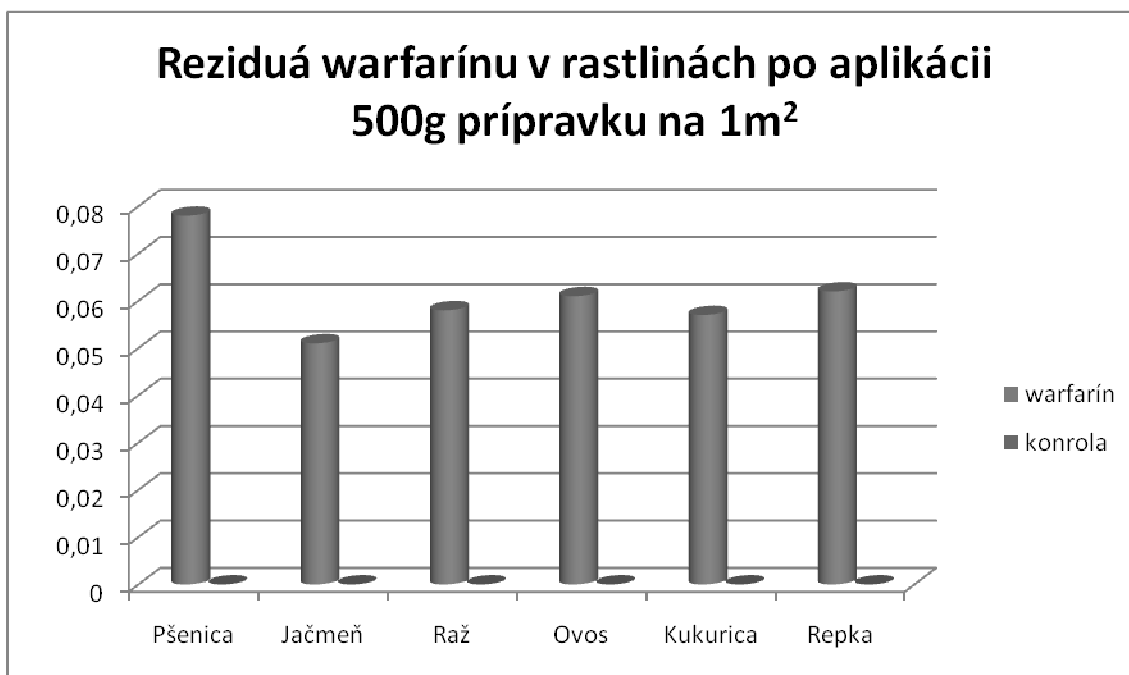
Pesticídy v sebe zahŕňajú aj rodenticídne prípravky určené na kontrolu škodlivých hlodavcov. Sú aplkované vo forme požerovej nástrahy, a preto predstavujú značné riziko nielen pre cieleňý druh organizmov. Najčastejšie používané rodenticídy sú chronického charakteru. Tieto svojou vlastnosťou vytvárajú možnosť vzniku sekundárnej otravy u spoločenských, ale aj voľne žijúcich zvierat. Ich pomalý rozklad zvyšuje riziko vzniku reziduí v živočíšnych, ale aj rastlinných telách.

Materiál a metodika

Nástrahy boli rozmixované s pôdou v nádobe s rozmermi 1x1x0,5 m a aplikované priamo na pôdu pri výseve poľnohospodárskych plodín v množstve 500g/ m². Takto bolo do pôdy zapracovaných 12,5g/m² warfarínu, keďže sa v prípravku KUMATOX G nachádza v 2,5% koncentrácii. Počas celého vegetačného obdobia neboli vykonané žiadne agrotechnické zásahy. V období zberu boli rastliny zožaté ručne. Súbežne s osevom obilnín a rodenticídneho prípravku bola osiata aj kontrola bez jeho aplikácie. Množstvá reziduí boli zisťované omocou HPLC chromatografickej analýzy.

Výsledky a diskusia

V grafe 1 je grafické znázornenie množstva reziduí warfarínu v obilninách, ako aj kukurici a repke v porovnaní s kontrolou. Po aplikácii prípravku KUMATOX G na pôdu v množstve 500g/m² sme detekovali najvyššie koncentrácie reziduí warfarínu v pšenici, a to 0,078ppm. U ostatných komodít boli zistené následovné hodnoty, v jačmeni 0,051 ppm, v raži 0,058 ppm, v ovse 0,061 ppm, v kukurici 0,057 a repke 0,062 ppm.



Graf 1

Pre použitie warfarínu v humánnej medicíne ako terapeutický antikoagulant upustil výbor pre potravinový reťazec a zdravie zvierat (SCFCAH) od stanovenia jeho ADI (Acceptable Daily Intake, akceptovateľný denný príjem). Tento akt bol následne ukotvený v smernici ES č. 5/2006. Akceptovateľný denný príjem (ADI) je množstvo denného prívodu látky považovaný za „bezpečný“ pri celoživotnej expozícii pre danú látku (Zapletal a kol., 2001). Pri absencii tejto hodnoty sa zhoršuje možnosť monitoringu pre danú látku v potravinovom reťazci, čím sa zvyšuje aj možnosť ohrozenia verejného zdravia.

Záver

Snaha európskeho spoločenstva smerujúca ku zníženiu používania pesticídov v čo najnižšom množstve aj pomocou cielených legislatívnych krokov nevie úplne zrušiť ich používanie v poľnohospodárstve kvôli ich efektívnosti a cenovej dostupnosti. Aj pri znížení ich použitia existuje spôsob kontaminácie potravín, ako aj potravinového reťazca dovozom komodít z druhých krajín mimo európskeho spoločenstva. Týmto je otázka reziduí pesticídov stále aktuálna.

Literatúra

ONDRAŠOVIČ, M., PARA, E., ONDRAŠOVIČOVÁ, O., VARGOVÁ, M., KOČIŠOVÁ, A.: Veterinárna starostlivosť o životné prostredie. DataHelp 1996 Košice, 109.

ZAPLETAL, O., RUPRICH, J., DVOŘÁKOVÁ, D., NEPEJHALOVÁ, L., VRANOVÁ, E.: Speciální veterinární toxikologie. Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Bmo 2001; 132.

Kontaktná adresa: Juraj Harkabus, MVDr., Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice, harkabus.juraj@gmail.com

Vliv vybraných rozpouštědel na embryonální stádia *Danio rerio* Effect of selected carrier solvents on embryonal stages of *Danio rerio*

Chromcová Lucie, Štěpánová Stanislava, Plhalová Lucie, Prášková Eva,
Svobodová Zdeňka

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The aim of this study was to determine the effects of 96-hour exposure selected solvents: ethanol (0,1; 0,5; 1; 1,5 a 2%), acetone (0,1; 0,5; 1; 1,25 a 1,5%) and dimethylsulfoxide (1; 1,5; 2; 2,5 a 3%) on the embryonal stages of zebrafish (*Danio rerio*). Embryonal tests toxicity was conducted according to the OECD guideline 212. This solvents were evaluated for their effects on mortality and different developmental morphological defects of embryos (oedema, tail and eye defect, weak pigmentation and deformation of the body). Based on the results were determine the values of NOEC and LOEC. For ethanol was detected NOEC value 0,5 % and LOEC = 1 %, for acetone NOEC = 0,1 % and LOEC = 0,5 % and for dimethylsulfoxide NOEC = 1,5 % a LOEC = 2 %.

Keywords: zebrafish; embryonal tests toxicity; ethanol; acetone; dimethylsulfoxide

Úvod

V praxi se často setkáváme s požadavkem hodnocení toxicity látek, které jsou ve vodě špatně rozpustné. Aby bylo možno takovou látku testovat z hlediska toxicity pro vodní organismy, je třeba ji převést do roztoku. K tomuto účelu jsou často používána organická rozpouštědla, která však mohou zasahovat do samotného průběhu testu negativním působením na testované organismy a tímto způsobem ovlivňovat výsledky studií (El Jay, 1996, Hutchinson a kol., 2006, Ruffli a kol., 1998).

Metodika směrnice OECD 212 (Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages) doporučuje přípravu testovaných roztoků látek se sníženou rozpustností ve vodě pomocí fyzikálních metod jako je míchání, použití ultrazvuku. Tam, kde je to nezbytně nutné, povoluje použití následujících rozpouštědel: aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid a triethylenglykol. Výběr vhodného rozpouštědla vychází z charakteru testované látky a jeho koncentrace nesmí překročit hodnotu povolenou příslušným standardním postupem.

USA EPA z roku 1975 uvádí maximální akceptovatelné limity rozpouštědel užitých v testech toxicity na vodních organismech. Pro testy akutní toxicity je limit stanoven na 0,05 % a pro chronické testy toxicity je limit 0,01 % (Eaton a kol., 1975; Hallare a kol., 2006).

Materiál a metody

Pro studii byly vybrány tři druhy rozpouštědel - ethylalkohol MULTIPUR (CAS No. 64-17-5) CHROMSERVIS s.r.o., Česká republika, dimethylsulfoxid ACS (CAS No. 67-68-5) SIGMA-ALDRICH, CHEMIE GmbH, Německo a aceton (CAS No. 67-64-1) CHROMSERVIS s.r.o., Česká republika.

Pod lupou byly vybrány jikry *D. rerio* ve fázi blastuly a umístily se po 10 kusech do Petriho misek s připravenými roztoky testované látky. Paralelně byla vedena kontrola s ředící vodou.

Každé z rozpouštědel se testovalo ve 12 sériích, to znamená, že u každé koncentrace i kontroly bylo použito 120 kusů embryí. Testování bylo ukončeno po vykulení všech embryí v kontrolních skupinách.

Test toxicity na embryích proveden dle OECD 212 semistatickou metodou. Podmínky: stabilní teplota inkubátoru: 26,8 °C; výměna lázně: 1x za 24 hodin; objem roztoku: 20 ml; nasycení vody kyslíkem nad 60%; pH v rozmezí 7,5 – 8,5. Mortalita embryí v kontrolních skupinách nepřesáhla 20%, což odpovídá podmínkám platnosti testu dle metodiky OECD 212.

Statistické vyhodnocení výsledků

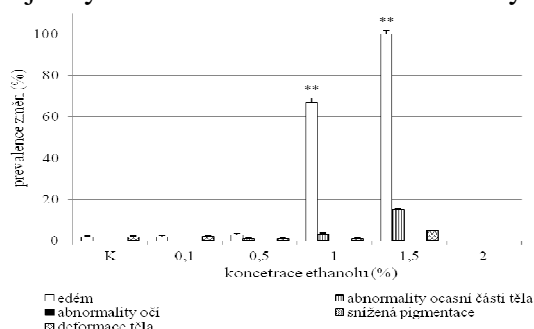
Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Unistat 5.1. (Unistat Ltd., GB). Rozdíly četností sledovaných morfologických změn byly hodnoceny za použití kontingenčních tabulek. Statistické významnosti rozdílů byly hodnoceny na hladině významnosti * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Výsledky a diskuze

U pokusných organismů byl po 96 hodinové expozici testovaným rozpouštědlům zaznamenán výskyt morfologických změn (edém, abnormality ocasních částí těla a očí, snížená pigmentace a deformace těla). Procentuální zastoupení těchto abnormalit v jednotlivých koncentracích testované látky bylo statisticky vyhodnoceno.

Ethanol

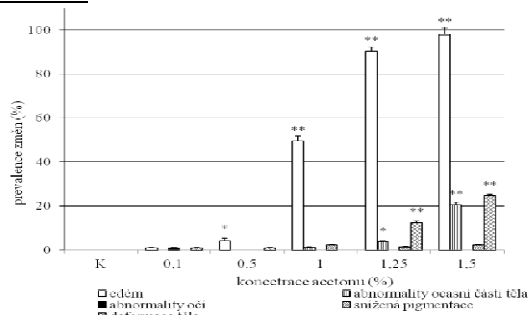
Po 96 hodinovém působení ethanolu se vysoce statisticky významné změny ($P < 0,01$) objevily v 1% koncentraci. Obdobné výsledky uvádí ve své práci také Hallare a kol.



(2006) a Chen a kol. (2011), kteří pozorovali navíc edémy žloutkového váčku. V 2% koncentraci byl ve shodě s Hallarem a kol. (2006) pozorován úhyn všech pokusných organismů, a proto nebylo možno zaznamenat morfologické změny, které se projeví v nižších koncentracích v průběhu expozice (graf 1).

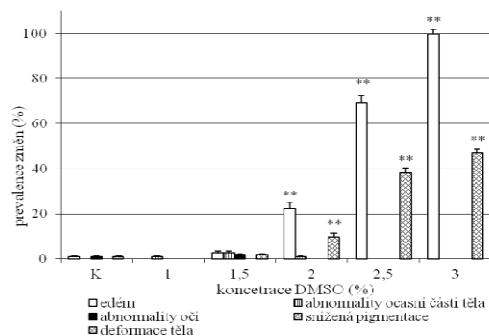
Graf 1: Vliv ethanolu na jednotlivé morfologické změny po 96 h expozici

Aceton



Statisticky významné ($P < 0,05$) zvýšení výskytu morfologických změn oproti kontrole bylo zjištěno v 0,5% koncentraci roztoku a ($P < 0,01$) od 1% koncentrace (graf 2). Hallare a kol. (2006) výskyt změn uvádí od 1,5 - 2% koncentrace.

Graf 2: Vliv acetonu na jednotlivé morfologické změny po 96 h expozici

DMSO

Rozpouštědlo DMSO vyvolalo po 96 hodinovém působení statisticky významný výskyt ($P < 0,01$) edémů a deformací těla oproti kontrole od 2% koncentrace (graf 3). Defekty v embryonálním vývoji *D. rerio* popisuje Chen a kol. (2011) již od 1% koncentrace.

Graf 3: Vliv DMSO na jednotlivé morfologické změny po 96 h expozici

Hodnoty NOEC a LOEC

Hodnoty NOEC a LOEC po 96 hodinovém embryonálním testu toxicity byly stanoveny na základě zjištění morfologických změn, jejichž výskyt je citlivý indikátor působení rozpouštědel (tabulka 1).

Tabulka 1: Hodnoty NOEC a LOEC

	ethanol	aceton	DMSO
NOEC	0,5%	0,1%	1,5%
LOEC	1%	0,5%	2%

Z těchto výsledků vyplývá, že pro akutní embryonální testy toxicity na rybách by bylo možné využít koncentrace rozpouštědel, které jsou vyjádřené hodnotou NOEC pro ethanol až 0,5%, pro aceton 0,1% a pro DMSO až 1,5%.

Závěr

Zjištěné koncentrace NOEC jednotlivých rozpouštědel jsou vyšší, než maximální koncentrace doporučované normami pro testy toxicity na rybách. Z toho důvodu lze předpokládat, že koncentrace rozpouštědel povolené normou neovlivní průběh a výsledky prováděných testů.

Poděkování

Práce byla financována v rámci výzkumného záměru MŠMT 6215712402.

Literatura

Literatura k dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Lucie Chromcová, Mgr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11487@vfu.cz

Effects of subchronic exposure to diclofenac on *Danio rerio*

¹Prášková Eva, ¹Voslářová Eva, ¹Chromcová Lucie, ¹Plhalová Lucie,
¹Štěpánová Stanislava, ¹Bedáňová Iveta, ¹Maršálek Petr, ²Škorič Miša,
¹Svobodová Zdeňka

¹Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Veterinary Public Health and Toxicology,

²Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathological Morphology,

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The aim of this study was to investigate effects of subchronic exposure to sublethal levels of diclofenac on growth and on histopathological changes in *Danio rerio*. The juvenile growth tests were performed on *Danio rerio* according to OECD method No. 215. Fish were exposed to the sublethal diclofenac concentration (0.02, 5, 15, 30 and 60 mg L⁻¹) for 28 days. The identified value of LOEC was 15 mg L⁻¹ of diclofenac and NOEC value was 5 mg L⁻¹ of diclofenac.

Keywords: NSAIDs; OECD; fis; toxicity

Introduction

Diclofenac represents an important drug in ambulatory care and is used to reduce pain, inflammation and stiffness. It is used worldwide and has a production volume estimated to be in the hundreds of tons annually. It is used in the form of tablets, capsules, suppositories, intravenous solutions, and in ointments and gels for dermal application (Buser et al., 1998).

Pharmaceuticals in the environment are of growing concern for their potential consequences on human and ecosystem health. The main route of entry of pharmaceuticals into the environment has been identified as effluent from sewage treatment plants and the disposal of unused drugs down the drain or with household garbage. A large number of pharmaceuticals are partially eliminated during treatment in sewage treatment plants. Low levels of pharmaceuticals (ordinarily in µg L⁻¹) have been detected in many countries (Germany, France, Greece, Sweden and Italy) in sewage treatment plant effluents, surface waters, seawaters, groundwater and some drinking waters (Ternes, 2001; Ferrari et al., 2003; Bendz et al., 2005). In long-term monitoring investigations of sewage and surface water samples, diclofenac was identified as one of the most important pharmaceutically active compounds present in the water cycle (Heberer et al., 2002). It was found in groundwater samples (Heberer et al., 1997; Sacher et al., 2001) and sporadically even in raw or treated drinking water (Heberer et al., 2001).

Non-target species considered to be most endangered by its action are probably aquatic organisms. Therefore, pharmaceutical effects on aquatic organisms have been investigated in acute toxicity assays (Hallare et al., 2004; Van den Brandhof and Montforts, 2010; Praskova et al., 2011). The chronic toxicity and potential subtle effects are only marginally known, however.

The aim of this study was to investigate the effects of subchronic exposure to environmental and sublethal levels of diclofenac on growth and on histopathological changes in *D. rerio*.

Material and Methods

Tests of diclofenac toxicity were performed on zebrafish (*Danio rerio*), which is one of the model organisms most commonly used in toxicity tests (Lawrence, 2007). The experimental fish were obtained from a commercial dealer, fish were 20 days old, average beginning weight of fish was 10 ± 2 mg and average length was 12 ± 2 mg.

Method of subchronic toxicity tests was in compliance with OECD guidelines No. 215 (Fish, Juvenile Growth Test). The experiment was performed in four repetitions. The tests were carried out with 25 fish used for each concentration and for the control groups. Fish were placed in test aquariums and exposed to a range of sublethal concentration of diclofenac (0.02 mg L^{-1} – environmental concentration detected in Czech rivers, 5, 15, 30 and 60 mg L^{-1}). Due to the low solubility of diclofenac in water, the dissolution of the substance had to be done using ultrasound device.

The duration of these semi-static tests (the solutions were renewed at 12-hour intervals) was 28 days. Fish were fed with dried *Artemia salina* without nutshells in amount 4% of their body weight per day, the food ration was based on initial fish weight and was recalculated after 14 days. At the end of the tests fish were weighed again and their length was determined. Food was withheld from the fish 24 hours prior to weighing. During the tests, the living conditions were checked at 24-hour intervals and the mortality was recorded in each concentration. Water temperature in tests was 23 ± 2 °C, oxygen saturation of water was above 60 %, pH of the water ranged from 8.203 to 8.495.

Results were analysed using the statistical programme Unistat 5.1. The data were subjected to one-way ANOVA and subsequently to Dunnett's test.

Results

The initial body weight was not significantly different among groups, but at the end of the experiment, fish weight was significantly lower in tanks with concentration of diclofenac 15 mg L^{-1} ($p < 0.05$), 30 mg L^{-1} ($p < 0.01$) and 60 mg L^{-1} ($p < 0.01$) compared to the control group.

The results of specific growth rate r_2 (means \pm standard deviations) of the test groups in comparison with the control group showed significant decreases in fish growth caused by diclofenac concentration of 15 mg L^{-1} ($p < 0.05$), 30 mg L^{-1} ($p < 0.01$) and 60 mg L^{-1} ($p < 0.01$). The identified value of LOEC was 15 mg L^{-1} of diclofenac and NOEC value was 5 mg L^{-1} of diclofenac. No histopathological changes were observed.

Discussion

Not many authors mentioned the acute effect of diclofenac on fish. Van den Brandhof and Montforts (2010) found growth retardation, delayed hatching, and yolk sac and tail deformation in concentrations of diclofenac above 1.5 mg L^{-1} . In their study 72h EC50 was found to be 5.3 mg L^{-1} . Praskova et al. (2011) found 144h LC50 = 6.11 mg L^{-1} for embryos of zebrafish and 166.6 mg L^{-1} for juvenile zebrafish.

The possibility of nephrotoxic effects of diclofenac after chronic exposure was described by Revai and Harnos (1999). In concentrations of between $7\text{--}15 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, diclofenac exposure induced tubular necrosis in the kidneys of the rainbow trout, and hyperplasia and fusion of the villi in the intestine were detected in concentrations above $1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. This study demonstrates that subchronic exposure to environmental

concentrations of diclofenac can lead to its interference in the biochemical functions of fish and to tissue damage, further highlighting concern about this pharmaceutical in the aquatic environment (Mehinto et al., 2010; Cuklev et al., 2011).

Furthermore, possible effects of higher concentrations of diclofenac on fish weight demonstrated in our study should be considered.

Conclusions

We assessed effects of sublethal concentrations of diclofenac on growth and on histopathological changes in zebrafish. We have found that the environmental concentrations of diclofenac in Czech rivers (0.02 mg L^{-1}) and surface waters of other aforementioned countries (ordinarily in $\mu\text{g L}^{-1}$) had no effect on growth and on histopathological changes in *D. rerio* and this concentration is lower than determined diclofenac NOEC and LOEC values. The concentration of 15 mg L^{-1} of diclofenac (LOEC) caused the decrease in the fish growth.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic (MSM Project No. 6215712402).

References

Available from the authors.

Contact address: Eva Prášková, Mgr., Department of Veterinary Public Health and Toxicology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, epraskova@vfu.cz

Metalothioneiny a obsah kovů ve tkáních ryb z nádrží Skalka a Želivka

Metallothioneins and metal content in fish tissues in Skalka and Želivka reservoirs

¹Ševčíková Marie, ¹Modrá Helena, ¹Kružíková Kamila, ¹Svobodová Zdeňka,
¹Čelechovská Olga, ²Kizek René

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Summary

The aim of this study was to assess the metal content (total mercury, methylmercury, cadmium, copper, zinc, lead, nickel and arsenic) in fish tissues in Skalka and Želivka reservoirs and the ability of metals to induce synthesis of metallothioneins in field conditions. In total, 50 fish was sampled from Želivka reservoir and 53 fish from Skalka reservoir. Muscle and liver were used for metal determination. Metallothionein content was measured in muscle, liver and gills of fish. The content of total mercury was significantly higher ($p < 0.05$) in muscle and liver samples from Skalka reservoir than in samples from Želivka reservoir. Methylmercury content was presented as a majority of total mercury in muscle and liver in all samples. Significant differences ($p < 0.05$) between tested sites were observed in copper, lead, zinc and arsenic content. No significant differences between localities were observed in metallothionein content. Metallothionein liver content was negatively correlated ($p < 0.05$) with total mercury in liver at both reservoirs. The results showed that metallothionein content do not response to high metal contamination, therefore the suitability of metallothioneins in fish as a marker of chronic metal exposure is uncertain in field conditions.

Keywords: mercury; metallothionein; fish; reservoir pollution

Úvod

Kovy jsou významnými kontaminanty vodního prostředí. Prostřednictvím schopnosti akumulace a nízké biodegradability ve tkáních ryb se mohou zapojovat do potravního řetězce. Ryby proto představují významný zdroj toxických kovů pro člověka (Luoma and Rainbow, 2008). Z toho důvodu jsou pro obsah olova, kadmia a rtuti stanoveny Nařízením ES č. 1881/2006 maximální limity, které nesmí být ve svalovině ryb překročeny. Metalothioneiny jsou proteiny zapojené jak do metabolismu esenciálních kovů, tak do detoxikačních procesů kovů toxických. Zvýšené koncentrace metalothioneinů ve tkáních ryb mohou být použity jako markery kovů ve vodním prostředí (Amiard et al., 2006). Cílem projektu bylo posoudit svalovinu ryb z hlediska obsahu kovů a schopnost těchto kovů ovlivnit hladiny metalothioneinů ve tkáních ryb v terénních podmínkách.

Materiál a metody

Pro řešení projektu byly vybrány dvě lokality, nádrž Skalka a nádrž Želivka, které jsou dlouhodobě sledovány z hlediska kontaminace rtutí (Maršálek et al., 2005; Kružíková et al. 2011). Z nádrže Skalka bylo odloveno 11 druhů ryb, celkem 53 kusů, a z nádrže Želivka 8 druhů ryb, celkem 50 kusů. V terénu byly odebrány vzorky svaloviny, jater, žaber a ledvin. Vzorky byly do analýzy uchovávány při teplotě -18°C . Obsah celkové rtuti ve svalovině a játrech byl stanoven metodou AAS na jednoúčelovém analyzátoru

AMA 254. Methylrtuť ve svalovině byla stanovena po kyselé digesci vzorku s HCl a extrakci do toluenu pomocí plynové chromatografie s detekcí elektronového záchytu. Po mineralizaci vzorků svaloviny a jater s kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku byla analýza ostatních kovů (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn a As) provedena rovněž metodou AAS. Obsah metalothioneinů v játrech, žlázech a ledvině byl stanoven diferenční pulzní voltametrií s elektrochemickou detekcí.

Výsledky

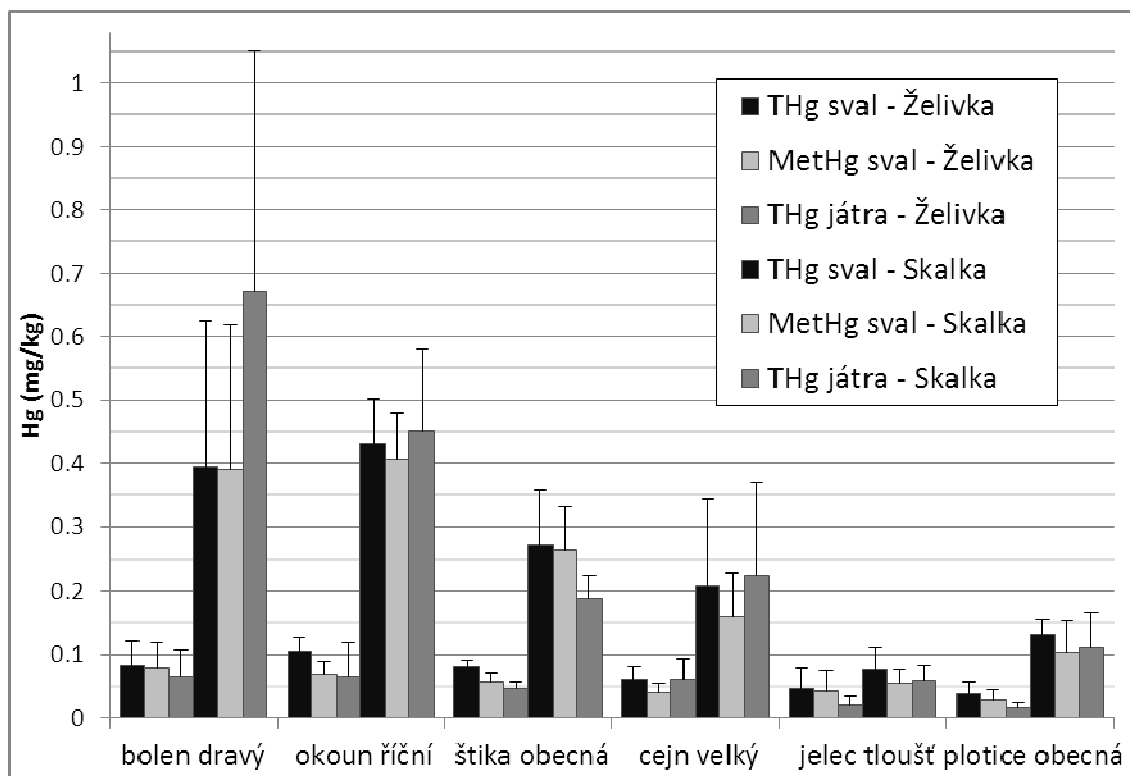
Porovnáním nádrží z hlediska obsahu celkové rtuti ve svalovině, celkové rtuti v játrech a methylrtuti ve svalovině byl zjištěn statisticky významný rozdíl u zástupců dravých i nedravých druhů ryb (Graf 1). Methylrtuť představovala většinový podíl z celkové rtuti ve svalovině u všech druhů ryb z obou nádrží. Maximální limit pro celkovou rtuť ve svalovině, dle Nařízení ES č. 1881/2006, byl překročen u čtyř vzorků z nádrže Želivka ($n = 50$) a u 34 vzorků z nádrže Skalka ($n = 53$). Porovnáním druhů mezi lokalitami byl zjištěn statisticky významně vyšší obsah mědi ve svalovině a játrech u některých druhů ryb z nádrže Skalka ($p < 0,05$) a vyšší obsah olova, zinku a arsenu ve svalovině a v játrech některých druhů ryb z nádrže Želivka ($p < 0,05$). Porovnáním druhů mezi nádržemi nebyly zjištěny rozdíly v obsahu metalothioneinů ve tkáních ryb. Ve vzorcích z nádrže Želivka vykazovaly metalothioneiny v játrech negativní korelaci s celkovou rtutí a kadmii v játrech a metalothioneiny v ledvině korelovaly taktéž negativně s kadmii a mědí v játrech. Ve vzorcích z nádrže Skalka negativně korelovaly metalothioneiny v játrech s celkovou rtutí v játrech a metalothioneiny v ledvině taktéž negativně s celkovou rtutí ve svalovině a játrech.

Diskuze

Vysoké hodnoty celkové rtuti a methylrtuti ve svalovině i játrech ryb z nádrže Skalka potvrzují přetrvávající kontaminaci nádrže. Zdrojem této kontaminace byly v minulosti odpadní vody z chemické továrny (Maršálek et al., 2005). Vyšší obsah mědi ve vzorcích z nádrže Skalka můžeme připisovat aplikacím síranu měďnatého, které probíhaly v 70. letech 20. století za účelem potlačení sinic na této nádrži. V minulosti představovala automobilová doprava významný zdroj olova a jiných kontaminantů (Legret a Pagotto, 1999). Přesto, že se na území České republiky používá už jen bezolovnatý benzín, může být olovo stále součástí vodních sedimentů. Vyšší obsah olova ve tkáních ryb z nádrže Želivka tedy může být důsledkem blízké polohy frekventované dopravní komunikace, dálnice D1, spojující Prahu a Brno. Mnohé práce potvrdily zvýšenou syntézu metalothioneinů, jako součást obranného mechanismu ryb vystavených působení rtuti, ať už v laboratorních, tak i v terénních studiích (Bebianno et al., 2007; Monteiro et al., 2010; Sinaie et al., 2010). Roli metalothioneinů v detoxikačním procesu u ryb jsme v naší terénní studii nepotvrdily. Rtuť ve formě methylrtuti pravděpodobně není schopna syntézu metalothioneinů navodit (Gonzalez et al. 2005).

Závěr

Získaná data potvrzují trvalé vysoké zatížení nádrže Skalka rtutí. Konzumace ryb z této lokality může pro člověka představovat zdravotní riziko. Použití metalothioneinů, jako vhodných markerů dlouhodobé kontaminace vodního prostředí rtutí, je v případě terénních studií diskutabilní.



Graf 1: Průměrné hodnoty celkové rtuti (THg) a methylrtuti (MetHg) ve svalovině a celkové rtuti (THg) v játrech u vybraných druhů ryb z nádrží Želivka a Skalka ($p < 0,05$). Uvedená data jsou normalizovaná dle věku ryb. 1. - 3. sloupec zleva u každého druhu znázorňuje parametry z nádrže Želivka, 4. - 6. sloupec parametry z nádrže Skalka.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno 88/2011/FVHE.

Literatura

Seznam literatury k nahlédnutí u autora.

Kontaktní adresa: Marie Ševčíková, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10374@vfu.cz

Speciace rtuti ve svalovině ryb z významných řek České republiky a hodnocení zdravotního rizika

Mercury speciation in the fish muscle from important Czech rivers and assessment of health risk

Gajdová Lenka, Kružíková Kamila, Svobodová Zdeňka

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The aim of this study was to determine content of total mercury and methylmercury in the muscle of indicator fish (*Leuciscus cephalus*) and to assess health risk from consumption of fish and determine number of portions which can be eaten per week. In 2011, a total of 130 indicators fish were caught in twelve localities on eleven rivers. The highest average content of total mercury in muscle of fish was found at Vltava – Vraňany ($0.236 \pm 0.1001 \text{ mg.kg}^{-1}$) and the highest content of methylmercury was found at Labe – Obříství (and $0.231 \pm 0.1056 \text{ mg.kg}^{-1}$). The lowest average content of total mercury was detected at Berounka – Srbsko ($0.071 \pm 0.0249 \text{ mg.kg}^{-1}$) and the lowest content of methylmercury was determined at Lužnice – Bechyně ($0.065 \pm 0.0321 \text{ mg.kg}^{-1}$). The most portions (10.1) can be consumed from locality Lužnice – Bechyně whereas the least (2.8) from the locality Labe – Obříství.

Keywords: mercury; methylmercury; fish; river

Úvod

Rtuť patří mezi hlavní polutanty vodního prostředí. Organická forma tohoto kovu je extrémně toxická. Je schopná bioakumulace ve vodních organismech a dlouhou dobu setrvává v sedimentech. Do životního prostředí se dostává jak přírodními, tak antropogenními zdroji. Významným indikátorem kontaminace vodního prostředí jsou ryby. Nejvyšší koncentrace rtuti v rybách je obsažena ve svalovině, která je zároveň dobrým indikátorem kontaminace tímto kovem (Čelechovská et al., 2007). Nejčastějším způsobem, jak se rtuť dostane do lidského těla, je konzumace ryb pocházejících z oblastí zatížených rtutí, přičemž nebezpečí představuje hlavně organická forma – methylrtuť (Clarkson, 1990; Shimshack et al., 2007). Methylrtuť svým působením v těle negativně ovlivňuje nervovou soustavu, kardiovaskulární a imunitní systém (Mieiro et al., 2009). Vzhledem k tomu, že ryby tvoří součást diety člověka, je nutné sledovat obsah rtuti a její organické formy v rybí svalovině.

Cílem práce bylo zjistit obsah celkové rtuti a methylrtuti ve svalovině indikátorového druhu jelce tloušť (*Leuciscus cephalus*), pocházející z dvanácti závěrových profilů jedenácti významných řek České republiky. Dále bylo hodnoceno zdravotní riziko konzumace ryb z uvedených lokalit.

Materiál a metodika

Celkem bylo odloveno 130 indikátorových ryb na 12 lokalitách na 11 řekách v České republice. Lokality jsou uvedeny v tabulce 1. Ryby byly odloveny pomocí elektrického agregátu. Následně byly zváženy, změřeny a byl odebrán vzorek svaloviny pro analýzu. Vzorky svaloviny byly vloženy do polyethylenových sáčků, označeny a zmrazeny na $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Obsah celkové rtuti (THg) ve vzorcích rybí svaloviny byl stanoven na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrofotometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyser), který umožňuje stanovení rtuti ve vzorku bez předchozí úpravy.

Methylrtuť (MeHg) byla stanovena plynovou chromatografií s detekcí elektronového záhytu GC/ECD. Vzorky byly připraveny kyselou digescí a následně extrahovány do toluenu. Pro procentuální vyjádření zastoupení rtutí v organické formě z celkové rtuti (Hg z MeHg v THg) byl obsah MeHg přepočítán na zastoupení Hg v této organické formě.

Pro stanovení maximálního počtu porcí konzumovaného rybího masa, ze kterého nehrozí člověku žádné zdravotní riziko, byl pro výpočet použit prozatímní tolerovatelný týdenní příjem, který je 1,6 µg MeHg na kg tělesné hmotnosti/týden (WHO, 1990) a jedna porce je 170g.

Výsledky a diskuze

Průměrné obsahy THg a MeHg ve svalovině jelců tlušťů odlovených z jednotlivých lokalit jsou uvedeny spolu s průměrnou hmotností analyzovaných ryb v tabulce 1.

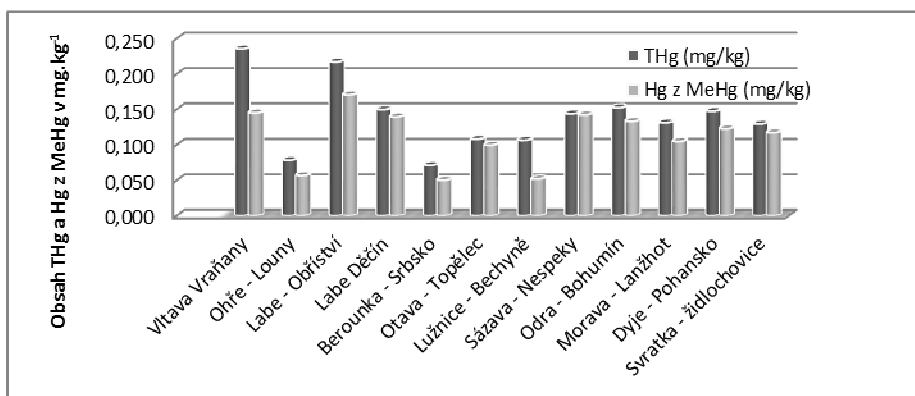
Tabulka 1: Hmotnost, obsah THg a MeHg ve svalovině a počet porcí

Lokality	n	Hmotnost těla	THg (mg.kg ⁻¹)	MeHg (mg.kg ⁻¹)	Počet porcí
		(g)			
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Vltava – Vraňany	12	536,7 ± 229,08	0,236 ± 0,1001	0,182 ± 0,0815	3,6
Ohře – Louny	6	170 ± 237,13	0,078 ± 0,0124	0,071 ± 0,0060	9,2
Labe – Obříství	10	226 ± 51,58	0,217 ± 0,1136	0,231 ± 0,1056	2,8
Labe – Děčín	10	566 ± 177,82	0,150 ± 0,0500	0,166 ± 0,0493	3,8
Berounka – Srbsko	12	218,8 ± 60,65	0,071 ± 0,0249	0,068 ± 0,0262	9,6
Otava – Topělec	12	151,7 ± 84,94	0,108 ± 0,0286	0,135 ± 0,0315	4,9
Lužnice – Bechyně	12	179,2 ± 159,14	0,107 ± 0,0692	0,065 ± 0,0321	10,1
Sázava – Nespeky	12	126,7 ± 66,89	0,144 ± 0,0921	0,178 ± 0,1160	3,7
Odra – Bohumín	9	171,7 ± 83,40	0,152 ± 0,0525	0,167 ± 0,0470	3,9
Morava – Lanžhot	9	416,7 ± 230,14	0,131 ± 0,0445	0,131 ± 0,0433	5,0
Dyje – Pohansko	12	502,1 ± 121,46	0,148 ± 0,0574	0,154 ± 0,0572	4,3
Svratka – Židlochovice	12	223,9 ± 26,67	0,129 ± 0,0316	0,147 ± 0,0654	4,5

Nejvyšší průměrná koncentrace THg ze všech sledovaných lokalit byla stanovena v lokalitě Vltava – Vraňany 0,236 ± 0,1001 mg.kg⁻¹ a naopak nejnižší průměrná koncentrace THg 0,071 ± 0,0286 mg.kg⁻¹ byla zjištěna v lokalitě Berounka – Srbsko. Výsledky z tabulky 1 ukazují, že nejvyšší průměrný obsah MeHg byl 0,231 ± 0,1056 mg.kg⁻¹ v lokalitě Labe – Obříství na druhou stranu nejnižší průměrný obsah MeHg byl 0,065 ± 0,0321 mg.kg⁻¹ ve vzorcích z lokality Lužnice – Bechyně. Nejvyšší procentuální zastoupení Hg z MeHg v THg, jak ukazuje graf 1, bylo zjištěno v lokalitě Sázava – Nespeky (99,0 %) a nejnižší v lokalitě Lužnice – Bechyně (48,9 %). Nejvíce porcí lze zkonsumovat z lokality Lužnice – Bechyně (10,1) naopak nejméně z lokality Labe – Obříství (2,8).

Podobná studie na stejných lokalitách byla provedena v roce 2007 Kružíkovou et al. (2008). Nejvyšší průměrný obsah THg (0,263 ± 0,086 mg.kg⁻¹) a MeHg (0,256 ± 0,084 mg.kg⁻¹) byl zjištěn ve vzorcích z lokality Labe – Obříství. Podobný obsah THg i MeHg byl zjištěn i 4 roky poté na stejné lokalitě. Nejnižší obsah THg i MeHg ze sledovaných lokalit uvádí Kružíková et al. (2008). Nejvyšší průměrný obsah THg (0,263 ± 0,086

mg.kg⁻¹) a MeHg (0,256 ± 0,084 mg.kg⁻¹) byl zjištěn ve vzorcích z lokality Labe – Obříství. Podobný obsah THg i MeHg ze sledovaných lokalit uvádí Kružíková et al. (2008) v lokalitě Berounka – Srbsko a Lužnice – Bechyně, což koresponduje s naším zjištěním. Dále Kružíková et al. (2008) uvádí rozmezí procentuálního zastoupení na sledovaných lokalitách 76 – 90,4 %, Hg z MeHg v THg, zatímco v naší studii to bylo rozmezí širší 48,9 – 99,0 %. Lokalita, ze které lze zkonsumovat nejméně porcí je shodná s lokalitou ze studie z roku 2007 a to Labe – Obříství, což potvrzuje, že tato lokalita musí být nadále sledována.



Graf 1.: Průměrný obsah THg a Hg z MeHg (mg.kg⁻¹) ve svalovině jelce tlouště z jednotlivých lokalit.

Závěr

Průměrný obsah THg a MeHg ve svalovině ryb odlovených na řekách v České republice nepřekročil platný hygienický limit 0,5 mg.kg⁻¹. Jedná se o lokality poměrně nekontaminované rtuťí a konzumací ryb z těchto oblastí nehrozí zdravotní riziko z pohledu zatížení rtuťí.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena projektem MSM 6215712402.

Literatura

- CLARKSON, T.W.. Human health risks from methylmercury in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* vol. 9, no. 7, s. 957-961.
- ČELECHOVSKÁ, O., SVOBODOVÁ, Z., ŽLÁBEK, V., MACHARÁČKOVÁ B.. Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Acta Vet. Brno.* 2007, vol. 76, no. 2, s. 93-100.
- KRUŽÍKOVÁ, K., RANDÁK, T., KENŠOVÁ R., KROUPOVÁ, H., LEONTOVYČOVÁ, D., SVOBODOVÁ Z.. Mercury and Methylmercury Concentrations in Muscle Tissue of Fish Caught in Major Rivers of the Czech Republic. *Acta Vet. Brno.* 2008, vol. 77, no. 4, s. 637-643.
- MIERO C.L., PACHECO M., PEREIRA, M.E., DUARTE A.C.. Mercury distribution in key tissues of fish (*Liza aurata*) inhabiting a contaminated estuary – implications for human and ekosystém health risk assessment. *J. Environ. Monit.* 2009, vol. 11, no. 5, s. 1004-1012.
- SHIMSHACK J.P., WARD, M.B., BEATTY T.K.M.. Mercury advisories: Information, education, and fish consumption. *Environ. Econ. Manage.* 2007, vol. 53, no. 2, s. 158-179.
- WHO. Methylmercury. In: Environmental health criteria 101. World Health Organisation, Geneva, s1-145.

Kontaktní adresa: Lenka Gajdová, Mgr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10023@vfu.cz

Biomarkery oxidativního stresu u ryb

Oxidative stress biomarkers in fish

Hostovský Martin, Svobodová Zdeňka

Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

*The objective of this study was to evaluate effects of terbuthylazine and metribuzin on oxidative stress parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) after 30 day exposure using oxidative stress biomarkers.*

Keywords: *oxidative stress; biomarkers; fish; terbuthylazine; metribuzin*

Úvod

Životní prostředí je neustále zatěžováno cizorodými látkami, jež vznikají antropogenní činností. Extensivní používání pesticidů v zemědělství je zdrojem výskytu a perzistence těchto látek v prostředí, zejména pak v povrchových a podzemních vodách. Hodnocení a posouzení ekologických či environmentálních rizik je postup, kterým se odhadují možné či skutečné nežádoucí účinky znečišťujících látek pomocí vědeckých metod. Do těchto metod lze zařadit hodnocení prvotně varovných signálů (Bucheli a Fent, 1995) či tzv. biomarkerů, reflektujících negativní biologické reakce po působení antropogenních environmentálních polutantů.

Termín biomarker je v širším smyslu vnímán jako jakákoliv měřená veličina reflektující interakce mezi biologickým systémem a potenciálním chemickým, fyzikálním či biologickým rizikem (WHO, 1993). Biomarkery tedy odrážejí změnu v biologické odpovědi organismu (v rozsahu od molekuly, přes buněčnou úroveň, k fyziologické odpovědi až po změny chování), která může být spojena s expozicí organismu chemickými látkami či jejich toxickým účinkem (Peakall, 1994).

Pro hodnocení dopadu cizích látek na ryby lze použít různých biomarkerů, které se dle expozice a účinku rozdělit na několik následujících skupin. Enzymy biotransformace jsou považovány za nejcitlivější biomarkery a dle fáze biotransformace cizích látek v organismu je lze dále zařadit do enzymů I. a II. fáze. Produkty této biotransformace se rovněž používají jako vhodné ukazatele působení cizorodých látek (Bucheli a Fent, 1995). Další skupinou často stanovovaných biomarkerů jsou parametry oxidativního stresu reflektující změny v organismu, které jsou indukovány xenobiotiky a vedou k nárůstu či poklesu aktivity antioxidačních enzymů, nebo mají za následek přímé poškození lipidů, proteinů a DNA působením volných radikálů (Winston a Di Giulio, 1991). Mezi zbývající používané skupiny biomarkerů náleží rovněž stresové proteiny, metallothioneiny, hematologické a imunologické ukazatele, endokrinní a reprodukční změny, ukazatele genotoxicity, parametry fyziologických a morfologických změn.

K negativním biologickým účinkům cizorodých látek řadíme oxidativní stres, který je způsoben nadprodukcí volných kyslíkových radikálů či jejich nedostatečnou eliminací organismem (Di Giulio and Meyer, 2008). Možností jak hodnotit účinek volných radikálů je stanovení biomarkerů oxidativního stresu. Tyto biomarkery reflektují zapojení obranných mechanismů organismu nebo manifestují poškození

zprostředkované pro-oxidačními mechanismy vyvolanými oxidativním stresem zasaženého organismu.

Mezi parametry oxidativního stresu se u ryb nejčastěji stanovují enzymy antioxidační obrany - superoxid dismutasa (SOD) kontrolující hladinu superoxidů, katalasa (CAT) rozkládající peroxid vodíku na vodu a kyslík, glutathion peroxidasa (GPX) katalyzující přeměnu redukováného glutathionu na oxidovaný glutathion a glutathion reduktasa (GR) katalyzující přeměnu oxidovaného glutathionu na redukováný glutathion za spotřeby NADPH (Di Giulio and Meyer, 2008).

Jako biochemické ukazatele oxidativního poškození jsou velmi často stanovované produkty peroxidace lipidů, např. – malondialdehyd (MDA), který je sekundárním lipidickým oxidačním produktem vznikajícím reakcí ROS s nenasycenými mastnými kyselinami. Dále se stanovují karbonylové skupiny proteinů jako biomarkery oxidace proteinů (Stadtman a Oliver, 1991), produkty oxidace DNA (Ploch a kol., 1999), methemoglobin a redoxní stav (Stegeman a kol., 1992).

Získání informací o účincích cizorodých látek na vodní organismy je problematikou hodnocení rizik environmentálních polutantů. Stanovením biomarkerů oxidativního stresu lze posoudit možný vliv těchto látek na ryby jako součást ekosystému.

Materiál a metodika

Ke stanovení biomarkerů oxidativního stresu byly využity vzorky ryb a jejich tkání získané z dlouhodobých testů toxicity s triazinovými přípravky na rybách, které proběhly na Ústavu veřejného veterinárního lékařství toxikologie v roce 2010. Testy embryo-larvalní toxicity byly provedeny semistaticky dle metodiky OECD 210 (Fish, Early-life stage toxicity test) (OECD210, 1992).

Oplodněné jikry ryb byly rozděleny do skupin dle koncentrace aktivní látky a do jedné kontrolní skupiny K. Testovány byly terbutylazin (přípravek Click 500 SC; koncentrace aktivní látky pro skupiny T1-T4 byla 0,9, 160, 520 a 820 $\mu\text{g/L}$) a metribuzin (přípravek Sencor 70 WG; koncentrace aktivní látky pro skupiny M1-M4 byla 0,9, 4, 14 a 32 mg/L) na kaprovi obecném (*Cyprinus carpio*). Test trval 30 dní a poté bylo provedeno zhodnocení biomarkerů oxidativního stresu.

Pro stanovení MDA - lipidní peroxidace byla využita modifikovaná metoda TBARS test (thiobarbituricacid reactive substances = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Metoda je založená na stanovení barevných adduktů, vznikajících reakcí kyseliny thiobarbiturové s produkty lipidní peroxidace, které jsou kvantifikovány spektrofotometricky na mikrotitračních deskách při 532 nm (Livingstone et al. 1989; Surai et al. 1996, Uchiyama and Mihara 1978).

Aktivita GR je stanovována na základě úbytku množství NADPH v reakci, kde GR katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukováný glutathion (GSH) a spotřeby NADPH (Carlerg a Mannervik, 1985). Metoda je modifikovaná na mikrodeskové provedení při vlnové délce 340 nm.

Katalytická koncentrace GST byla měřena spektrofotometricky na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukováným glutathionem a substrátem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (Habig et al., 1974) při 340 nm.

Všechna spektrofotometrická měření byla provedena na mikrotitračních deskách s využitím přístroje Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Výsledky

Pro změnu lipidní peroxidace po působení terbutylazinu jsme zjistili výraznější nárůst hladiny TBARS (12,81 nmol/g vzorku) srovnáním skupiny T4 s nejvyšší koncentrací aktivní látky oproti kontrole (10,52 nmol/g vzorku). Metribuzin vyvolal nárůst hladiny TBARS oproti kontrole u skupin M2 (27,11 nmol/g vzorku) a M4 s nejvyšší koncentrací metribuzinu (16,62 nmol/g vzorku).

Nárůst aktivity enzymu GR v porovnání s kontrolní skupinou K (17,88 nmol NADPH/min/mg protein) jsme pro terbutylazin zaznamenali u skupin T2 (19,45 nmol), T4 (21,98 nmol) a zejména T3 (23,01 nmol). Nárůst aktivity po působení metribuzinu byl pro skupiny M1; M2 a M3 (24,99; 23,31 a 25,94 nmol NADPH/min/mg protein).

Detoxikační aktivita enzymu GST se projevila ve srovnání s testovanou kontrolní skupinou K (73,64 nmol/min/mg protein) po působení terbutylazinu zejména zvýšenou aktivitou ve skupinách T1, T3 a T4 (80,56; 78,58 a 83,91 nmol/min/mg protein). Pro metribuzin se v jednotlivých M1 až M4 skupinách zvyšovala aktivita GST přímo dle zvyšující se koncentrace aktivní látky (96,98; 107,90; 126,64 a 139,87 nmol/min/mg protein) oproti kontrole.

Diskuze

Pesticidy jsou významnými polutanty a jejich výskyt ve vodním prostředí má velký vliv na organismy, jež jsou tohoto ekosystému součástí. Studie je zaměřena na hodnocení triazinových pesticidů a jejich možný vliv na antioxidační a detoxikační mechanismy u ryb v dlouhodobém testu toxicity. Tato skupina pesticidů měla vliv na zvýšení biomarkerů oxidativního stresu a detoxikačních enzymů především ve vyšších koncentracích testované aktivní látky. Vliv triazinů na oxidativní stres u ryb byl popsán zejména zvýšením lipidní peroxidace (Oropesa, 2009; Elia, 2002). Další práce ukazují negativní vliv triazinů s hodnocením pomocí dalších biomarkerů oxidativního stresu (Slaninová, 2009; Velíšek, 2011).

Závěr

Naše studie prokázala vliv terbutylazinu a metribuzinu na parametry oxidativního stresu ryb exponovanými těmito významnými polutanty z řady pesticidů. Pro posouzení ekologických či environmentálních rizik triazinů je nutné vyhodnotit také ostatní biomarkery vlivu cizorodých látek na ryby a ostatní součásti ekosystému.

Poděkování

Práce byla financována v rámci projektu IGA 90/2011/FVHE.

Literatura

Seznam literatury a citovaných zdrojů je k dispozici u autorů.

Kontaktní adresa: Martin Hostovský, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, e-mail: hostovskym@vfu.cz

Zvěř jako indikátor kontaminace životního prostředí Boar as an indicator of environmental contamination

Zelníčková Lenka, Maršálek Petr, Mikuláštková Jitka

Fakulta veterinárníhygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The method for determination of residues of 18 OCPs and PCBs (indicator congeners of PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180); hexachlorocyclohexane isomers (alpha HCH, beta HCH, gamma HCH and delta HCH); HCB; dichlorodipentyltrichloroethane and its metabolites (o,p DDT, o,p DDE, o,pDDD, p,p DDT, p,p DDE and p,p DDD) in animal meat samples has been developed and validated. Analytical determinations of the 17 OCPs were carried out by gas chromatography using mass spectrometer (GC/MS) in 26 samples from wild boars and deers during the hunting season from 2010 to 2011.

The aim of the present research was to investigate the levels of contaminations by OC pesticides and PCBs in muscle tissues of wild boars and deers (utilized as „biological indicator“) from area of Czech Republic – generally from area of Znojmo.

Keywords: *environmental analysis; organochlorine pesticides; wild boar and deer*

Úvod

Pesticidy jsou téměř všudypřítomné v dnešním světě. Všudypřítomnost pesticidů naznačuje, že expozice je přírodě nevyhnutelná (Brown et al., 1996). Zvlášť problematický je výskyt organochlorových pesticidů, které jsou perzistentní a ve většině podmínek stabilní a mohou mít nepříznivé účinky na reprodukci a vývoj (Van der Oost et al., 2003; Van der Berg et al., 1998).

Polychlorované bifenyly (PCB) a organochlorové pesticidy byly označeny jako zdroje znečištění životního prostředí ve všech sférách globálního systému a byly identifikovány ve Stockholmské úmluvě o perzistentních organických znečišťujících látkách (POPs) (Safe, 1992; Muir et al. 2006). Představují jednu z nejvýznamnějších skupin kontaminantů (Naccari et al., 2004).

Rezidua v půdě a biotě představují významný zdroj kontaminace zvěřiny a zvýšení rizika pro člověka jako spotřebitele (Muir et al., 2006). Protože jsou POPs rozpustné v tucích a dochází k bioakumulaci prostřednictvím potravního řetězce, jejich zbytky se staly faktorem pro znečišťování životního prostředí a jejich toxické účinky byly pozorovány u lidí a zvířat. Proto je důležitý cílený monitoring, který umožní řídicím orgánům učinit správné rozhodnutí a zavést správné opatření (Niewiadowska et al., 2010).

Lovná zvěř je velice úzce spojena s přírodním prostředím a s intenzivní zemědělskou výrobou, je tedy vhodným bioindikátorem kontaminace, zejména pesticidními látkami.

Materiál a metodika

Pro monitoring výskytu xenobiotik v přírodním prostředí byla vybrána lovná zvěř. Zvířata nebyla řešitelským týmem usmrcována, ale vzorky byly získány ze zvířat odlovených myslivci. Vzorky divokých prasat a jelenů (svalovina) byly odebírány na území jižní Moravy (zejména oblast v okolí Znojma) v průběhu roku 2011.

Vlastní stanovení indikátorových kongenerů PCB a organochlorových pesticidů a jejich metabolitů ve svalovině bylo provedeno metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS).

Výsledky

Byla zavedena a validována metodika pro stanovení obsahu indikátorových kongenerů PCB a organochlorových pesticidů a jejich metabolitů ve svalovině divokých prasat a jelenů.

Výsledky obsahu PCB (indikátorové kongenery 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180), HCH (izomery alfa HCH, beta HCH, gamma HCH a delta HCH), HCB a organochlorových pesticidů (metabolity o,p DDT, o,p DDE, o,pDDD, p,p DDT, p,p DDE a p,pDDD) ve svalovině divočáků a jelenů v $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a průměrné obsahy jednotlivých látek u divokých prasat a jelenů jsou uvedené v tabulce 1 [$\mu\text{g.kg}^{-1}$ svaloviny \pm SD].

Tabulka 1: Minimální, maximální a průměrný obsah jednotlivých látek u divokých prasat a jelenů [$\mu\text{g.kg}^{-1}$ svaloviny \pm SD a obsah tuku [%]].

	Divoké prase [n = 26]			Jelen [n = 7]		
	min	max	$\bar{X} \pm \text{SD}$	min	max	$\bar{X} \pm \text{SD}$
Σ PCB [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	0,105	5,840	1,049 \pm 1,251	0,211	0,581	0,387 \pm 0,146
Σ HCH [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	0,002	0,443	0,147 \pm 0,128	0,048	0,330	0,193 \pm 0,092
HCB [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	0,049	0,714	0,224 \pm 0,173	0,005	0,169	0,040 \pm 0,058
Σ DDT [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	0,255	150,003	41,713 \pm 43,646	0,263	2,472	0,711 \pm 0,796
Tuk [%]	1,060	9,347	3,519 \pm 2,551	0,101	2,577	0,643 \pm 0,868

Při statistické analýze byl pomocí T-testu zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($P > 0,05$) mezi hodnotami zjištěnými u samic a samců divokých prasat; u PCB a HCB statisticky významné rozdíly mezi hodnotami zjištěnými u divokých prasat a jelenů ($P < 0,05$), u organochlorovaných pesticidů DDT, DDE a DDD a jejich metabolitů byl zjištěn statisticky velmi významný rozdíl mezi hodnotami zjištěnými u divokých prasat a jelenů ($P < 0,01$). Statisticky významné a velmi významné rozdíly mezi zjištěnými hodnotami jsou způsobeny cca 5x větším množstvím tuku u divokých prasat než u jelenů. V případě HCH byl rozdíl mezi jeleny a divočáky statisticky nevýznamný ($P > 0,05$).

Hygienické limity pro Σ PCB 2 000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, Σ DDT 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, HCB 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a Σ HCH 13 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (SVS ČR). Žádné námi naměřené hodnoty nepřekračovaly tyto hygienické limity.

V rámci monitoringu divokých prasat v ČR dle SVS ČR nepřekročila rezidua chlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenyků (PCB) stanovené hygienické limity u žádného z vyšetřených vzorků (všechny hodnoty nedosahovaly 50 % hygienických limitů) (SVS).

Ve skupině ostatní spárkaté zvěře (mimo prasata divoká) bylo vyšetřeno 18 jelenů evropských a 3 jeleni sika, 5 daňků evropských a 3 srnci. Nebyly zjištěny nadlimitní hodnoty u žádného z vyšetřovaných vzorků. Všechny hodnoty ležely v intervalu do 50 % hodnot hygienických limitů (SVS).

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 77/2011/FVHE.

Literatura

NACCARI, F.; GIOFRE, F.; LICATA, P.; CALO, M.; PARISI, N. Organochlorine pesticides and PCBs in wild boars from Calabria (Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*. 2004, vol. 96, no. 1-3, s. 191-202.

NIEWIADOWSKA, A.; KILJANEK, T.; SEMENIUK, S.; ŻMUDZKI, J. Determination of pyrethroid residues in meat by gas chromatography with electron capture detection. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2010, vol. 54, no. 4, s. 595-599.

BROWN, P.; CHARLTON, A.; CUTHBERT, M.; BARNETT, L.; ROSS, L.; GREEN, M.; GILLIES, L.; SHAW, K.; FLETCHER, M. Identification of pesticide poisoning in wildlife. *Journal of Chromatography A*. 1996, vol. 754, no. 1-2, s. 463-478.

SAFE, S. Development, validation and limitations of toxic equivalency factors. *Chemosphere*. 1992, vol. 25, no. 1-2, s. 61-64.

MUIR, D.; SVERKO, E. Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: critical appraisal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, vol. 386, no. 4, s. 769-789.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, vol. 13, no. 2, s. 57-149.

VAN DER BERG, M.; BIRNBAUM, L.; BOSVELD, A.T.C.; et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*. 1998, vol. 106, no. 12, s. 775-792.

Státní veterinární správa České republiky. Informační bulletin č. 1/2011. Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami – situace v roce 2010.

Kontaktní adresa: Lenka Zelníčková, Ing., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHEVFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10026@vfu.cz.

Activities of hepatic microsomal cytochrome P450 3A and 2C in pigs in relation to castration

¹Tománková Jana, ²Zamaratskaia Galia

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Department of Food Science, BioCenter, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Summary

Surgical castration of male pigs is commonly used in many countries to avoid consumer's dissatisfaction due to boar taint in meat. However, limited information is available on the effects of surgical castration on hepatic metabolism, especially cytochrome P450 (CYP450) system. The isoforms CYP3A and 2C belong to the major drug metabolizing enzymes. In this study, we analyzed hepatic activities of CYP3A and 2C in entire and surgically castrated pigs. 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin and 7-benzyloxyquinoline were used as probe substrates to estimate CYP3A activity and tolbutamide to estimate CYP2C activity. We found no differences in the activities of CYP3A and 2C between entire male and surgically castrated pigs. These results extend our knowledge on physiological effects of surgical castration of male pigs on drug-metabolising enzymes.

Keywords: surgical castration; cytochrome P450; 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin; 7-benzyloxyquinoline; tolbutamide

Introduction

Boar taint is unpleasant odour found in meat from some entire male pigs and to a much lesser extent in meat from female pigs. Nowadays, surgical castration is commonly used to eliminate boar taint in male pigs intended for meat production.

The cytochrome P450 (CYP450) superfamily of hemoproteins is the major enzymatic system for oxidative metabolism of drugs, xenobiotic and environmental pollutants. CYP450s also catalyze the oxidative metabolism of several endogenous substrates. Many factors are involved in the regulation of the activities of CYP450. Among these factors, genetic background and environment are the most important (Puccinelli et al., 2011). Apart from this, the levels of endogenous sex hormones can affect CYP450 activities (Rasmussen et al., 2011a; Zamaratskaia et al. 2009). In the present study we further investigated effect of endogenous sex hormones on CYP450 activities. Particularly, we compared CYP3A and CYP2C enzymatic activities in the pigs with high (entire male pigs) and undetectable (surgically castrated pigs) levels of endogenous testicular steroids.

Material and Methods

Chemicals

Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) provided 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC), 7-benzyloxyquinoline (BQ), tolbutamide and NADPH. Acros (Geel, Belgium) provided hydroxyquinoline (HQ). Merk (Darmstadt, Germany) provided methanol and acetonitrile of HPLC grade.

Animal and sampling

In this study we used the crossbreed pigs (Swedish Yorkshire dam x Swedish Landrase sire) from Swedish University of Agricultural Sciences Funbo-Lövsta experimental station. The pigs were divided into two groups. First group was surgically castrated

pigs, second group was entire male pigs. Liver samples were collected, frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C until used for microsomal preparations as described by Rasmussen et al. (2011b).

Activities of CYP3A and 2C

Metabolism of BFC and BQ were used to estimate the activity of CYP3A (Zlabek and Zamaratskaia, 2012). The rate of tolbutamide hydroxylation was used to estimate CYP2C activity (Zamaratskaia et al., 2012).

Results and Discussion

The activities of both CYP3A and CYP2C were similar in entire and surgically castrated male pigs ($P>0.05$ for all activities; Fig. 1).

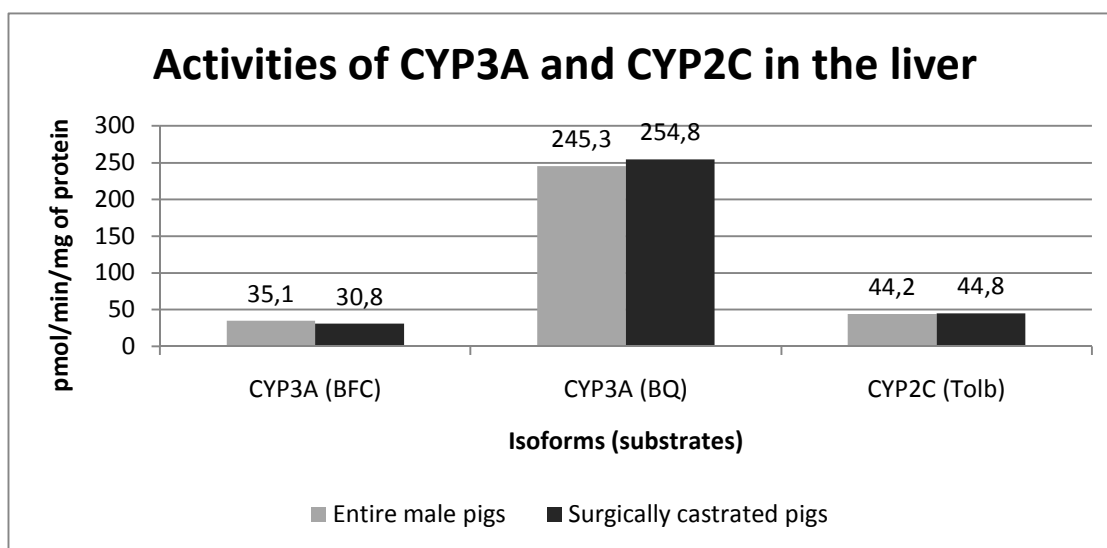


Fig.1. Activities of CYP3A and CYP2C in the liver from entire and surgically castrated male pigs. Data are presented as median, pmol/min/mg of protein

Abbreviations: BFC: 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin; BQ: 7-benzyloxyquinoline, Tolb: Tolbutamide

It is well known that some CYP450 isoforms can be modulated by surgical castration (Zamaratskaia et al., 2009; Brunius et al., 2012). This modulation is thought to be due to the differences in the levels of endogenous hormones produced by the testis. Any interactions between hormones and CYP450 are of interest because of an important role of CYP450 in drug metabolism. Modulation (either induction or inhibition) of specific CYP450 isoforms can lead to a modified drug metabolism and thus to unpredictable effects on health. Therefore, it is essential to study interactions between CYP450 and endogenous hormones, which can interfere with CYP450-mediated reactions and affect pharmacokinetics of drugs. Studies on the factors regulating major drug-metabolising CYP3A and CYP2C isoforms has become an important part of drug research.

Our results suggest that either CYP3A or CYP2C are affected by the variations in the levels of endogenous hormones of testicular origin. In contrast, Zamaratskaia et al. (2012) found that BFC and tolbutamide metabolism were higher in the pigs with higher levels of testicular hormones. The differences in the results might be due to the different breeds used in the present study and in the study by Zamaratskaia et al. (2012). It was

previously shown that the effect of testicular steroids on CYP450 can be breed-dependent (Zamaratskaia et al., 2012). Moreover, surgically castrated pigs were used in the present study, whereas Zamaratskaia et al. (2012) used only entire male pigs with variable levels of testicular steroids. Nevertheless, our results provide further insights into physiological effects of surgical castration, particularly on the activities of major drug-metabolising enzymes.

Conclusion

Catalytic activities of major drug-metabolising enzymes CYP3A and 2C were similar in entire and surgically castrated male pigs suggesting that endogenous hormones of testicular origin has no or minimal involvement in the regulation of CYP3A and CYP2C.

Acknowledgements

The study was financially promoted by the Swedish Board of Agriculture, Sveriges Grisproducenter Forskningsstiftelsen and C.F. Lundströms stiftelse.

References

- BRUNIUS C, RASMUSSEN M, EKSTRAND B, LACOUTIERE H, ANDERSSON K, ZAMARATSKAIA G. Expression and activities of hepatic cytochrome P450 (CYP1A, CYP2A and CYP2E1) in entire and castrated male pigs. *Animal* 2012; 6, 271–277.
- PUCCINELLI E, GERVASI PG, LONGO V. Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in pig, a promising animal model. *Current Drug Metabolism* 2011; 12, 507–525.
- RASMUSSEN MK., ZAMARATSKAIA G, EKSTRAND B. In vitro cytochrome P450 2E1 and 2A activities in the presence of testicular steroids. *Reproduction in Domestic Animals* 2011a; 46, 149–154.
- RASMUSSEN MK., EKSTRAND B, ZAMARATSKAIA G. Comparison of cytochrome P450 concentrations and metabolic activities in porcine hepatic microsomes prepared with two different methods. *Toxicology in Vitro* 2011b; 25, 343–346.
- ZAMARATSKAIA G, ZLABEK V, CHEN G, MADEJ A. Modulation of porcine cytochrome P450 enzyme activities by surgical castration and immunocastration. *Animal* 2009; 3:8, 1124–1132.
- ZAMARATSKAIA G, ZLABEK V, ROPSTAD E, ANDRESEN Ø. Association of porcine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) and 2C (CYP2C) activity with testicular steroid levels. *Reproduction of domestic animals (in press)* 2012; doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.01986.x.
- ZLABEK V, ZAMARATSKAIA G. Comparison of three fluorescent CYP3A substrates in two vertebrate models, pig and Atlantic salmon. *Animal (in press)* 2012; doi: 10.1017/S1751731111002096

Contact address: Jana Tománková, Mgr. Ing., Ústav hygieny a technologie masa, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09032@vfu.cz

SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat
zoologických zahrad*

Presence of emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian species in the Czech Republic

¹Baláž Vojtech, ²Civiš Petr, ²Vojar Jiří, ¹Literák Ivan

¹Department of Biology and Diseases of Wildlife, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, Brno 612 42, Czech Republic

²Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, Prague 6-Suchdol 165 21, Czech Republic

Summary

The fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is important emerging pathogen of wildlife. It has been devastating amphibian populations in global scale. However some countries have no evidence of disease-mediated declines and the research is limited. The Czech Republic harbours surprisingly rich amphibian diversity (21 species) and many species are present in relic or edge-of distribution populations. Limited populations are in general more vulnerable to pathogen outbreaks. Data on *B. dendrobatidis* in the Czech Republic are being collected since 2008. The prevalence is similar to surrounding countries but varies in hosts, time and geography. Intensity of infection is in general very low, with some exceptions. Mortality caused by the fungus was detected only once. *Bombina variegata*, *Bufo calamita* and *Bufo viridis* showed ability to clear infection. Genus *Rana* and *Pelobates fuscus* seem to be resistant to infection. Models on habitat suitability show lowlands to harbour more infections than mountains. We conducted first attempts to collect the fungus for cultivation and genetic typing of the local strain.

Keywords: chytridiomycosis; Czech Republic; *Bombina*; *Bufo*; *Pelophylax*; host-specificity

Introduction

Batrachochytrium dendrobatidis is a fungal pathogen globally infecting amphibians and causing fatal disease (chytridiomycosis) in many parts of the world [Fisher et al. 2009]. The significance of *B. dendrobatidis* in Europe is illustrated by mass mortalities or local extinctions in Spain [Bosch et al. 2001] and Italy [Bielby et al. 2009]. Most of European research aimed on *B. dendrobatidis* takes place in western countries and on species with predominantly western distribution. Central Europe has not experienced devastating impact of the disease, but the pathogen is present and common among local species [Statecsny and Glaser 2011]. As the Czech Republic lays on important bio-geographical boundary between eastern and western Europe, the local amphibian fauna contains very high diversity of species and genetic lineages of amphibians. First step in understanding the impact of *B. dendrobatidis* in this area is to map its distribution in geography as well as in hosts. Then further methods can be applied to assess the risk the disease poses to our fauna.

Material and Methods

Collection of data on *B. dendrobatidis* in Czech Republic started in 2008 and still continues. Swab samples are taken by sterile cotton swabs (Dryswab MW100 finetip) in the standardized manner [Hyatt et al. 2007] often with cooperation of nature conservation professionals (e.g. Nature Conservation Agency of the Czech Republic). In case of moribund animals, tissue samples are collected from skin and preserved in ethanol. DNA is extracted by MagNA Lyser (Roche) and PrepMan[®] Ultra (Applied Biosystems[®]). Detection of the pathogen is done by real-time quantification PCR

(qPCR) with primers and TaqMan[®] probe (Applied Biosystems[®]) specific to the pathogen [Boyle et al. 2004] on Light Cycler 480 (Roche). The final result is the amount of genomic equivalents of 1 zoospore in the sample (GE). Samples are considered positive if the fluorescence curve shows successful reaction and the final GE value reaches 0.1. All detections are performed in duplicates, and the mean of the two results is considered true quantity.

Results

Within the course of last 4 years over thousand samples were collected from 13 species. The observed overall prevalence of *B. dendrobatidis* in Czech Republic is around 8%, but it varies between hosts. Both *Bombina* species reach 13% prevalence, with other species having much less if any incidence of positivity. In case of *B. variegata* clearing of infection and decrease of pathogen load was detected in field in individual cases. Although toads of family Bufonidae show very low prevalence, one specimen of clearly sick *Bufo viridis* (died shortly after sampling) had pathogen load reaching 13 750 GE and can be considered the first case of fatal chytridiomycosis in Czech Republic. Observations in captivity showed that both *Bufo calamita* and *Bufo viridis* are able to clear infection during the overwintering.

Discussion

B. dendrobatidis seems to be quite common in the area Czech Republic, infecting mainly family Bombinatoridae, frogs of genus *Pelophylax* and more rarely family Bufonidae. This is not surprising as statistical analyses on whole Europe-scale support such observation. Fatal chytridiomycosis was observed in one case, however in general we see low pathogen loads, with no apparent symptoms of disease, situation similar to other central European countries [Ohst et al. 2011]. Spontaneous clearing of infection is known to occur in variety of species and it is possible that many amphibian taxa have immune system capable of fighting the infection by *B. dendrobatidis* [Voyles et al. 2011].

Acknowledgements

Special thanks to all contributors who helped with sample collection, to “Risk Assessment of Chytridiomycosis in Europe” team for methodological support and my supervisor specialist Trenton Garner from IOZ, Zoological society of London. The study was supported by ČR (grant nr. MSM6215712402) and VGA FŽP ČZU in Prague, nr. 201042110042.

References

- BIELBY, J., BOVERO, S., SOTGIU, G., TESSA, G., FAVELLI, M., ANGELINI, C., DOGLIO, S., CLARE, F.C., GAZZANIGA, E., LAPIETRA, F. AND GARNER, T.W.J. Fatal Chytridiomycosis in the Tyrrhenian Painted Frog. *EcoHealth*, 2009, vol. 6, no. 1, p. 27-32.
- BOSCH, J., MARTINEZ-SOLANO, I. AND GARCIA-PARIS, M. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 2001, vol. 97, no. 3, p. 331-337.
- BOYLE, D.G., BOYLE, D.B., OLSEN, V., MORGAN, J.A.T. AND HYATT, A.D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, vol. 60, no. 2, p. 141-148.

FISHER, M.C., GARNER, T.W.J. AND WALKER, S.F. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Reviews of Microbiology*, 2009, vol. 63, p. 291-310.

HYATT, A.D., BOYLE, D.G., OLSEN, V., BOYLE, D.B., BERGER, L., OBENDORF, D., DALTON, A., KRIGER, K., HERO, M., HINES, H., PHILLOTT, R., CAMPBELL, R., MARANTELLI, G., GLEASON, F. AND COLLING, A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, vol. 73, no. 3, p. 175-192.

OHST, T., GRÄSER, Y., MUTSCHMANN, F. AND PLÖTNER, J. Neue Erkenntnisse zur Gefährdung europäischer Amphibien durch der Hautpilz *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 2011, vol. 18, p. 1-17.

STATECSNY, M. AND GLASER, F. From the eastern lowlands to the western mountains: first records of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria. *Herpetological Journal*, 2011, vol. 21, p. 87-90.

VOYLES, J., ROSENBLUM, E.B. AND BERGER, L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, Jan 2011, vol. 13, no. 1, p. 25-32.

Contact address: Vojtech Baláž, MSc., Department of Biology and Diseases of Wildlife, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, balazv@vfu.cz

Presence of parasitic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibians of Cameroon

¹Baláž Vojtech, ¹Literák Ivan, ^{2,3}Gvoždík Václav

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

²Department of Vertebrate Evolutionary Biology and Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov, Czech Republic

³Department of Zoology, National Museum, Prague, Czech Republic

Summary

A fungal pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis*, was detected and first confirmed in contemporary amphibian populations of Cameroon in lowlands of the Congo Basin. Both samples collected in field and samples from museum vouchers were used. Real-time qPCR was used as the detection method. The observed proportion of infection varied with location and the infection intensity was low. No apparent clinical symptoms were found at the animals in field. We assume that these results could provide another support for the hypothesis of the long-lasting host-pathogen coevolution within Africa resulting in a possible partial resistance of African anurans to the pathogen. We failed to detect *B. dendrobatidis* at several localities, however, we warn that the Cameroonian Highlands should be further monitored considering the suitable climate for the fungus and rich amphibian fauna.

Keywords: chytridiomycosis; Congolian lowland rainforests; Afromontane; *Phlyctimantis*; *Xenopus*

Introduction

The amphibian skin disease chytridiomycosis caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is a dramatic example of an emerging wildlife infectious disease associated with amphibian population declines and local/global extinctions. The disease has caused population declines or even species extirpations in Americas, Australia and Europe [Fisher et al. 2009]. The importance of amphibian disease research in Africa lies primarily in the fact that southern Africa is considered the most likely place of origin of the fungus, which was probably disseminated around the world via the international trade of a pipid frog, *Xenopus laevis* [Weldon et al. 2004]. It is possible that the general low incidence is a result of already undergone host-pathogen co-evolution [Kielgast et al. 2010] *B. dendrobatidis* has been detected in Africa in both historical [Soto-Azat et al. 2010] and contemporary sample sets e.g. [Kielgast, Rodder, Veith and Lotters 2010]. Cameroon is of particular importance as its physical geography forms a natural border between West and Central African amphibian fauna, furthermore it is the region of origin of the historically oldest *B. dendrobatidis* -positive amphibian sample from Africa [Soto-Azat, Clarke, Poynton and Cunningham 2010].

Material and Methods

Swab samples from live amphibians (n=104) were taken by firmly running sterile cotton swabs (Dryswab MW100 finetip) over the ventral surface, flanks and feet in the standardized manner [Hyatt et al. 2007]. Museum vouchers were sampled with the use of dental brushes (n = 289). All specimens used in this study are deposited in the herpetology collections of the National Museum in Prague, Czech Republic.

DNA was extracted with the use of MagNA Lyser (Roche) and PrepMan[®] Ultra (Applied Biosystems[®]). Detection of the pathogen was performed by real-time quantification PCR (qPCR) with primers and TaqMan[®] probe (Applied Biosystems[®]) specific to the pathogen on Light Cycler 480 (Roche). The qPCR results in genomic equivalents were multiplied by the factor 10 as the DNA samples were diluted 10x prior to qPCR [Boyle et al. 2004].

Results

The swab samples collected in 2010 showed one positive specimen (*Phlyctimantis leonardi*, Hyperoliidae). Thus the incidence in this sample set was 1% which is much lower than in areas with observed *B. dendrobatidis* - mediated declines. Museum samples (year 2009) gave much higher incidence of infection, that reached to 20% and the infection intensity was higher. However in case of museum vouchers some contamination may have had influence on the observed results. 9 out of 32 localities were found to harbour the pathogen.

Discussion

Distribution of *B. dendrobatidis* in Cameroon is in general patchy, with no evident pattern. Fatal chytridiomycosis cases are known to occur when GE values reach a critical threshold of about 10,000 [Vredenburg et al. 2010]. Observed low GE can be the result of either very early stage of infection or the asymptomatic presence of the fungus. As no apparent mortality or disease was detected and the GE values were quite low we presume that it supports the idea of previous host-pathogen co-evolution. Amphibians limited to small ranges in mountains deserve proper research and surveillance, however with strict hygienic precautions. Especially when species still unknown to science are probably present, habitats are highly endangered by heavy degradation, and incursion of *B. dendrobatidis* from lowlands into the mountains is possible.

Acknowledgements

Funding to VG (MŠMT Project No. LC06073) to OK ČZU (No. 6046070901). The laboratory part was funded by the grant IGA VFU 73/2011FVHE.

References

- BOYLE, D.G., BOYLE, D.B., OLSEN, V., MORGAN, J.A.T. AND HYATT, A.D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, vol. 60, no. 2, p. 141-148.
- FISHER, M.C., GARNER, T.W.J. AND WALKER, S.F. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual Reviews of Microbiology*, 2009, vol. 63, p. 291-310.
- HYATT, A.D., BOYLE, D.G., OLSEN, V., BOYLE, D.B., BERGER, L., OBENDORF, D., DALTON, A., KRIGER, K., HERO, M., HINES, H., PHILLOTT, R., CAMPBELL, R., MARANTELLI, G., GLEASON, F. AND COLLING, A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, vol. 73, no. 3, p. 175-192.
- KIELGAST, J., RODDER, D., VEITH, M. AND LOTTERS, S. Widespread occurrence of the amphibian chytrid fungus in Kenya. *Animal Conservation*, Dec 2010, vol. 13, p. 36-43.

SOTO-AZAT, C., CLARKE, B.T., POYNTON, J.C. AND CUNNINGHAM, A.A. Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. *Diversity and Distributions*, Jan 2010, vol. 16, no. 1, p. 126-131.

VREDENBURG, V.T., KNAPP, R.A., TUNSTALL, T.S. AND BRIGGS, C.J. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May 2010, vol. 107, no. 21, p. 9689-9694.

WELDON, C., DU PREEZ, L.H., HYATT, A.D., MULLER, R. AND SPEARE, R. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, vol. 10, no. 12, p. 2100-2105.

Contact address: Vojtech Baláž, MSc., Department of Biology and Diseases of Wildlife, FVHE, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, balazv@vfu.cz

Can ticks parasitizing on reptiles play a role in natural cycle of SFG rickettsiae?

Kubelová Michaela, Bělohávek Tomáš, Široký Pavel

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42, Czech Republic

Summary

Altogether 466 *Ixodes ricinus* ticks (428 nymphs and 38 larvae) collected from 74 males of *Lacerta schreiberi* lizards were examined by PCR method for the presence of *Rickettsia* spp. *Rickettsial* DNA was detected using primers set RpCS.877p and RpCS.1258n among 47% of nymphs and 31.6% of larvae which were subsequently subjected to specific PCR to spotted fever group rickettsiae (SFG) detection. The results revealed that 41.4% of nymphs and 7.9% of larvae displayed presence of SFG rickettsial DNA. Selected positive samples ($n=31$) were sequenced and compared with sequences available in the GenBank database. Most of the samples ($n=29$) were similar to *R. monacensis* and 2 samples were resembled with 99% similarity to *R. helvetica*.

Keywords: SFG rickettsioses; *Ixodes ricinus* ticks; *Lacerta schreiberi*; PCR; *gltA*; *rOmpA*

Introduction

Rickettsial diseases caused by obligate intracellular Gram-negative bacteria of genus *Rickettsia* occur in endemic foci with seasonal outbreaks worldwide. Ixodid ticks play a key role in transmission of the spotted fever group rickettsiae (SFG) which include from about 25 validated SFG rickettsiae species when at least 16 are known to be pathogenic for humans (Fournier and Raoult, 2009). As the most frequent SFG rickettsiae species in Iberian Peninsula were recorded *R. monacensis* and *R. helvetica* (Márquez, 2008; Milhano et al., 2010). *R. helvetica* commonly causes flu-like febrile illness (Fournier et al., 2000) but it was also associated with fatal perimyocarditis (Nilsson et al., 1999). Two clinical cases of *R. monacensis* human disease manifested as common acute SFG rickettsioses were reported from Spain (Jado et al., 2007).

This survey was performed on *I. ricinus* ticks collected from Iberian *Lacerta schreiberi* lizard, aimed to evaluation of SFG rickettsiae infection rate in their immature stages. Our results should help to assess whether Iberian Emerald Lizard and its ticks play a role in the ecology of zoonotic rickettsioses in Iberian Peninsula.

Material and Methods

Ticks were collected from 74 males of *L. schreiberi* during breeding season 2006 and 2007 in Central System Mountains of the Iberian Peninsula. All samples were preserved in 96% ethanol and transported to our laboratory for sexing and species determination. DNA from ticks was extracted by alkaline hydrolysis as described before (Rijpkema et al., 1996) and stored at -20°C .

The detection of *Rickettsia* sp. was based on PCR reaction with primers RpCS.877p and RpCS.1258n designed according to citrate synthetase gene *gltA* (Regnery et al., 1991). Positive samples were visualised using 1.2% agarose gel with ethidium bromide under UV light as 381 bp long bands. All positive samples were chosen for further PCR reaction using SLO1F and SLO1R primers set amplifying part of *rOmpA*-encoding gene (Raoult et al., 2002). SFG rickettsiae were detected using previously described

conditions of amplification (Stańczak et al., 2006) and bands of 459 bp were considered to be positive results. In both cases reaction mixture in 25µl total volume contained: 2µl of DNA template, 10 pmol of each primer (Integrated DNA Technologies, Belgium), 0.625 Unit Taq Purple DNA Polymerase in 12.5µl of buffer (Combi PPP Master Mix, Top-Bio s.r.o. Prague, Czech Republic) and 8,5 µl of PCR water (Top-Bio s.r.o. Prague, Czech Republic). Selected positive samples were sequenced (Macrogen, Amsterdam, Netherlands) and obtained sequences were compared with sequences from the GenBank database.

Results and Discussion

A total of 466 *I. ricinus* ticks (428 nymphs and 38 larvae) were examined for the presence of rickettsial DNA. 47% of nymphs (n=201) and 31.6% of larvae (n=12) show the presence of *Rickettsia* spp. DNA. All positive samples were subsequently subjected to selective PCR with following results. Altogether 177 nymphs were found positive which comprise 88.1% of samples where rickettsial DNA was detected and 41.4% of all collected nymphs (n=428). In 25% of *Rickettsia* spp. positive larvae (n=3) was the presence of spotted fever group rickettsia confirmed, that implies overall 7.9% (3 out of the 38) of all collected larvae. To confirm our results randomly selected positive samples (n=31, all nymphs) were subsequently identified by sequencing. Sequencing data identified as the most frequent species *R. monacensis* (29 samples with 99-100% similarity), 2 isolates were resembled with 99% similarity to *R. helvetica* sequence available in the GenBank database.

Although SFG rickettsioses are reported from Iberian Peninsula, none of the studies consider reptiles and their ticks potential role in transmission of *Rickettsia* spp. Considering that altogether 31.2% of *I. ricinus* ticks found on humans in north-western Spain were carried pathogenic rickettsiae (Fernández-Soto et al., 2004), rickettsial diseases could easily become public health problem in Iberian Peninsula. Due to high prevalence (41.4% of nymphs and 7.9% of larvae) of SFG rickettsiae in immature *I. ricinus* ticks collected from *L. schreiberi* lizards and wide host range of this tick species which includes also human our results shouldn't be overlooked. The importance of our findings is on the increase considering recently described clinical cases of human rickettsioses caused by detected rickettsial species.

Conclusion

We confirmed that Iberian endemic lizard *L. schreiberi* and its ectoparasites should play a role in the ecology of SFG rickettsioses in Iberian Peninsula.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge to Joëlle Goüy de Bellocq who provided us tick samples and Lenka Wanecká for help with laboratory processing. Michaela Kubelová is holder of Ph.D. Talent Brno financial aid sponsored by Brno city municipality.

References

- Fournier, P.E., Grunnenberger, F., Jaulhac, B., Gastinger, G., Raoult, D., 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 389-392.
- Fournier, P.E., Raoult, D., 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1166, 1-11.

Jado, I., Oteo, J.A., Aldámiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M.J., Garcia-Amil, C., Rodríguez-Moreno, I., Anda, P., 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1405-1407.

Márquez, F.J., 2008. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp. Appl. Acarol.* 45, 185-194.

Milhano, N., de Carvalho, I.L., Alves, A.S., Arroube, S., Soares, J., Rodriguez, P., Carolino, M., Nuncio, M.S., Piesman, J., de Sousa, R., 2010. Coinfections of *Rickettsia slovacica* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Tick and Tick-borne Dis.* 1, 172-177.

Nilsson, K., Linqvist, o., Pahlson, C., 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis is sudden cardiac death. *Lancet* 354, 1169-1173.

Raoult, D., Lakos, A., Fenollar, F., Beytout, J., Brouqui, P., Fournier, P.E., 2002. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovacica* and associated with *Dermacentor* ticks. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1331-1336.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* 173, 1576-1589.

Rijpkema, S., Golubić, D., Molkenboer, M., Verbeek-De Kruif, N., Schellekens, J.F., 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp. Appl. Acarol.* 20, 23-30.

Stańczak, J., 2006. Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Poland. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (S1), 144-148.

Contact address: Michaela Kubelová, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, email: H09010@vfu.cz

***Myrsidea povedai* (Phthiraptera: Menoponidae), a new species of
chewing louse from *Phainoptila melanoxantha*
(Passeriformes: Bombycillidae)**

¹Lipková Alexandra, ¹Sychra Oldřich, ¹Kounek Filip, ²Čapek Miroslav,
¹Literák Ivan

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic.

²Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Kvetná 8, 603 65 Brno, Czech Republic.

Summary

A description and illustrations are given for *Myrsidea povedai* n. sp. from the black-and-yellow silky-flycatcher *Phainoptila melanoxantha*. The female of *M. povedai* is distinguished from those of other species of *Myrsidea* from Costa Rican passerine hosts by a unique combination of the following characteristics: (1) well-developed hypopharynx, (2) well-defined median gap in the rows of tergal setae and another gap between groups of setae on lateral side of tergites II–VII and the most central seta, and (3) enlarged metanotum with at least 23 setae. These characters place *M. povedai* close to *Myrsidea campestris* from *Euneornis campestris* and *Myrsidea marini* from *Pezopetes capitalis* (both from the Emberizidae). The female of *M. povedai* can be easily separated from both aforementioned species by the abdomen without conspicuously enlarged tergites. Moreover, the male of *M. povedai* is characterized by a unique male genital sclerite, which is quite long (0.13–0.15), tapered apically, with a long median line, and without subapical processes. This is the first record of a chewing louse from this host and the first record of *Myrsidea* from the passerine family Bombycillidae. All 7 birds examined in Costa Rica in 2010 were parasitized with *M. povedai*. Mean abundance was 11.6, with intensity range 4–27 lice per bird.

Keywords: *Myrsidea povedai*; Bombycillidae; chewing louse; phthiraptera

Introduction

The black-and-yellow silky-flycatcher (*Phainoptila melanoxantha*) represents a monotypic genus, which is endemic to Costa Rica and western Panama. It is an enigmatic avian lineage because its relationships to other passerines have long been controversial. It is usually placed into the Ptilogonatidae (del Hoyo et al., 2005). However, the most recent taxonomic survey recommends placing all ptilogonatids as a subfamily into the Bombycillidae (Spellman et al., 2008).

Myrsidea Waterston is the most speciose menoponid genus parasitizing mainly passerines. It currently contains 328 recognized species throughout the world, with 309 of them recorded from 343 host species in 46 families of Passeriformes (Price et al., 2003; Palma and Price, 2010). Despite its abundance, no species of *Myrsidea* has been described from passerine bombycillids (sensu Spellman et al., 2008). Here we describe a new species of chewing louse *Myrsidea*, which represents the first from the Bombycillidae and from the black-and-yellow silky-flycatcher.

Material and Methods

We conducted fieldwork during the 2010 rainy season at 2 study sites in Costa Rica: (1) Sacramento, Tamarak Lodge (10u069N, 84u079W, elevation 2,430 m; 176 birds of 29 species were examined from 30 July 2010 to 3 August 2010) and (2) Parque Nacional

Braulio Carrillo, Sector Volcan Barva (10u079N, 84u079W, elevation 2,619 m; 117 birds of 20 species were examined from 4 to 8 August 2010). At these sites, dawn-to dusk mist netting was conducted to capture as many bird species and individuals as possible and to collect their ectoparasites. A line of about 100 m of mist nets was checked at least once an hour.

Every individual bird was identified, sexed, and aged using Stiles and Skutch (1989) and Garrigues and Dean (2007). Lice were collected using the fumigation chamber method (Clayton and Drown, 2001). Lice were stored in 70% ethanol and subsequently cleared and then slide mounted in Canada balsam as permanent slides for proper identification, following the technique of Palma (1978). All measurements are in millimetres.

Results and Discussion

The female of *M. povedai* is distinguished from those of other species of *Myrsidea* from Costa Rican passerine hosts by a unique combination of the following characteristics: (1) well-developed hypopharynx, (2) well-defined median gap in the rows of tergal setae and another gap between groups of setae on lateral side of tergites II–VII and the most central seta, and (3) enlarged metanotum with at least 23 setae. These characters place *M. povedai* close to *M. campestris* from *Euneornis campestris* and *M. marini* from *Pezopetes capitalis* (both from the Emberizidae). The female of *M. povedai* can be easily separated from both aforementioned species by the abdomen without conspicuously enlarged tergites. Moreover, male of *M. povedai* is characterized by unique male genital sclerite, which is quite long (0.13–0.15), tapered apically, with long median line, and without subapical processes.

This is the first record of a chewing louse from *P. melanoxantha* and the first record of *Myrsidea* from the Bombycillidae. All 7 birds examined were parasitized with 81 specimens of *M. povedai* (40 males, 21 females, and 20 nymphs were found). Although an even sex ratio is predominant in most ectoparasites, in some species of chewing lice, a skewed ratio can be observed (Price et al., 2003). Clayton et al. (1992) found that ischnoceran lice had more female-biased sex ratios, whereas amblyceran lice had more male-biased ratios. This corroborates our results (male: female ratio 5 1:0.53). The skewed age ratio observed (adult: nymph 5 1:0.33) is also similar to those indicated by Clayton et al. (1992) and suggests the existence of stable chewing lice populations (Mashall, 1981). Eggs of lice were found on 4 of 7 black-and-yellow silky-flycatchers examined. They were located on the head and neck of host.

Although there has been no comprehensive study of the entire genus due to the large number of species involved, all evidence suggests that each host species or group of closely related host species is parasitized by 1, or more, closely related species of *Myrsidea* (Clay, 1966; Price and Dalglish, 2007). Therefore, the only practical way to deal with the taxonomy of such a large genus is to treat lice from each host family as a unit. While most species of *Myrsidea* are more easily identified by examining females, males may show characteristics needed for phylogenetic analysis (Clay, 1966). Species of *Myrsidea* grouped together based on characteristics of the male genital sclerite are frequently found to be parasitic on a group of related hosts, usually from 1 bird family. The male of *Myrsidea povedai* is characterized by a unique male genital sclerite. If other members of the Ptilogonatinae and Bombycillidae harbor *Myrsidea* with the same type of male genital sclerite, this may lend support to findings of molecular

phylogenetic analysis and confirm validity as to the recently described taxonomic status of the Bombycillidae sensu Spellman et al. (2008). The only way to clarify this case will be to collect and study more *Myrsidea* occurring on other species of Bombycillidae.

Acknowledgments

The fieldwork part of the study was permitted by the Ministerio de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones de Costa Rica (Resolución No 136-2010-SINAC). We are grateful to Bernardo Calvo Rodríguez and Martina Literakova for their help in the field. This species is named in honor of Jorge Poveda Quiro's (Costa Rica) in recognition of his friendship and invaluable help during our research field stay on Volcán Barva, Costa Rica, in 2010.

Funding was provided by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant IAA601690901). M.C. was also supported in part by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Grant LC06073).

References

- CLAY, T. 1966. Contributions towards a revision of *Myrsidea* Waterston. I. (Menoponidae: Mallophaga). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology* 17: 327–395.
- CLAYTON, D. H., and D. M. DROWN. 2001. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology* 87: 1291–300.
- DEL HOYO, J., A. ELLIOT, AND D. CHRISTIE (EDS.). 2005. *Handbook of the birds of the world, Vol. 10. Cuckoo-shrikes to thrushes*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, 895 p.
- GARRIGUES, R., AND R. DEAN. 2007. *The birds of Costa Rica: A field guide*. Christopher Helm, London, U.K., 387 p.
- MARSHALL, A. G. 1981. *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press, London, U.K., 459 p.
- PALMA R. L. 1978. Slide mounting of lice: A description of the Canada balsam technique. *New Zealand Entomologist* 6: 432–436.
- PRICE, R. D., AND R. C. DALGLEISH. 2007. *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from the Emberizidae (Passeriformes), with descriptions of 13 new species. *Zootaxa* 1467: 1–18.
- SPELLMAN, G. M., A. CIBOIS, R. G. MOYLE, K. WINKER, AND F. K. BARKER. 2008. Clarifying the systematics of an enigmatic avian lineage: What is a bombycillid? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 1036–1040.
- STILES, F. G., AND A. SKUTCH. 1989. *A guide to the birds of Costa Rica*. Christopher Helm, London, U.K., 511 p.

Contact address: Alexandra Lipková, MVDr., Ústav biologie a volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10012@vfu.cz

Chewing lice of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae) from New World warblers (Passeriformes: Parulidae) from Costa Rica

¹Kounek Filip, ¹Sychra Oldřich, ²Čapek Miroslav, ¹Literák Ivan

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic. E-mail:

sychrao@vfu.cz

²Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Kvetna 8, 603 65 Brno, Czech Republic

Summary

Four new species of chewing lice of the genus *Myrsidea* parasitic on members of the avian family Parulidae were described. They and their type hosts are: *Myrsidea basileuteri* ex *Basileuterus rufifrons*, *M. myiobori* ex *Myioborus miniatus*, *M. paleno* ex *Parkesia motacilla* and *M. zeledoni* ex *Phaeothlypis fulvicauda*. Records of undescribed *Myrsidea* representing new louse-host associations for *Basileuterus tristriatus* and *Parula pitiayumi* are also discussed.

Keywords: Amblycera; Menoponidae; *Myrsidea*; lice; new species; Parulidae; new host-louse associations; Costa Rica

Introduction

The New World warblers belong to the family Parulidae comprising 114 species, with 53 of them recorded in Costa Rica (Garrigues & Dean 2007). Despite the high proportion of Costa Rican species, data concerning their chewing lice are scarce and incomplete. At present only one species of chewing lice of the genus *Myrsidea*—*M. ridulosa* (Kellogg & Chapman, 1899)—has been reported from a parulid host, *Dendroica petechia* Linnaeus, from California, U.S.A. (Kellogg & Chapman 1899: 135) and the Galapagos Islands (Palma & Price 2010). The aim of this paper is to present new data on the species composition and distribution of chewing lice of the genus *Myrsidea* found on New World warblers in Costa Rica.

Material and Methods

We conducted fieldwork during the 2004, 2009 and 2010 at seven study sites in Costa Rica. The taxonomy of the birds follows Clements *et al.* (2010). The type specimens of the new species were deposited in the National Biodiversity Institute, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica (INBio). Other material was deposited in the Moravian Museum, Brno, Czech Republic (MZM).

Results

A total of 107 individuals of 12 bird species belonging to the family Parulidae were examined. Thirty-one birds of 6 species were parasitised with 4 species of *Myrsidea*. All these records represent new louse-host associations. Six samples from 4 hosts represent new species that were consequently described (Kounek *et al.*, 2011).

No species of *Myrsidea* were found on the following species of birds: *Basileuterus culicivorus* (6 birds examined), *Basileuterus melanogenys* (8), *Geothlypis poliocephala* (1), *Myioborus torquatus* (1), *Oreothlypis gutturalis* (5) and *Parkesia novaeboracensis* (1).

Discussion

In the course of this study, four new species of *Myrsidea* were described from 4 species of New World warblers (Parulidae) examined in Costa Rica (Kounek et al., 2011). While all females are easily identified by the shape of their abdominal tergites, males of three of these four new species—*M. basileuteri*, *M. paleno* and *M. zeledoni*—are morphologically very similar to *M. ridulosa*, the only previously described parulid *Myrsidea* (Palma & Price 2010). Males of the fourth species—*M. myiobori*—differ from other males in the abdominal chaetotaxy. Unfortunately, the two males of *M. myiobori* examined have distorted genital sac sclerites. Despite this, we believe that it is of the same type as those of other parulid *Myrsidea*. The same type of male genital sac sclerite has already been recorded from *Myrsidea* occurring on birds from families Emberizidae and Thraupidae (Price and Dalglish 2007, Price and Johnson 2009). These two families, together with the Fringillidae, Calcariidae, Icteridae, Cardinalidae and Coerebidae, belong in the so called “nine-primaried oscines clade” (Ericson & Johansson 2003). The fact that *Myrsidea* males from birds in these closely related families have the same type of genital sac sclerite is consistent with Clay (1966), who predicted that species of *Myrsidea* grouped together by characters of the male genital sclerite are frequently found to be parasitic on a group of related hosts. On the other hand, Bueter et al. (2009), who analysed mitochondrial and nuclear DNA sequences of *Myrsidea*, found that undetermined *Myrsidea* from *Seiurus aurocapilla* (Parulidae) could be related to those from thrushes of the genus *Catharus* (Turdidae). Since Turdidae are not close related to Parulidae and males of *Myrsidea* from *Catharus* thrushes have different type of genital sac sclerite we agree with Bueter’s hypothesis (Bueter et al. 2009) that sympatry and similar habitat preferences of the hosts might explain the phylogenetic relationships of these *Myrsidea*.

Acknowledgments

We are grateful to the Ministerio de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones de Costa Rica (Resoluciones No. 106-2004-OFAU, No. 136-2009-SINAC and No. 120-2010-SINAC) for their permits and support towards our fieldwork. We would like to thank Bernardo Calvo Rodriguez, Martin Havlíček, Zuzana Literáková and Martina Literáková for their help in the field. We especially thank: Jorge Poveda Quiros (Sacramento, Costa Rica) and Roberto Montero Zeledon (La Amistad Lodge, Costa Rica) for their hospitality and for giving us the opportunity to carry out research on their private land; and to Ricardo L. Palma (Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa, Wellington, New Zealand) for his review and improvement of our first draft. Funding was provided by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant No. IAA601690901). Miroslav Čapek was also supported in part by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant No. LC06073).

References

- BUETER, C., WECKSTEIN, J., JOHNSON, K.P., BATES, J.M. & GORDON, C.E. (2009) Comparative phylogenetic histories of two louse genera found on *Catharus* thrushes and other birds. *Journal of Parasitology*, 95, 295–307.
- CLAY, T. (1966) Contributions towards a revision of *Myrsidea* Waterston. I. (Menoponidae: Mallophaga). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 17, 327–395.
- CLEMENTS, J.F., SCHULENBERG, T.S., ILIFF, M.J., SULLIVAN, B.L. & WOOD, C.L. (2010) The Clements checklist of birds of the world: Version 6.5. Available from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/Clements%206.5.xls/view> (accessed 18 January 2011)

-
- ERICSON, P.G.P. & JOHANSSON, U.S. (2003) Phylogeny of Passerida (Aves: Passeriformes) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 126–138.
- GARRIGUES, R. & DEAN, R. (2007) *The birds of Costa Rica: A field guide*. Christopher Helm, London, U.K., 387 pp.
- KELLOG, V.L. & CHAPMAN, B.L. (1899) Mallophaga from birds of California. *California Academy of Sciences Occasional Papers*, 6, 53–143.
- KOUNEK, F., SYSCHRA, O., CAPEK, M., & LITERAK, I. (2011) Chewing lice of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae) from New World warblers (Passeriformes: Parulidae) from Costa Rica, with descriptions of four new species. *Zootaxa*, 3137, 56–63.
- PALMA, R.L. & PRICE, R.D. (2010) The species of *Myrsidea* Waterston (Insecta: Phthiraptera: Menoponidae) from the Galápagos Islands, with descriptions of new taxa. *Tuhinga - Records of the Museum of New Zealand te Papa Tongarewa*, 21, 135–146.
- PRICE, R.D. & DALGLEISH, R.C. (2007) *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from the Emberizidae (Passeriformes), with descriptions of 13 new species. *Zootaxa*, 1467, 1–18.
- PRICE, R.D. & JOHNSON, K.P. (2009) Five new species of *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from tanagers (Passeriformes: Thraupidae) in Panama. *Zootaxa*, 2200, 61–68.

Contact address: Filip Kounek, Ing., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Filipkounek@seznam.cz

Účinky mikrocystinů na ptáky Effects of microcystins on birds

**Král Jiří, Pikula Jiří, Band'ouchová Hana, Damková Veronika, Ondráček Karel,
Osičková Jitka, Škočová Hana**

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Cyanobacteria are prokaryotic organisms, a group capable of production of toxic secondary metabolites - cyanotoxins. Aquatic environment eutrophication leads to the development of blue-green algae blooms and can result in mass mortality of wild waterfowl. Cyanotoxins are becoming a global problem, because they can enter the food chain and the accumulation in organs and tissues of hunting game birds may threaten human health. Wild birds are exposed to many stressors, especially natural toxins, anthropogenic pollutants and infectious agents whose adverse effects may be additive or may potentiate each other. Thus the results obtained are environmentally relevant and will be used for risk assessment of microcystins for wild birds.

Keywords: *Coturnix coturnix Japonka; cyanobacteria; cyanotoxins; microcystin*

Úvod

Cyanobakterie jsou skupinou prokaryotických organismů, schopných produkce toxických sekundárních metabolitů – cyanotoxinů. Díky narůstající eutrofizaci vod dochází k rozvoji zvýšeného výskytu sinic, což při masových úhynech zejména volně žijícího vodního ptactva dává vzniku hypotéze o možné intoxikaci cyanotoxiny.

Cyanotoxiny se v současné době stávají celosvětovým problémem, jelikož mohou vstupovat do potravního řetězce a po kumulaci v orgánech a tkáních lovné pernaté zvěře ohrožovat i zdraví člověka.

Volně žijící ptáci jsou vystaveni účinkům řady stresorů, zejména přirozených toxinů, antropogenních polutantů či infekčních agens, jejichž negativní účinky se mohou sčítat či potencovat. Takto získané výsledky budou environmentálně relevantní a budou využitelné pro odhad rizik mikrocystinů pro volně žijící ptáky s praktickým dopadem v jejich ochraně.

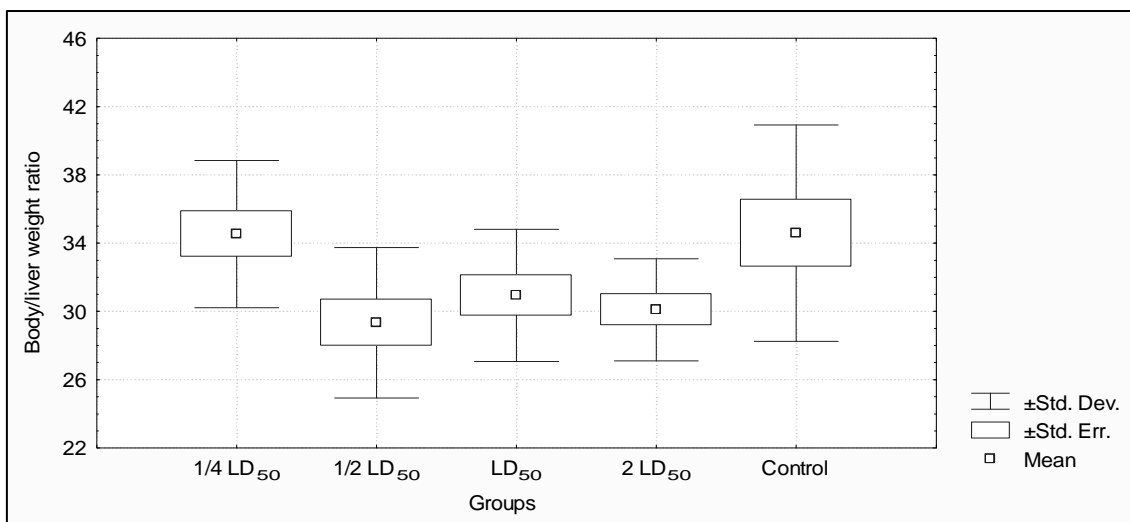
Materiál a metodika

Do pokusu bylo zařazeno 50 jedinců křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*) ve stáří 14 dnů o průměrné hmotnosti 50g, z nichž byly vytvořeny vždy po deseti kusech 4 skupiny pokusné a 1 kontrolní. Pokusným skupinám byla jednorázově podána biomasa sinic perorální sondou. Podávaný objem se odvíjel od množství mikrocystinu v ní obsaženém (1 862,77 μ g/g sušiny). Základní dávka mikrocystinu byla přejata z nejvyšší perorální LD₅₀ pro savce, což činí 10 000 μ g/kg. Jednotlivým skupinám bylo podáno množství ¼LD₅₀ (2 500 μ g/kg), ½LD₅₀ (5 000 μ g/kg), LD₅₀ (10 000 μ g/kg) a 2LD₅₀ (20 000 μ g/kg).

Jelikož nedošlo k žádným úhynům, byli ptáci po pěti dnech usmrceni a jednotlivé orgány byly podrobeny dílčím analýzám (oxidativní stres, histologické vyšetření a stanovení množství mikrocystinu ve tkáních).

Výsledky

Během experimentu nebyly pozorovány anomálie v chování a nedošlo ani k úhynům, proto usuzujeme, že toxicita mikrocystinu v biomase sinic je pro ptáků mnohem nižší než pro savce. Přesto, že nebyly pozorovány klinické projevy, byl potvrzen vliv mikrocystinu na jaterní parenchym, což dokládají hodnoty poměru hmotnosti živých jedinců k hmotnosti jejich jater (Graf 1). Pro doplnění informací byly odebrány vzorky plic, srdce, jater, ledvin, mozku a sleziny k histologickému vyšetření, dále byly odebrány vzorky plic, srdce, jater, svalu, ledvin a mozku ke stanovení oxidativního stresu a na závěr byl odebrán vzorek svalu a jater pro stanovení obsaženého množství mikrocystinu v těchto tkáních.



Graf 1: Hmotnost jedinců k hmotnosti jater

Diskuse

Během experimentu nevykazovali exponovaní jedinci žádné známky intoxikace, dokonce ani ti, kteří byli vystaveni dvojnásobku LD₅₀ pro savce. Tato skutečnost se dá vysvětlit na základě větší odolnosti ptáků vůči mikrocystinu, která je nejspíše založena na rychlejší rozkladu toxinu bakteriální mikroflórou osidlující ptačí trávicí trakt.

Přestože exponovaní jedinci klinicky nejevili známky intoxikace, postmortální analýzy prokázaly hepatotoxicitu mikrocystinu. Primárním důkazem je hepatomegalie, která vzniká na základě nahromadění krve v místech hepatocytolýzy. Dále byly alterovány biochemické parametry krve.

Závěr

Závěrem je třeba zmínit, že experiment byl přizpůsoben přírodním podmínkám, a proto byla použita biomasa sinic, jejíž množství se lišilo dle jednotlivých exponovaných skupin. Již od dávky 1/2 LD₅₀ se jednalo o objemy, které jednorázově daní jedinci nejsou schopni za fyziologických podmínek požívat. Otázkou tedy je, zda ptáci mohou ve volné přírodě s biomasou přijmout takovou dávku cytotoxinů, která povede k jejich úhynu.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno 2011 (87/2011/FVHE).

Literatura

ALONSO-ANDICOBERRY, C.; GARCIA-VILLADA, L.; LOPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Veterinary Record*, 2002, vol. 151, s. 706–7.

DAMKOVA, V.; SEDLACKOVA, J.; BANDOUCHOVA, H.; PECKOVA, L.; VITULA, F.; HILSCHEROVA, K.; PASKOVA, V.; KOHOUTEK, J.; POHANKA, M.; PIKULA, J. Effects of cyanobacterial biomass on avian reproduction: a Japanese quail model. *Neuroendocrinology Letters*, 2009, vol. 30, s. 205-210.

PECKOVA, L.; BANDOUCHOVA, H.; HILSCHEROVA, K.; DAMKOVA, V.; SEDLACKOVA, J.; VITULA, F.; PASKOVA, V.; POHANKA, M.; KOHOUTEK, J.; PIKULA, J. Biochemical responses of juvenile and adult Japanese quails to cyanobacterial biomass. *Neuroendocrinology Letters*, 2009, vol. 30, s. 199-204.

SKOCOVSKA, B.; HILSCHEROVA, K.; BABICA, P.; ADAMOVSKY, O.; BANDOUCHOVA, H.; HORAKOVA, J.; KNOTKOVA, Z.; MARSALEK, B.; PASKOVA, V.; PIKULA, J. Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon*, 2007, vol. 49, s. 793–803.

TAKAHASHI, S.; KAYA, K. Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue–green algal hepatotoxin. *Natural Toxins*, 1993, vol. 1, s. 283–285.

Kontaktní adresa: Jiří Král, MVDr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10010@vfu.cz

Seroprevalence *Toxoplasma gondii* u oslů domácích v jižní Itálii

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in donkeys from southern Italy

Machačová Tereza

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

Summary

The aim of the present study was to test sera of donkeys for *T. gondii* antibodies by Latex Agglutination Test (LAT) and the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). In total, 238 sera were collected during autumn 2010 on 20 donkey farms in southern Italy. Antibodies against *T. gondii* were found in 12 (5%) and 19 (8%) donkeys by LAT and IFAT, respectively. No statistical significant difference ($P > 0.05$) was found between genders, age, breeds, use of donkeys and their seropositivity. However, higher seroprevalence was found in females (9%) compared to males (3%); the seroprevalence increased with age. Higher seroprevalence was found in crossbreed donkeys (9%) compared to pure breed donkeys (7%); with different seroprevalence in individual breeds. Antibodies against *T. gondii* were found in 9%, 7%, 6% and 0% of donkeys used for milk, as pet animal, for meat and for breeding, respectively. The size of farms, the presence of cats in farms or grazing during whole year has not been confirmed as a risk factor for *T. gondii* infection in donkeys ($P > 0.05$). The present study describes for the first time the presence of antibodies to *T. gondii* in donkeys in Italy and the second report in Europe.

Keywords: toxoplasmosis; donkeys; serology; LAT; IFAT

Úvod

Oslí patří mezi jedny z nejstarších domácích zvířat. V poslední době jejich chov v Evropských zemích, zvláště v Itálii, nabývá opět na významu a jsou využívány v zemědělství, dopravě, turismu, ale i jako domácí zvířata. Stále více je oceňováno i jejich mléko, které se pro své složení stává častou náhražkou mléka pro děti trpící alergií na kraví mléko (Veneziano et al., 2011). Parazit *Toxoplasma gondii* je kokcidie, jejímž definitivním hostitelem je kočka a kočkovité šelmy s širokým spektrem teplokrevných mezihostitelů, včetně člověka (Dubey, 2010). Mezihostitel se může parazitem *T. gondii* nakazit konzumací neumyté zeleniny, syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa (Tenter et al., 2000).

Protože maso koní a oslů představuje významný zdroj potravy v mnoha lidských komunitách, může i jejich maso být potenciálním nebezpečím nákazy parazitem *T. gondii*. Konkrétně v Itálii je maso koní a oslů konzumováno převážně v syrovém stavu (Pozio, 2000). Doposud byly uskutečněny jen 3 studie zabývající se seroprevalencí *T. gondii* u oslů a to v Egyptě (El-Ghaysh, 1998; Haridy et al., 2010) a Turecku (Zeybek et al., 1998).

Cílem této práce bylo vyšetřit séra oslů z jižní Itálie na přítomnost protilátek proti *T. gondii* a vyhodnotit tak možné riziko nákazy pro konzumenty oslího mléka a masa.

Materiál a metodika

Vzorky krve byly odebrány od 238 klinicky zdravých oslů v průběhu podzimu 2010 na 20 oslích farmách v jižní Itálii. Jednalo se o jedince obou pohlaví, různého věku,

plemene i využití. K dispozici byly i údaje o přítomnosti koček a jiných zvířat na farmách a způsobu chovu oslů.

Protilátky proti *T. gondii* byly detekovány pomocí Latex aglutinačního testu (LAT) (Pastorex™ TOXO, BIO-RAD, France) a nepřímé imunofluorescenční reakce (NIFR) s využitím *Toxoplasma* Antigen IFR (Sevac, Prague, the Czech Republic) a anti-horse IgG FITC konjugátu (VMRD, Pullman, USA). Séra byla ředěna ve dvounásobném ředění s výchozím ředěním 1:50. Vzorokly s titrem ≥ 50 byly považovány za pozitivní.

Získané výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Data Analysis ToolPackv Microsoft Excelu s využitím Chi-kvadrát testu. Pro zjištění statistické významnosti byla použita hodnota $P < 0.05$.

Výsledky

Protilátky proti *T. gondii* byly zjištěny metodou LAT u 12 (5%) a metodou NIFR u 19(8%) oslů.

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P > 0.05$) mezi pohlavím, věkem, plemenem a využitím oslů. Nicméně byla zjištěna vyšší prevalence u samic (9%) oproti samcům (3%) v NIFR (6% a 0% metodou LAT) a seroprevalence stoupala úměrně s věkem zvířat. Vyšší prevalence byla zaznamenána také u kříženců různých plemen (9%) v porovnání s čistokrevnými plemeny (7%) v NIFR (pomocí LAT 6% a 4%). Protilátky proti *T. gondii* byly zjištěny pomocí NIFR u 9% oslů chovaných pro mléko, 7% oslů chovaných ze záliby, 6% oslů chovaných pro maso; zatímco chovní osli byli negativní. Pomocí LAT byly zjištěny protilátky u 5% oslů chovaných pro mléko, 11% oslů chovaných pro zálibu, zatímco osli chovaní pro maso a chovní osli byli negativní. Velikost farem, přítomnost jiných zvířat zejména koček na farmě, ani pastva oslů v průběhu roku nebyly prokázány jako rizikové faktory pro infekci parazitem *T. gondii* ($P > 0.05$).

Diskuse

Protilátky proti *T. gondii* byly zjištěny u 5% oslů metodou LAT a 8% metodou NIFR. Jedná se o první průkaz protilátek proti *T. gondii* u oslů v Itálii a druhý průkaz v Evropě. Zjištěna prevalence je mnohem nižší v porovnání s výsledky z jiných evropských zemí. V Turecku byly protilátky proti *T. gondii* zjištěny u 11% ze 100 vyšetřených oslů metodou LAT a u 24% metodou Sabin-Feldman Test (Zeybek et al., 1998). V Egyptě byly protilátky proti *T. gondii* zjištěny u 65.6% ze 121 oslů (Haridy et al., 2010) a u 45% ze 100 vyšetřených oslů (El-Ghaysh, 1998).

V Itálii nebyli osli doposud vyšetřeni, nicméně je možné srovnat získané výsledky se sérologickým vyšetřením koní. Protilátky proti *T. gondii* byly v Itálii zjištěny u 16% koní metodou NIFR (Polidori 1993) a u 31% koní metodou modifikovaného aglutinačního testu MAT (Tassi 2006). U oslů byla v porovnání s koňmi zjištěna mnohem nižší séroprevalence, což poukazuje na to, že se během svého života s infekcí setkali jen v malé míře. Konzumace oslího mléka a masa, tak nepředstavuje pro člověka výrazné riziko toxoplazmové infekce.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM6215712402), Ministerstva zdravotnictví v Itálii (IZSME 05/10 RC C71J1000012000) a

Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (IGA (6/2012/FVHE).

Literatura

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans, second edition. CRC Press, 2010, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida ISBN 978-1-4200-9236-3, s. 313.

EL-GHAYSH, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Egyptian donkeys using ELISA. *Veterinary Parasitology* 1998, vol. 80, no. 1, s. 71-73.

HARIDY, F.M.; SALEH, N.M.K.; KHALIL, H.H.M.; MORSY, T.A. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in working donkeys and donkey's milk in Greater Cairo, Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 2010, vol. 40, no. 2, s. 459-464.

POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S.; CAVALLUCCI, C.; BEGHELLI, D. Quality of donkey meat and carcass characteristics. *Meat Science* 2008, vol. 80, no. 4, s. 1222-1224.

POZIO, E. Is horsemeat trichinellosis an emerging disease in the EU? *Parasitology Today* 2000 vol.16, no 6, 266.

TENTER, A.M; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000, vol. 30, no. 12-13, s. 1217-1258.

TASSI P. *Toxoplasma gondii* infection in horses – a serological survey in horse slaughtered for human consumption in Italy. In: Proceedings of the Conference Toxo and Food, 2006, s. 96-97.

VENEZIANO, V.; DI LORIA, A.; MASUCCI, R.; DI PALO, R.; BRIANTI, E.; GOKBULUT, C. Efficacy of eprinomectin pour-on against *Dictyocaulus arnfieldi* in donkeys (*Equus asinus*). *Veterinary Journal* 2011, vol. 190, no. 3, s. 414-415.

ZEYBEK, H.; DÜNDAR, B.; ALTINTAS, K.; GÜNGÖR, C. The seroprevalence of toxoplasmosis in equids. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998, vol. 22, no. 4, s. 424-427.

Kontaktní adresa: Tereza Macháčová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE FU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11003@vfu.cz

