

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

Ústav hygieny a technologie mléka

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

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ



VFU Brno 30. 5. 2013

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

ISBN 978-80-7305-650-6

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají autoři.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Nálezy salmonel v potravinách v roce 2012

Myšková P., Karpíšková R. 9

Lactic acid bacteria as spoilage microbiota of frankfurters

Lačanin I., Dušková M., Kameník J., Šedo O., Zdráhal Z., Karpíšková R. 12

Štúdium dynamiky rastu baktérií mliečneho kysnutia v cereálnej matrici

Pelikánová J., Liptáková D., Valík L., Matejčeková Z. 15

Kvantitatívna analýza vplyvu faktorov prostredia na dynamiku rastu *Staphylococcus aureus*

Studeníčová A., Medveďová A., Valík L. 18

Animal products as the source of resistant *Escherichia coli*

Skočková A., Karpíšková R., Koláčková I., Bogdanovičová K. 21

Detekce významných bakteriálních patogenů v syrovém kravském mléce a mléčných filtrech

Bogdanovičová K., Karpíšková R., Koláčková I., Skočková A. 24

Determination of appropriate storage conditions for launching a new bakery product on the market

Janštová B. ml., Necidová L., Vlkovič D., Vlášek V. 27

Optimalizace izolace bakteriální DNA z ovoce a zeleniny pomocí komerčních kitů

Vojkovská H., Lorenzová A., Králík P. 30

Hygienické hodnocení klobásy se 45% podílem masa kapra obecného

Kašpar L., Buchtová H. 33

Wild game meat as a source of human exposure to lead

Drápal J., Ruprich J., Šťastný K. 37

Sledovanie koncentrácie kyseliny mliečnej a hodnoty pH počas zrecieho procesu mäsa prepelíc

Brenselová M., Koréneková B., Mačanga J., Toropilová J. 40

Detection of allergenic parvalbumin of Atlantic mackerel in fish products by real-time PCR

Kostelníková D., Renčová E., Tremlová B. 43

Senzorická analýza, kvalita a bezpečnosť jogurtov vyrobených v laboratórnych podmienkach

Gallo J., Vrabec M., Klapáčová L., Dudriková E. 46

Changes the selected parameters for Edam 30 % in three seasons

Vlášek V., Langová J., Jovanovic D. 49

Modelování a predikce rovnovážných vlhkostí sušeného nízkotučného mléka

Langová J., Vlášek V., Jovanovic D. 52

Moisture sorption isotherms of organic milk powder for infants in the temperature range of 10-30 °C	
Jovanovic D., Vlášek V., Langová J.	55
Stanovenie retinolu a tokoferolu v kozom kolostre s využitím ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC)	
Hodulová L., Kostrohounová R., Borkovcová I., Vorlová L.	58
Screening rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu – prehľad metód	
Poláková Z., Kožárová I.	61
Porovnanie detekčnej citlivosti mikrobiálnych inhibičných testov na sulfónamidy a tetracyklínové antibiotiká	
Gondová Z., Kožárová I.	64
Konfirmácia rezíduí kokcidiostatík metódou kvapalinovej chromatografie v potravinových maticiach	
Maďarová M., Kožárová I.	67
Nedestruktivní hodnocení kvality vajec v průběhu jejich skladování	
Strnková J., Nedomová Š., Buchar J.	71
Vývoj HACCP na Slovensku a jeho vplyv na fungovanie systémov zabezpečenia hygieny potravín živočíšneho pôvodu	
Toropilová J., Bystrický P., Brenesselová M.	74
Prebiotické sladidlo Tagatosa	
Olšovcová Z., Vespalcová M.	77
Vliv přídavku ječných krup na obsah nerozpustné vlákniny a objem celozrnného pečiva	
Eliášová M., Ošťádalová M., Čáslavková P., Bartl P., Tremlová B.	81
Posouzení vlivu vybraných přísad na barvu cereálních pekařských výrobků	
Čáslavková P., Tremlová B., Eliášová M., Ošťádalová M., Štarha P., Pokorná J. .	84
Comparison of methods for processing samples of soy protein for fluorescence microscopy	
Talandová M., Charousová Z., Pospiech M., Tremlová B.	88
The effect of feeding soybean extract to lactating dairy cows on yield and composition of milk and fatty acid profile of milk fat	
Ryšavý J., Křížová L., Janštová B.	91
SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBIÍ	
Porovnanie vplyvu parenterálnej aplikácie Selénu u dojníc a jalovic počas peripartálneho obdobia	
Zigo F., Vasil M., Elečko J., Farkašová Z., Chripková M.	97
The difference between the FA profile in breast and thigh muscles in chukar partridge	
Jůzl R., Zapletal D., Humpolcová P., Suchý P., Straková E.	100

SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE

Oxidative stress in birds: Effects of heavy metals and pharmaceuticals Osičková J., Král J., Ondráček K., Kováčová V., Pikula J.	105
Vliv těžkých kovů na embryonální vývoj u ptáků a líhnivost kuřat Škochová H., Osičková J., Pikula J., Bandouchová H., Král J., Ondráček K., Kováčová V.	107
Influence of selected platinum metals on content of phytochelatin in pea plants (<i>Pisum sativum</i> L.) and maize (<i>Zea mays</i> L.) Mikulášková H., Němcová B., Beklová M.	109
Hodnocení účinků platinových kovů na zástupce půdních bezobratlých (<i>Folsomia candida</i>) Němcová B., Mikulášková H., Beklová M.	112
Interaction of arsenic and cyanobacteria on haematological parameters of <i>Oncorhynchus mykiss</i> Navrátil L., Palčková S., Navrátil S.	115
Optimalizace metody SPME pro stanovení methylrtuti ve vodě Králová Z., Vávrová M., Šucman E., Večerek V.	118
Výskyt bisfenolu A v balených vodách Tesařová S., Hobza O., Vávrová M., Charvátová M.	121
Burden of the Svatka river ecosystem with selected organohalogenic pollutants Jírová A., Králová Z., Vávrová M., Charvátová M.	124
Posouzení kontaminace odpadních vod vybranými musk sloučeninami Komárková P., Valsová Š., Vávrová M.	127
Aspergilomykóza vo výkrme brojlerových kurčiat a spôsob jej eliminácie Kachnič J., Ondrašovič M., Koščo J., Ondrašovičová O., Hromada R.	130
Vnútrodruhová variabilita kliešť'a <i>Hyalomma aegyptium</i> Kautman M., Dvořáková N., Široký P.	133

SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA

Studium glykanových struktur pomocí biočipů a biosenzorů využívající lektinové rozpoznávání Šedivá A., Gemeiner P., Katrlík J.	138
---	-----

SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT

Vliv stresu na imunitní systém brojlerových kuřat Želinská G., Bedáňová I., Voslářová E.	142
Kanibalismus u bažantů chovaných v zajetí Hrabčáková P., Voslářová E., Bedáňová I.	144

Vliv podmínek skladování těl černé zvěře na koncentraci biogenních aminů ve svalovině kýty a plece Hutařová Z., Večerek V., Maršálek P., Forejtek P., Svobodová I.	147
SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN	
The effects of subchronic exposure to metribuzin and terbutylazine on some oxidative stress parameters of early developmental stages of common carp Hostovský M., Blahová J., Plhalová L., Štěpánová S., Prášková E., Maršálek P., Svobodová Z.	152
The effects of atrazine on early life stages of common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) Chromcová L., Blahová J., Živná D., Štěpánová S., Plhalová L., Prášková E., Svobodová Z.	155
Effects of terbutylazine on oxidative stress in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) under chronic conditions Slaninová A., Blahová J., Hostovský M., Modrá H., Bednář D., Svobodová Z.	158
Toxicity evaluation of buckwheat hull flavonoid extracts on cancer cells Danihelová M., Švajdlenka E., Šturdík E., Jantová S.	161
Kombinované účinky vybraných toxických vplyvov na modelový organizmus <i>Artemia franciscana</i> Špalková M., Falis M., Žďárský M., Renčko A.	164
Influence of vaccine preservative thiomersal on total mercury content in the hair of dogs before and after vaccination Sedláčková L., Král T., Ševčíková M., Kružíková K., Svobodová Z.	168
Assessment of pollution of selected rivers in the Czech Republic using chemical and biochemical markers in brown trout Zelníčková L., Blahová J., Maršálek P., Modrá H., Svobodová Z.	171
Vliv koexpozice patogenního činitele a cyanobakterií na koncentraci mikrocystinů v hepatopankreatu kapra obecného (<i>Cyprinus carpio</i> L.) Soukupová Z., Adamovský O., Mareš J., Kopp R., Palíková M.	174
Effect of subchronic exposure to copper oxychloride on oxidative stress biomarkers in liver of common carp Ševčíková M., Modrá H., Blahová J., Plhalová L., Kizek R., Svobodová Z.	177
Hodnocení toxicity ibuprofenu pro <i>Danio rerio</i> se zaměřením na vybrané biomarkery oxidativního stresu Bartošková M., Dobšíková R., Bartoš M., Lesiuková V.	180
Stanovení parametrů oxidativního stresu u ryb po subchronické expozici kyselinou acetylsalicylovou Živná D., Svobodová Z., Prášková E., Štěpánová S., Šířoká Z., Maršálek P., Blahová J., Poláčková J.	183

SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD

Konspécificita parazitů rodu <i>Haemogregarina</i> u sladkovodních želv rodů <i>Emys</i> a <i>Mauremys</i> Dvořáková N., Široký P.	188
<i>Neospora</i> spp. a <i>Toxoplasma gondii</i> u koňovitých v jižní Itálii Machačová T., Bártová E.	191
Prevalencia endohelmitov rýb v procese osídľovania nového koryta rieky Šmiga L., Košuthová L., Košuth P., Koščo J., Ševc J., Manko P., Lazar P.	194
Epizootologické šetrenie v populáciách túlavých mačiek na území východného Slovenska Čechvala P., Ondrejková A., Ondrejka R., Slepecká E.	197
Papillomatosis of the roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) Král J., Pikula J., Bandouchová H., Ondráček K., Osičková J., Škochová H., Kováčová V., Brichta J., Škorič M., Kulich P.	200

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Nálezy salmonel v potravinách v roce 2012

Findings of salmonellae in food-stuff in 2012

^{1,2}Myšková Petra, ¹Karpíšková Renáta

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

²ÚEB, Přírodovědecká fakulta MU, Brno, CZ

Summary

The objective of this study was to detect salmonellae from different food-stuff and to subtype them in order to find out the heterogeneity of the genus Salmonella. We obtained 31 strains confirmed as Salmonella. Altogether, we differed 10 serotypes. Within the serotype Enteritidis we detected 4 phage types and within the serotype Typhimurium 5 phage types. We also confirmed the identical pulsotype of the food-stuff isolate and human isolates within one outbreak.

Keywords: salmonella; food chain; typing; RTE; meat

Úvod

Salmonely způsobily v roce 2012 v České republice celkem 10 482 onemocnění (hlášené případy), což je zhruba o 19 % případů více, než v roce 2011. Po období poklesu v počtech hlášených salmonelóz mezi lety 2005 až 2010 dochází opět k jejich nárůstu (EPIDAT, 2013). Rod *Salmonella* tedy nadále zůstává druhým nejčastějším bakteriálním původcem průjmových onemocnění.

Salmonelóza je typické zoonotické onemocnění, kdy je nákaza spojená s konzumací živočišných produktů, méně často pak s konzumací kontaminované vody a potravin neživočišného původu. Vzácně se mohou objevit přenosy salmonelózy kontaktem.

Bakterie rodu *Salmonella* se vyskytují u potravinových zvířat, zejména drůbeže chované pro vejce nebo maso a u prasat. Onemocnění lidí je spojováno především s konzumací drůbežního masa, vajec a pokrmů obsahujících vejce (zejména sérotypy *S. Enteritidis*) a vepřového masa (např. sérotypy *S. Typhimurium* a její monofazická varianta).

Materiál a metody

Celkem jsme v roce 2012 získali 31 kmenů salmonel izolovaných z potravin. Ve výsledkové tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny komodity, z nichž byly kmeny izolovány.

Kultivace

Baktérie rodu *Salmonella* byly kultivovány podle ČSN EN ISO 6579 s následným vyočkováním na média BGA (Oxoid, UK), případně XLD (Oxoid, UK) nebo Rambach (Merck, Německo).

Sérotypizace sklíčkovou aglutinací

Pro zjištění antigenní struktury izolovaných kmenů byla použita metoda sklíčkové aglutinace s použitím komerčním antisér (Denka Seiken, Japonsko a BioRad, Francie). Antigenní struktura byla vyhodnocena podle Kauffmann-White-LeMinor schématu (Grimont a Weill, 2007).

Fágová typizace

U kmenů, které byly určeny sklíčkovou aglutinací jako sérotypy Enteritidis, Typhimurium a 4,[5],12:i:- byla provedena fágová typizace dle protokolu HPA Colindale.

PFGE

U kmenů, které byly získány v souvislosti s epidemickým výskytem, byla provedena pulsní gelová elektroforéza dle protokolu PulseNet s vyhodnocením pomocí softwaru BioNumerics v 5.1.

MLVA

U kmene, který byl identifikován jako monofazický sérotyp 4,[5],12:i:- byla také provedena analýza tandemových repetitivních Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA). Test byl proveden dle technické příručky ECDC.

Výsledky

Výsledky typizace izolovaných kmenů jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Souhrn komodit a výsledky typizace potravinových izolátů salmonel.

Komodita	Izolovaný sérotyp	Fágový typ	Další typizace
Drůbeží maso	Infantis (9)	nestanovováno	
	Ohio (3)	nestanovováno	
	Derby (1)	nestanovováno	
	Montevideo (1)	nestanovováno	
	Tennessee (1)	nestanovováno	
	9,12:l,v:- (1)	nestanovováno	S9-Xba-1
	Enteritidis (1)	3	
	Typhimurium (1)	U302	
Vepřové maso a játra	Typhimurium (3)	DT206, DT208, U302	
	4,5,12:i:- (1)	DT193	MLVA - 3-12-11-NA-211
	9,12:l,v:- (1)	nestanovováno	S9-Xba-1
	Stanley (1)	nestanovováno	SSt-Xba-1
	Derby (1)	nestanovováno	
Uzená makrela	Typhimurium (1)	DT82	
Zákusky	Enteritidis (2)	8 (2)	
Chlebiček	Enteritidis (1)	21c	
Pečená sekaná	Enteritidis (1)	8	
Srnčí ořez	Typhimurium (1)	DT120	

Diskuse

Izoláty z potravin zachycené v roce 2012 prokázaly, že typickou komoditou kontaminovanou salmonelami je drůbeží maso - z 31 získaných kmenů jich pocházelo 18 (58,1 %) z masa slepic nebo brojlerů. 7 izolátů bylo zachycených ve vepřovém mase a játrech (22,6 %). V 5 případech byla salmonela detekována v potravinách určených k přímé spotřebě (zákusky, obložený chlebiček, sekaná a uzená makrela).

Sérotypizace odhalila u drůbeže nejčastěji sérotyp Infantis, kdežto nejhojnější sérotyp na farmách drůbeže v České republice – Enteritidis - byl detekován pouze jednou. Vysvětlením disproporce by mohl být fakt, že ke kontaminaci může docházet i při jatečném zpracování a že některé sérotypy v tomto prostředí persistují lépe, než

kmeny sérotypu Enteritidis. Ze slepičího masa a vepřové krkovice byly izolovány kmeny sérotypu 9,12:l,v:-, jejichž pulsní profil se shodoval s profilem humánních případů zachycených v průběhu roku 2012 v Jihomoravském kraji (Myšková a kol., 2012). V masném polotovaru z vepřového masa jsme detekovali sérotyp Stanley, který byl zodpovědný za nadnárodní epidemii probíhající v několika zemích EU v průběhu roku 2012. S vepřovým masem bývají spojovány sérotypy Typhimurium a 4,[5], 12:i:-, což potvrdila i naše studie. Z potravin určených k přímé spotřebě byl nejčastěji izolován sérotyp Enteritidis, který je většinou spojován s použitím kontaminovaných vajec.

U *S. Enteritidis* byl kromě běžného fágového typu 8 izolovaných ze zákusků prokázán také fágový typ 3 v drůbežím masu, který byl opakovaně detekován z jatečné drůbeže importované z Polska. U izolátů sérotypu Typhimurium patří detekované fágové typy k méně častým. Monofazická salmonela 4,[5],12:i:- byla zařazena k typu DT193, který je v České republice u tohoto sérotypu převažující.

Kmeny, které mohly mít epidemickou souvislost, byly porovnány pomocí makrorestrikční analýzy PFGE. Oba kmeny sérotypu 9,12:l,v:- byly shodné a klonálně stejné také s humánními kmeny získanými při šetření hromadného výskytu. U sérotypu Stanley byl potvrzen stejný pulsní profil, jaký nesly kmeny z epidemie, která probíhá ve více státech EU od léta roku 2012.

U izolátu sérotypu 4,[5],12:i:- byla provedena analýza tandemových repetit. Tato metoda je v současné době u sérotypu Typhimurium a monofazických kmenů doporučována místo PFGE z důvodu jednodušší interpretace výsledků (Lindstedt a kol., 2004). Detekovaný typ je blíže příbuzný humánním kmenům daného sérotypu získaných v roce 2012, což ukazuje souvislost onemocnění s konzumací nedostatečně tepelně ošetřeného vepřového masa.

Závěr

Studie prokázala, že salmonely jsou přítomny na různé úrovni potravinového řetězce a že se na jejich dalším šíření mohou uplatňovat i zpracovatelské podniky, případně tržní síť. Metody typizace potvrdily velkou variabilitu kmenů v rámci rodu *Salmonella* a také provázanost výskytu salmonel v potravinách a surovinách a humánních onemocnění.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006 a MZE0002716202.

Literatura

- EPIDAT. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2003-2012 – absolutně. Online [cit. 14-3-2013]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>.
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th edition. Institut Pasteur, Paris. 2007, p. 166.
- LINDSTEDT, B.A.; VARDUND, T.; AAS, L.; KAPPERUD, G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *Microbiol. Methods*. 2004, vol. 59, no. 2, p. 163-72.
- MYŠKOVÁ, P.; KARPÍŠKOVÁ, R.; DĚDIČOVÁ, D. Výskyt monofazické varianty *Salmonella* 9,12:l,v:- v České republice. *Veterinářství*. 2012, roč. 2012, č. 62, s. 632-34.

Kontaktní adresa: Petra Myšková, Mgr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, myskova@vri.cz

Lactic acid bacteria as spoilage microbiota of frankfurters

¹Lačanin Ines, ¹Dušková Marta, ¹Kameník Josef, ²Šedo Ondřej, ²Zdráhal Zbyněk,
^{1,3}Karpíšková Renáta

¹Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

²Core Faculty – Proteomics, CEITEC, Central European Institute of Technology, Masaryk University

³Veterinary Research Institute

Summary

The aim of this study was to monitor occurrence of lactic acid bacteria on and in selected meat products and to define what kind of meat spoilage they cause. Cultures of lactic acid bacteria were cultivated from frankfurters. Isolated cultures with negative oxidase and catalase tests were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Identification results showed the presence of *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Weissella* spp., which were identified as the most abundant isolates in the analyzed samples that can cause spoilage of meat products. After analyzing the samples left under the same conditions for different time periods, results showed that the amount of lactic acid bacteria causing spoilage of analyzed samples was increasing.

Keywords: frankfurters; lactic acid bacteria; MALDI-TOF MS

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) is a group of gram-positive bacteria united by a constellation of morphological, metabolic and physiological characteristics. The group consists of around 20 genera united by the same role – producing lactic acid as the end product during fermentation of carbohydrates (Salmien et al., 2004). Adapted to meat LAB improve the safety of fermented sausages by means of acid formation (Lücke, 2000). But along with the other species, LAB (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp.) are also associated with spoilage of cooked meat products in chilled temperatures. The main defects that can be caused in meat are off-odours, sour off-flavours, discolouration, gas production, slime production and decrease of pH (Borch et al., 1996).

Frankfurters are one of the popular meat products because of their sensory characteristics, ease of preparation and low price. Red meat (beef, sheep and pork) and poultry meat (chicken, turkey) are common raw material for production of frankfurters. Meat and fat are dispersed in water and under moderate heat treatment, proteins form a stable structure (Gultekin et al., 2012).

The aim of this study was to monitor occurrence of lactic acid bacteria on and in selected meat products and to define in what kind of meat spoilage they can be involved.

Materials and Methods

Basic processing of the samples was carried out according to the ISO 7218 and ISO 6887-1 standards. The samples in the amount of 10 g were aseptically taken with corkscrew, diluted with 90 mL of sterile buffered MRS broth (Oxoid, UK) and homogenized. Samples were also stretched from the top with the sterile tampon (area approximately 50 cm²) and placed in the tube with MRS broth. The samples from inside and swabs from frankfurters were analyzed for count of lactic acid bacteria aerobically cultivated on MRS agar (Oxoid, UK), on 30°C for 72 hours (ISO 15214). All colonies

from each sample, that showed different morphological characteristics, were selected and purified on MRS agar for further characterization.

Isolates with negative oxidase and catalase tests were further identified using a MALDI-TOF mass spectrometry. Isolates were prepared for MALDI-TOF MS analysis according to standard protocol (Freiwald & Sauer, 2009.). Mass spectra measurements were carried out using an Ultraflex III instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) operated in the linear positive ion mode using FlexControl 3.0 software. Mass spectra were processed using Flex Analysis (version 3.0; Bruker Daltonik) and BioTyper software (version 3.0; Bruker Daltonik). The identification results were expressed by BioTyper log(scores) indicating the similarity of the unknown MALDI-TOF MS profile to available database entries. A BioTyper log(score) exceeding 2.3 indicates a highly probable identification at the species level. A BioTyper log(score) between 2.0 and 2.3 means a highly probable identification at the genus level and probable identification at the species level. Only isolates with log(score) over 2.0 were taken into account.

Results and Discussion

Analyses of whole frankfurter samples showed that the amount of lactic acid bacteria (log CFU) per gram in all samples was the same (less than 5.70 log₁₀ CFU/g). The amount of lactic acid bacteria (log CFU) per gram obtained from the inside of samples ranged around the same number (around 9 log₁₀ CFU/g) what is presented in Table 1.

Table 1: Counts of LAB on and in selected samples of frankfurters.

Samples	LAB in whole sample log ₁₀ CFU.g ⁻¹	LAB only inside of the sample log ₁₀ CFU.g ⁻¹
1	9.36	< 5.70
2	9.08	< 5.70
3	9.20	< 5.70
4	9.41	< 5.70
5	9.79	< 5.70

Identification by MALDI-TOF MS showed presence of four *Lactobacillus* species, two *Leuconostoc* species and one *Weissella* species as the most abundant isolates in the analyzed samples (Table 2).

Table 2: Identification of isolated LAB in selected samples of frankfurters.

Samples	Identification of LAB from the top of frankfurters - MALDI-TOF MS
1	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Weissella viridescens</i> *
2	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Weissella viridescens</i>
3	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fructivorans</i> , <i>Lactobacillus fructivorans</i> / <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Weissella viridescens</i> *
4	<i>Weissella viridescens</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> *
5	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

*BioTyper log(score) of selected species on MALDI-TOF MS was < 2.0

The results summarized in the Figure 1 show that, after analyzing the samples left in the same conditions for different time periods, the count of presented lactic acid bacteria is increasing. In samples of frankfurters treated with the smoke the amount of grown lactic acid bacteria is lower than in untreated samples. The lowest counts of lactic acid bacteria were in the samples taken from the inside of frankfurters.

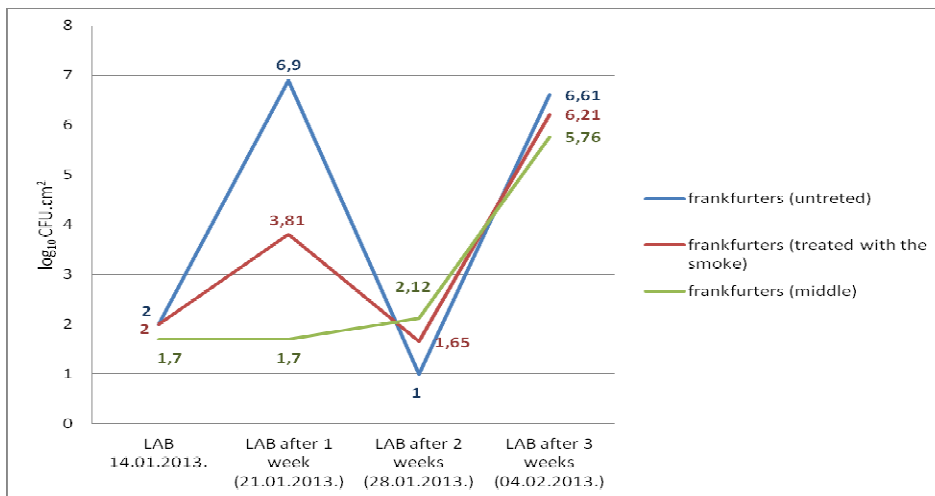


Figure 1: Counts of LAB in selected samples of frankfurters after different time period.

Conclusion

Isolated lactic acid bacteria are the most known bacteria from this group of bacteria that can cause meat spoilage.

Results showed that smoke doesn't play a big role in conservation from lactic acid bacteria in our study.

Acknowledgment

MALDI-MS part was supported by the project "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

References

All references are available within author.

Contact address: Ines Lačanin, mag.nur., Department of Milk Hygiene and Technology, FVHE UVPS Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ilacanin@vfu.cz

Štúdium dynamiky rastu baktérií mliečného kysnutia v cereálnej matrici

The investigation of dynamic growth of lactic acid bacteria in cereal matrix

Pelikánová Jana, Liptáková Denisa, Valík Ľubomír, Matejčeková Zuzana

OVHP ÚBVOZ, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave

Summary

Lactobacilli require fermentable carbohydrates, amino acids, a number of vitamins of the B-complex, nucleic acid derivatives and minerals for their growth. The fermentation of cereals by lactic acid bacteria may represent a cheap way of getting a nutritionally rich substrate for lactic acid bacteria growth and it can also bring a new trend in the development of new functional foods suitable for celiac patients. In our work, we focused on the growth dynamic of selected strains of lactobacilli in pseudocereal gruels prepared from pseudocereal buckwheat or amaranth flours, sucrose and water. Growth dynamic of microorganisms was studied during 14 h long fermentation at 37 °C, at anaerobic conditions, at an initial concentration of 10³ CFU/ml, or during 8 h long fermentation at the initial concentration of 10⁶ CFU/ml. It is important that probiotic bacteria remain viable in the product. The gruel was therefore analysed for viable cell counts during the refrigerated storage at 6 °C for 3 weeks. Besides the growth dynamic of lactobacilli, we also studied the ability of sucrose utilization and the production of lactic acid. These values were measured by colorimetric.

Keywords: lactic acid bacteria; fermentation; pseudocereal

Úvod

Cereálie sú čoraz viac skúmané v súvislosti s ich potenciálnym využitím vo vývoji funkčných potravín. Prispievajú k viac ako 60 % svetovej produkcii potravín poskytujúcich vlákninu, bielkoviny, energiu, minerálne látky a vitamíny potrebné pre ľudské zdravie (Charalampopoulos a kol., 2002). Hoci sú deficitné na niektoré základné zložky, ako sú napr. esenciálne aminokyseliny, fermentácia cereálií baktériami mliečného kysnutia (BMK) môže predstavovať najjednoduchší a najekonomickejší spôsob zvyšovania ich nutričnej hodnoty, sensorických vlastností a funkčnej kvality (Blandino a kol., 2003). Počas posledného desaťročia viedli výživové problémy k rastúcemu dopytu po náhradách mlieka, a preto potraviny na báze cereálií by mohli mať obrovský potenciál pre splnenie spotrebiteľského dopytu po nemliečnych výrobkoch, a takisto by mohli byť používané aj ako potenciálny nosič pre funkčné zlúčeniny ako sú antioxidanty, vláknina, minerály, vitamíny a probiotiká (Prado a kol., 2008; Coda a kol., 2011).

Materiál a metódy

V rámci práce sme sledovali rast nasledovných kmeňov BMK: *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1753. Čisté kultúry laktobacilov boli uchovávané v MRS bujóne (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri 5 ± 1 °C. Z 24 hodinovej čistej kultúry BMK sa získala štartovacia kultúra, ktorá sa scentrifugovala pri 6000 g 5 minút. Následne bola premytá sterilnou destilovanou vodou a opätovne centrifugovaná pri rovnakých podmienkach. Po premytí sa zliat supernatant, pelet

buniek sa rozsuspendoval v sterilnej destilovanej vode v pôvodnom objeme, pričom sme dodržiavali postup uvedený Angelovom a kol. (2006).

Cereálna kaša bola pripravovaná z celozrnej pohánkovej (12 %) alebo amarantovej (20 %) múky (Mlyn Zrno, Šišov), vody a sacharózy (2 %). Po navážení zložiek bola kaša tepelne ošetrená pri 100 °C počas 20 minút. Po ochladnutí boli kaše naočkované 5 % štartovacej kultúry a fermentované pri 37 °C anaeróbne počas 8 hodín pri počiatkovej inokulácii 10⁶ KTJ/ml, alebo 14 hodín pri koncentrácii 10³ KTJ/ml. Rast BMK sa vyšetroval každé dve hodiny. Okrem toho sa sledoval pokles pH každé štyri hodiny, pokles množstva sacharózy a tvorba kyseliny mliečnej reflektometricky (RQflex 10, Merck, Nemecko). Po skončení fermentačného procesu sa kaša uchovávala pri 6 °C a sledovalo sa prežívanie BMK, pokles pH, pokles množstva sacharózy a tvorba kyseliny mliečnej počas troch týždňov.

Predpokladané celkové počty laktobacilov sme stanovovali na MRS agare (Merck, Darmstadt, Nemecko) zriedovacou kultivačnou metódou podľa normy STN ISO 15214. Naočkované Petriho misky so stuhnutým MRS agarom sme kultivovali anaeróbne pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 48 až 72 hodín.

Výsledky a diskusia

V našej práci sme sledovali dynamiku rastu kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1753 v pseudocereálnych kašiach, pripravených z amarantovej alebo pohánkovej múky, sacharózy a vody. Zistili sme, že laktobacily sú schopné rásť v cereálnom substráte pri 37 °C a následne počas chladiarenského skladovania pri 6 °C trvajúceho 3 týždne sú schopné prežívať a udržiavať si svoje počty nad hranicou potrebnou pre požadovaný probiotický účinok v tráviacom trakte, a to 10⁶ KTJ/ml (g) (Mattila-Sandholm a kol., 2009; Parvez a kol., 2006). Okrem dynamiky rastu laktobacilov, sme sledovali aj ich schopnosť využitia sacharózy a tvorbu kyseliny mliečnej. Tieto hodnoty sme merali reflektometricky. Hodnoty rastových rýchlostí *Lb. rhamnosus* GG a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1753, rýchlosť poklesu pH, poklesu množstva sacharózy, rýchlosť tvorby kyseliny mliečnej v závislosti od substrátu, sú pre prehľadnosť uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Rast a metabolizmus laktobacilov v závislosti od substrátu.

MO	Substrát	Teplota (°C)	Gr [log KTJ.ml ⁻¹ .h ⁻¹]	K _{sach} [g.l ⁻¹]	K _{LA} [g.l ⁻¹]	K _{pH} [h ⁻¹]
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Amarantová múka + voda	37	0,708	-0,525	0,2801	-0,239
		6	-0,003	-0,012	-	-
	Pohánková múka + voda	37	0,247	-3,25	0,162	-0,208
		6	-	-0,001	0,003	-0,001
	14 h fermentácia (amarant + voda)	37	0,564			-0,169
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1753	Amarantová múka + voda	37	0,313	-0,425	0,236	-0,222
		6	0,0001	-0,004	0,007	-0,001
	Pohánková múka + voda	37	0,297	-1,312	0,119	-0,246
		6	-0,0004	-0,001	0,006	-0,001
	14 h fermentácia (amarant + voda)	37	0,3199			-0,199

Legenda: Gr – rastová rýchlosť, λ – lag-fáza, K_{sach} – rýchlosť poklesu množstva sacharózy, K_{LA} – rýchlosť tvorby kyseliny mliečnej, K_{pH} – rýchlosť poklesu pH

Môžeme si všimnúť, že rastová rýchlosť obidvoch kmeňov bola vyššia pri fermentácii kaše pripravenej z amarantovej múky. Pri použití nižšej počiatkovej koncentrácie štartovacej kultúry sa rastová rýchlosť laktobacilov výrazne nemenila, v prípade *Lb. paracasei* bola o 2 % vyššia, pri *Lb. rhamnosus* GG klesla rastová rýchlosť o 20 %.

Rýchlosť poklesu množstva sacharózy bola v pohánkovej kaši väčšia ako v amarantovej, a to v prípade jedného, ako aj druhého kmeňa. Pri použití kmeňa *Lb. paracasei* 1753, bola rýchlosť využitia sacharózy a tvorby kyseliny mliečnej nižšia ako pri fermentácii kmeňom *Lb. rhamnosus* GG, ale konečná hodnota množstva naprodukovanej kyseliny mliečnej bola vyššia. V amarantovej kaši dosiahla na konci pokusu hodnotu 5,7 g/l (pri *Lb. rhamnosus* GG 2,43 g/l), v pohánkovej to bolo 3,04 g/l (pri *Lb. rhamnosus* GG 2,23 g/l). V 24-hodine bol pozorovaný trend zníženia rýchlosti poklesu pH, poklesu množstva sacharózy a spomaleniu tvorby kyseliny mliečnej.

Záver

Na základe výsledkov možno konštatovať, že laktobacily sú nielen schopné rásť v cereálnom substráte, ale aj udržať svoje počty nad požadovanou hranicou. Napriek tomu, že BMK sú náročné mikroorganizmy a ich typickým rastovým médium je mlieko, pseudocereálna kaša, ako aj lisovaná pohánka, predstavuje lacnú a nutrične bohatú alternatívu na získanie substrátu, ktorý podporuje rast týchto prospešných laktobacilov. Toto zistenie môže do budúcnosti znamenať nový trend vývoja funkčných probiotických potravín pre ľudí trpiacich celiakiou, prípadne celiakiou spojenou s laktózovou intoleranciou.

PodĎakovanie

Práca bola podporená Agentúrou pre vedu a výskum APVV 0590-10.

Literatúra

- ANGELOV, A.; GOTCHEVA, V.; KUNCHEVA, R.; HRISTOZOVA, T. Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, vol. 112, p. 75-80.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.E.; PANDIELLA, S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*. 2003, vol. 36, p. 527-543.
- CODA, R.; RIZZELLO, C.G.; TRANI, A.; GOBBETTI, M. Manufacture and characterization of functional emmer beverages fermented by selected lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 2011, vol. 28, p. 526-536.
- CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, vol. 79, p. 131-141.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTO, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*. 2009, vol. 9, p. 25-35.
- PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; AH KANG S.; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, vol. 100, p. 1171-1185.
- PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*. 2008, vol. 41, p. 111-123.
- STN ISO 15214. Mikrobiológia potravín a krmív: Horizontálna metóda stanovenia mezofilných baktérií mliečného kysnutia. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2002.

Kontaktná adresa: Jana Pelikánová, Ing., Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, xpelikanova@stuba.sk

Kvantitatívna analýza vplyvu faktorov prostredia na dynamiku rastu *Staphylococcus aureus*

Quantitative analysis of the effect of environmental factors on the *Staphylococcus aureus* growth dynamics

Studeníčová Adriana, Medved'ová Alžbeta, Valík Ľubomír

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava

Summary

Predictive microbiology through interfaces with many other disciplines has emerged as a paradigm of modern food microbiology. Staphylococcus aureus is an important human pathogen and it is considered as the four most common causes of food-borne illnesses. A characteristic feature that distinguishes S. aureus from other pathogenic bacteria is its high tolerance to NaCl concentrations up to 20% and to low water activity values, as the minimal water activity are generally reported values in the range from 0.83 to 0.86 a_w . Our main objective was to characterize Staphylococcus aureus growth dynamic in model PCA broth in dependence on temperature and water activity. For that purposes the mathematical model that describes microbial growth was used in order to predict cardinal environmental factors values.

Keywords: *Staphylococcus aureus; predictive microbiology; water activity; temperature*

Úvod

Hygienická bezchybnosť surovín a následne aj potravín, je jedným zo základných ukazovateľov kvality potravín a významne určuje zdravotnú neškodnosť finálnych potravinárskych výrobkov. Na aktuálnosť tejto problematiky poukazuje aj skutočnosť, že napriek všeobecne klesajúcej tendencii alimentárnych ochorení spoločnosť ešte stále zaskakujú hromadné ochorenia (Valík a Prachar, 2009).

Staphylococcus aureus, predovšetkým jeho rast a produkcia enterotoxínov, predstavuje v potravinách, vzhľadom na podmienky vnútorného a vonkajšieho prostredia, potenciálne až reálne ohrozenie verejného zdravia. Jeho charakteristickým znakom, ktorý ho odlišuje od ostatných patogénnych baktérií, je jeho vysoká tolerancia voči nízkym hodnotám aktivity vody a koncentráciám chloridu sodného. Väčšina kmeňov dobre rastie aj pri 10 % NaCl a relatívne pomaly pri 15 až 20 % NaCl (Bremer a kol., 2004). Vo všeobecnosti sa ako minimálna hodnota aktivity vody pre rast *S. aureus* uvádza rozpätie hodnôt a_w od 0,86 po 0,83, ale táto hodnota závisí aj od hodnôt ostatných faktorov prostredia, ako je pH, teplota, atmosferické podmienky a prítomnosť zvlhčovadiel (Baird-Parker, 2000). Štúdium podmienok prostredia na rast patogénneho *S. aureus* je preto zásadný pre kontrolu jeho prítomnosti a znižovania potenciálneho rizika.

Modely prediktívnej mikrobiológie predpokladajú, že rast alebo inaktivácia mikroorganizmov za daných podmienok v potravinách môže byť uspokojivo odhadnutá matematickou analýzou správania sa mikroorganizmu v bujónových kultúrach alebo iných modelových systémoch, ktoré majú rovnakú alebo podobnú úroveň podmienok životného prostredia ako reálne potravinové matrice (Swinnen a kol., 2004).

Materiál a metódy

Izolát *S. aureus* 2064 pochádza z ovčieho hrudkového syra a bol izolovaný na ŠVPÚ v Prešove MVDr. A. Hanzélyovou. Jeho totožnosť bola potvrdená pomocou Gramovho farbenia, katalázového testu, API systému (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francúzsko), fluorescenčného farbenia VIT-Staphylococcus (Vermicon, Mníchov, Nemecko) a PCR analýzy v súlade s prácami Pereiru a kol. (2009). Do predtemperovaného GTK bujónu (IMUNA, Šarišské Michaľany, SR) s nastavenou hodnotou aktivity vody sme inokulovali čistú 18 h kultúru *S. aureus* 2064 vyrastenu na GTK agare (IMUNA, Šarišské Michaľany, SR) pri 37 °C, tak aby sme v každej paralelke dosiahli počiatočnú denzitu mikroorganizmu približne 10^3 KTJ.ml⁻¹. Paralelne inokulované vzorky živných médií boli staticky aeróbne kultivované pri teplotách 8-46°C ± 1 °C, za účelom popísania dynamiky rastu *S. aureus* 2064 v závislosti od meniacej sa hodnoty aktivity vody. Hodnota aktivity vody bola nastavená prídavkom NaCl (Sigma-Aldrich, Buchs, Švajčiarsko) a kontrolovaná použitím a_v -metra (Nowasina, Lachen, Švajčiarsko).

Výsledky a diskusia

Staphylococcus aureus môže rásť v širokom rozmedzí meniacich sa podmienok prostredia a následne kontaminovať potraviny. Pri príprave potravín a pri manipulácii s nimi môže kontaminácia *S. aureus* pochádzať z rôznych surovín (napr. mastitídne mlieko), z prostredia spracovateľského závodu alebo z ľudskej činnosti (Le Loir a kol., 2003). V tejto súvislosti je vhodné poznať a definovať podmienky, ktoré vedú k inhibícii *S. aureus* a prípadnej produkcii termostabilných enterotoxínov. Nakoľko soľ je pri výrobe potravín nevyhnutná a v nadväznosti na prácu Medved'ovej (2009), v ktorej bol popísaný vplyv teploty na sledovaný izolát, sme sa v našej práci zamerali na sledovanie dynamiky rastu a odumierania *S. aureus* 2064 pri minimálnych hodnotách aktivity vody v modelovom prostredí GTK bujónu v celej škále teplotného rozmedzia (8 °C až 46 °C).

Z nasledujúcich pokusov je zrejmé, že so zvyšujúcou sa teplotou smerom k optimálnej rastovej teplote 37 °C stúpala aj tolerancia izolátu 2064 voči nízkym hodnotám aktivity vody a koncentráciám chloridu sodného. Izolát *S. aureus* 2064 pri svojej optimálnej rastovej teplote 37 °C odumieral až pri 21 %-nom prídavku NaCl ($a_v = 0,83$). Podobný trend sme sledovali aj pri teplotách 35 °C a 39 °C, kde taktiež došlo k poklesom denzity až pri 21 %-nom prídavku chloridu sodného.

Ak sme znížili inkubačnú teplotu na 30 °C a 25 °C, tak došlo aj k poklesu tolerance sledovaného mikroorganizmu voči nízkym hodnotám a_v . Ten rástol ešte pri 18 %-nom prídavku NaCl, ale pri ďalšom zvýšení koncentrácie soli na 19 % ($a_v = 0,85$) nebol schopný vysporiadať sa s tak vysokou koncentráciou chloridu sodného a počas 10 dní sme pozorovali jeho postupné odumieranie.

Ďalším znížením inkubačnej teploty na 21 °C a 18 °C sa nám potvrdila skutočnosť, že so znižujúcou teplotou dochádza k poklesu schopnosti daného mikroorganizmu odolávať vysokým koncentráciám NaCl. Pri týchto teplotách boli podmienky v GTK bujóne nezlučiteľné s rastom sledovaného izolátu 2064 už pri 18 %-nej ($a_v = 0,86$) koncentracii chloridu sodného a preto ten prakticky od začiatku trvania pokusu postupne odumieral.

Podľa Smitha a kol. (1987) inhibičný účinok NaCl spočíva v prestupe iónov do buniek *S. aureus*, čo sa prejavuje poklesom rastu a biochemickej aktivity. Naše pokusy

potvrdili, že ďalším znížením inkubačnej teploty na 15 °C, izolát 2064 odumieral pri 15 % koncentrácii soli ($a_v = 0,89$) a následným poklesom inkubačnej teploty na 12 °C sa tento trend opäť potvrdil, pričom *S. aureus* 2064 nebol schopný rásť v GTK bujóne už pri 8 %-nom prídavku chloridu sodného ($a_v = 0,95$), čo je 2,6-násobný pokles tolerancie izolátu *S. aureus* 2064 v porovnaní s toleranciou daného mikroorganizmu pri optimálnej inkubačnej teplote 37 °C. Ďalším znížením teploty na 8 °C už nebol schopný tolerovať ani 5 %-tný prídavok soli ($a_v = 0,97$).

Na druhej strane, ak sme zvýšili teplotu inkubácie do suboptimálnej oblasti, na 43 °C a 46°C, zaznamenali sme pokles tolerancie izolátu 2064 voči nízkym hodnotám aktivity vody. Teda, ak sme teplotu inkubácie izolátu 2064 zvýšili na 43 °C, daný mikroorganizmus odumieral pri 20 %-nom prídavku soli a ďalším zvýšením inkubačnej teploty na 46 °C *S. aureus* 2064 nebol schopný rásť pri 15 %-nom pridaní NaCl, čo je porovnateľné s teplotou 15 °C.

Záver

Štúdium vplyvu meniacich sa environmentálnych podmienok a faktorov prostredia určujúcich intenzitu a mieru pomnoženia *S. aureus* až do netolerovateľných koncentrácií je stále aktuálnou problematikou. Preto je v mnohých krajinách rezistencia mikroorganizmov hlavným problémom ohrozenia verejného zdravia, kvôli pretrvávajúcemu obehu rezistentných kmeňov baktérií v životnom prostredí a možnej kontaminácii vody a potravín.

Pod'akovanie

Štúdia bol finančne podporená projektom APVV-0590-10.

Literatúra

- BAIRD-PARKER, T.C. *Staphylococcus aureus*. In LUND, B.M. - BAIRD-PARKER, T.C. - GOULD, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. 2000, vol. 1, s. 1317-1330.
- BREMER, P.J.; FLETCHER, G.C.; OSBORNE, C. *Staphylococcus aureus*. Christchurch: New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited. 2004, 6s.
- LE LOIR, Y.; BARON, F; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2003, vol. 2, no. 1, s. 63-76.
- MEDVEĐOVÁ, A.; VALÍK, L.; STUDENIČOVÁ, A. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, vol. 27, s. 28-35.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A. a kol. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from foods in Portugal. *Food Microbiology*. 2009, vol. 26, s. 278-282.
- SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis. *Journal of Food Protection*. 1987, vol. 46, s. 545-555.
- SWINNEN, I.A.M.; BERAERTS, K.; DENS, E.J.J. a kol. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, vol. 94, s. 137-159.
- VALÍK, L.; PRACHAR, V. *Pôvodcovia ochorení z požívatin a minimalizácia ich rizika*. 1. vyd. Bratislava: Nakladateľstvo STU. 2009, 167 s. ISBN 978-80-227-3200-0.

Kontaktná adresa: Adriana Studeničová, Ing., Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, adriana.studenicova@stuba.sk

Animal products as the source of resistant *Escherichia coli*

¹Skočková Alena, ^{1,2}Karpišková Renáta, ²Koláčková Ivana,
¹Bogdanovičová Kateřina

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

²Veterinary Research Institute, Brno, CZ

Summary

This study is focused on the comparison and characterization of *Escherichia coli* (*E. coli*) isolates obtained from the animal products – meat ($n=59$), offal ($n=20$), raw cow's milk ($n = 84$). Resistance to antimicrobial agents and detection of selected resistance genes was performed. Using the disk diffusion method, resistance to minimum one antimicrobial agent was more often detected in isolates from offal (60,0 %) and meat (52,5 %) compare to the isolates from raw cow's milk (20,2 %). Resistance to ampicillin was the most frequently detected in isolates from all commodities. In isolates from meat and offal, multidrug resistance was observed. Resistant genes responsible for the resistance to tetracycline *tetA* and *tetB* were detected in isolates from milk as well as in isolates from meat and offal. Gene *tetC* was detected only in two isolates from meat, *tetG* gene was not detected. Genes encoding resistance to β -lactams (*bla_{TEM}*) were detected only in isolates from meat and offal. In one isolate from meat *bla_{CTXm}* gene responsible for the production of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) was detected. Results of our study showed that *E. coli* isolates of meat and offal origin are more frequently a reservoir of resistance genes than isolates from milk and so represent a bigger danger for consumers.

Keywords: meat; offal; milk; resistance genes

Introduction

In the microbiological analysis is *Escherichia coli* used to assess the hygienic quality of food and food ingredients. In addition the level of antibiotic resistance in *E. coli* is considered to be a good indicator of the selection pressure exerted by antibiotic use (Lei *et al.*, 2010). Occurrence of bacteria resistant to antimicrobial agents is reported more frequent during recent years. Increased prevalence of antibiotic resistant bacteria is a cause of concern for human and animal health (Scaria *et al.*, 2010). β -lactam and tetracycline antibiotics are widely used antimicrobials, therefore resistance to these antimicrobials complicates the treatment of several bacterial diseases (Sawant *et al.*, 2007).

The aim of this work was to characterize and compare isolates of *E. coli* from meat, offal and raw cow's milk, with a focus on the evaluation of antimicrobial resistance and detection of selected genes encoding resistance to β -lactam and tetracycline antibiotics.

Material and Methods

A total of 81 isolates of *E. coli* obtained from the raw meat ($n = 59$) and offal ($n = 20$) and 84 isolates from the raw cow's milk were investigated and compared in this study. Raw meat and offal were from the retail market in the Czech Republic, samples of raw cow's milk were obtained from dairy farms in the Czech Republic. All isolates tested in this study were β -D-glucuronidase positive and indol positive.

Resistance to 13 antimicrobials (Table 1) was tested by disk diffusion method. The determination was performed according to CLSI methodology (2006a), antibiotic disks

were obtained from Oxoid Company (VB). *E. coli* isolates were evaluated based on the size of the zones of inhibition and classified as susceptible (S), intermediate resistant (I) or resistant (R) according to the criteria listed in the CLSI (2006b).

In *E. coli* isolates found to be resistant to β -lactams or tetracycline, polymerase chain reaction (PCR) was used to detect selected genes encoding this resistance – *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX} and *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*. Bacterial DNA was isolated from 24-hours culture on blood agar (BioRad, France), isolation was performed by lysis of bacterial cell suspension at a temperature of 95.5 °C for 10 minutes with the addition of 20% chelexu 100 (BioRad, France) followed by centrifugation. The supernatant was used as template DNA. For the detection of *tet* genes were used primers specified by authors Ng *et al.* (1999), for the detection of *bla* genes primers reported by Brinas *et al.* (2002) and Lewis *et al.* (2007). In 25 ml of reaction mixture was used Taq-Purple DNA polymerase with MgCl₂ (Top-Bio, CZ). PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.5% agarose (Serva, Germany) followed by visualization on transilluminator after staining in ethidium bromide.

Results and Discussion

Table 1: Results of disk diffusion method in *E. coli* isolates.

Antimicrobial agent	Disk content [µg]	Meat (n=59)		Offal (n=20)		Milk (n=84)	
		n*	%	n*	%	n*	%
AMP	10	23	39,0	10	50,0	12	14,3
AMC	30	7	11,9	3	15,0	0	0
CTX	30	2	3,4			0	0
CMP	30	3	5,1			0	0
STR	10	10	16,9	3	15,0	2	2,4
KAN	30	2	3,4	1	5,0	0	0
GEN	10	2	3,4			0	0
SXT	25	8	13,6	3	15,0	1	1,2
TMP	5	11	18,6	3	15,0	5	6,0
TET	30	17	28,8	3	15,0	5	6,0
NA	30	11	18,6	4	20,0	0	0
CIP	5	7	11,9	2	10,0	0	0
COL	10	0	0	1	5,0	0	0

Notes: n = number of investigated isolates, n* = number of positive isolates, % = percentage of positive isolates; AMP (ampicillin), AMC (amoxicillin/clavulanic acid), CTX (Cefotaxim), CMP (chloramphenicol), STR (streptomycin), KAN (kanamycin), GEN (gentamycin), SXT (sulfamethoxazole/trimethoprim), TMP (trimethoprim), TET (tetracycline), NA (nalidixic acid), CIP (ciprofloxacin), COL (colistin)

Using the disk diffusion method, resistance to minimum one antimicrobial agent was more often detected in isolates from offal (60,0 %) and meat (52,5 %) compare to the isolates from raw cow's milk (20,2 %). As you can see in Table 1, resistance to ampicillin was the most often detected in isolates from all commodities. Resistance to tetracycline was found also very often, especially among isolates from meat. Multidrug resistance (resistance to more than 3 antimicrobial groups) was found frequently in isolates from meat (25,4 %) and offal (25,0 %) compare to the isolates from milk where was not detected any multidrug resistant isolate. Similarly Schwaiger *et al.* (2012) point to the high incidence of multidrug resistant strains in meat samples with dominant

occurrence of resistance to ampicillin. In our study multidrug resistance phenotypes differed, only resistance phenotype AMP-SXT-TMP-TET was found in three *E. coli*.

In *E. coli* isolates from meat, offal and also milk same resistant genes were detected. The results are summarized in Table 2.

Table 2: Resistance genes detected in *E. coli* isolates.

Source	Resistant genes									
	<i>bla</i> _{TEM}		<i>bla</i> _{CTXm}		<i>tetA</i>		<i>tetB</i>		<i>tetC</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Meat	17	28,8	1	1,7	7	11,9	8	13,6	2	3,4
Offal	6	30,0	0	0	1	5,0	2	10,0	0	0
Milk	0	0	0	0	3	3,6	2	2,4	0	0

Notes: n = number of positive isolates, % = percentage of positive isolates

Resistant genes responsible for the resistance to tetracycline *tetA* and *tetB* were detected in isolates from milk as well as in isolates from meat and offal. Gene *tetC* was detected only in two isolates from meat, *tetG* gene was not detected. The main mechanisms responsible for the resistance of bacteria to tetracycline include active efflux system, ribosomal protection and enzyme inactivation (Koo and Woo, 2011). These resistance mechanisms are widely distributed in bacteria due to their association with mobilizable DNA elements and are often coupled with multidrug resistance (Tuckman *et al.*, 2007). Genes *tetA*, *tetB*, *tetC* encode energy-dependent efflux system which is the most common in gram-negative bacteria.

Although same isolates from milk were resistant to ampicillin according to the disk diffusion method, *bla* genes responsible for the resistance to β -lactam antibiotics were not detected. The inhibition zones of these isolates were 12 - 13 mm, i.e. very close to the breakpoint for resistant isolates (≤ 13 mm). In *E. coli* isolates from meat and offal *bla*_{TEM} gene was detected as you can see in Table 2. In one isolate from meat *bla*_{CTXm} gene responsible for the production of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) was found. Strains possessing ESBLs have been shown to contribute to increased morbidity and mortality, and therefore represent a growing public health threat, especially when they also possess other resistance determinants (Platell *et al.*, 2011).

Conclusion

Our study showed that that *E. coli* isolates of meat and offal origin were resistant to more antimicrobial substances than isolates from milk. Frequent presence of multidrug resistant strains among meat and offal isolates is important, because it makes it significant reservoir of resistant genes that can be further transmitted to susceptible strains. Also the gene *bla*_{CTXm} encoding the production of ESBLs was detected in one isolate from meat. In conclusion, animal product, especially raw meat and offal, can represent a public health threat.

Acknowledgments

This study was financially supported by research project MSM6215712402, NAZV KUS QJ 1230044 and IGA 15/2013/FVHE.

References available by the author.

Contact address: Alena Skočková, Mgr., Department of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, askockova@vfu.cz

Detekce významných bakteriálních patogenů v syrovém kravském mléce a mléčných filtrech

Presence and identification of important bacterial pathogens in raw cow's milk and milk filters

¹Bogdanovičová Kateřina, ^{1,2}Karpíšková Renáta, ²Kolářková Ivana,
¹Skočková Alena

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

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i, Brno

Summary

The work is focused on the detection of significant bacterial pathogens in raw cow's milk and milk filters. 51 samples of raw cow's milk and 44 milk filters were collected from 22 dairy farms of the Czech Republic in the period from April to December 2012. 19 % of the analyzed samples, both raw cow's milk and milk filters, were positive for bacterium *Staphylococcus aureus*. Detection of this bacterium on one dairy farm was also determinate as MRSA. There was also recorded existence of bacteria *Listeria monocytogenes* in samples collected from 2 dairy farms and existence of *Campylobacter* spp. in samples collected from one dairy farm.

Keywords: food-borne pathogens; milk filters; raw cow's milk

Úvod

Mléko a mléčné výrobky se řadí mezi základní složku lidského jídelníčku. I když je spotřeba těchto komodit ve srovnání s Evropou nízká, můžeme si dovolit tvrdit, že konzumace mléka a mléčných výrobků v České republice je dostačující.

Spotřebitel má v současnosti široké spektrum tržních druhů pasterovaného mléka včetně syrového mléka prodávaného prostřednictvím mléčných automatů nebo přímo na farmách. Mezi spotřebiteli a odborníky v ochraně zdraví byly vedeny diskuse o zdravotní nezávadnosti syrového mléka a nutnosti jeho tepelného ošetření. V současnosti není dostupná ani národní ani evropská legislativa v oblasti mikrobiologických kritérií pro syrové mléko a cílem této studie bylo získat základní informace o zoonotickém potenciálu syrového kravského mléka a mléčných filtrů.

Materiál a metodika

Celkem bylo vyšetřeno 95 vzorků pocházejících z 22 farem ČR, z toho 51 vzorků syrového kravského mléka a 44 vzorků mléčných filtrů. Odběry byly prováděny od dubna do konce roku 2012 na mléčných farmách. Mléko o objemu 250 ml bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic a po převozu do laboratoře při teplotě 4 ± 1 °C bylo ihned zpracováno.

Stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků bylo prováděno podle ČSN EN ISO 6888-1. Konfirmace suspektních kmenů *S. aureus* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) detekcí specifického úseku SA442 (Martineau *et al.*, 1998) a dále *mecA* genu, který kóduje rezistenci k meticilinu. (Secchi *et al.* 2008) Průkaz termotolerantních kampylobakterů byl prováděn podle ČSN EN ISO 10272-1. Suspektní kolonie byly konfirmovány a druhově určeny metodou PCR (Linton *et al.*, 1997). Průkaz *Listeria monocytogenes* byl prováděn podle ČSN EN ISO 11290-1. Typické kolonie byly konfirmovány a sérotypizovány metodou skličkové aglutinace

a výsledky byly potvrzeny pomocí multiplex PCR (Doumith et al., 2004). Stanovení *E. coli* bylo prováděno podle ČSN EN ISO 16649-1. Po confirmaci (produkce indolu) byly kmeny testovány na schopnost produkce Shigatoxinů *stx1* a *stx2* (Fagan *et al.*, 1999). Průkaz bakterií rodu *Salmonella* byl prováděn podle ČSN EN ISO 6579.

Výsledky a diskuze

Mezi jednotlivými vyšetřovanými vzorky byly zaznamenány značné rozdíly v závislosti na farmě a mikrobiologické kvalitě. Nejvyšší záchyt patogenů byl zaznamenán na mléčných filtrech.

Tabulka 1: Výsledky mikrobiologického vyšetření vzorků syrového mléka a mléčných filtrů.

Označení farmy	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků					
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Campylobacter spp.</i>	
		mléko	filtry	mléko	filtry	mléko	filtry
A	6	2 (1MRSA)	1	0	0	0	0
B	1	1	0	0	0	0	0
C	1	0	0	0	0	0	0
D	2	1	0	0	0	0	0
E	6	2	0	0	1	0	1
F	2	1	0	0	0	0	0
G	1	1	0	0	0	0	0
H	5	1	1	0	0	0	0
I	6	1	1	0	0	0	0
J	1	0	0	0	0	0	0
K	2	1	1	0	0	0	0
L	23	0	1	0	0	0	0
M	2	1	0	0	0	0	0
N	6	0	0	0	0	0	0
O	1	0	0	0	0	0	0
P	1	0	0	0	0	0	0
Q	1	0	0	0	0	0	0
R	1	1	0	0	0	0	0
S	2	0	0	0	0	0	0
T	22	0	0	0	1	0	0
U	1	0	0	0	0	0	0
V	2	0	0	0	0	0	0
Celkem	95	13 (13,7%)	5 (5,3%)	0	2 (2%)	0	1 (1%)

Baktérie *Staphylococcus aureus* byla detekována při mikrobiologickém rozboru nejčastěji, a to u 18 vzorků (19%). Mléčné filtry byly kontaminovány 5krát (5,3%) a syrové kravské mléko 13krát (13,7%). Na jedné z vyšetřovaných farem byly detekovány kmeny MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), a to u vzorků mléka. Karpíšková R. *et al.*, (2011) se zabývala nálezy původců alimentárního onemocnění v syrovém mléce. Celkem 56,6% vyšetřovaných vzorků syrového kravského mléka z mléčných automatů v ČR bylo pozitivních na přítomnost bakterie

Staphylococcus aureus. Výskyt bakterie *S. aureus* byl podobně jako v naší studii zaznamenán v největším počtu.

V rámci mikrobiologického rozboru byly zachyceny dva pozitivní vzorky *Listeria monocytogenes* (2%), a to vždy z mléčných filtrů ze dvou odlišných farem. Současně s identifikací bakterie byla provedena i serotypizace, byly detekovány rozdílné serotypy *Listeria monocytogenes* 1/2a a 4b. Právě serovary 1/2a a 4b, představují více než 90% lidských i zvířecích případů listeriózy (Schuchat *et.al.*, 1991).

Přítomnost termotolerantních bakterií *Campylobacter* spp. byla potvrzena v jednom ze vzorku vyšetřovaného filtru, společně s *Listeria monocytogenes*. *Campylobacter* spp. je jedním z nejvýznamnějších původců alimentárních infekcí ve vyspělých státech světa. Jeho výskyt je sledován zejména u drůbeže. V zahraničí jsou popisovány i rodinné výskyty onemocnění po konzumaci syrového mléka, u nás je však toto vehikulum v souvislosti s průjmovým onemocněním lidí udáváno velmi vzácně.

Bakterie *E. coli* byly detekovány v 91 vzorcích (42 vzorků filtrů/ 49 vzorků mléka), ale žádný z detekovaných kmenů nebyl producentem Shigatoxinů.

Salmonely nebyly potvrzeny v žádném z vyšetřovaných vzorků.

Závěr

Výsledky této studie poukazují na přítomnost významných bakteriálních patogenů na filtrech i v syrovém mléce. Z toho vyplývá upozornění pro spotřebitele, kteří by měli syrové mléko před konzumací tepelně upravit, jelikož tepelné opracování eliminuje většinu původců alimentárních infekcí (vyjma stafylokokových enterotoxinů, zodpovědných za vznik alimentárních intoxikací).

Poděkování

Presentovaná studie byla financována projekty NAZV KUS QJ1230044 a QJ1210300.

Literatura

DOUMITH M, BUCHRIESER C, GLASER P, JACQUET C, MARTIN P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (8): 3819-3822.

FAGAN, P. K., HORNITZKY, M. A., BETTELHEIM, K. A., DJORDJEVIC, S. P. Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65(2), 868-872.

KARPIŠKOVÁ R., KOLÁČKOVÁ I., VYLETĚLOVÁ M., JANŠTOVÁ B., (2011) „Mléčné automaty“ - nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce, *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2011; 20(6): 212–214.

LINTON D, LAWSON AJ, OWEN RJ, STANLEY J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (10): 2568-2572.

MARTINEAU F, PICARD FJ, ROY PH, OUELLETTE M, BERGERON MG. Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36 (3): 618-623.

SCHUCHAT A, SWAMINATHAN B, BROOME C V. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:169–183.

SECCHI C., ANTUNES A.L.S., PEREZ RODRIGUES L.S., CANTARELLI V.V., D'AZEVEDO P.A. Identification and Detection of Methicillin Resistance in Non-Epidermidis Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008 12: 316-320.

Kontaktní adresa: Kateřina Bogdanovičová, Mgr., VFU FVHE Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Bogdanovicova.K@seznam.cz, H12019@vfu.cz

Determination of appropriate storage conditions for launching a new bakery product on the market

Janštová Bohdana, Necidová Lenka, Vlkovič Daniel, Vlášek Václav

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

Summary

The aim of this study was to eliminate the thermal chain out of storage conditions at pastries products called „Mrkvánky“. Normal storage conditions, when producer guaranteed product stability during whole storage period are the refrigerator temperatures. Our study focused on possibility to storage this products at the room temperature. We stored bakery product at refrigerator temperature and at room temperature and we determined total plate count, moulds and yeasts and water activity and we compared it to the standard. In conclusion we can say that these pastries products can be stored also at the room temperature.

Keywords: pastries products; bakery products; storage conditions; mould; water activity

Introduction

Consumers demand foodstuffs with superior quality or nutritional value as well as minimally processed food retaining the fresh products' features. Food products during storage are subject to changes, resulting in adverse effects on quality, ranging from minor sensory defects to total spoilage. The shelf life of food, defined as the period of time during which quality losses do not exceed a tolerated level, can be decisively influenced by its packaging (Pfeiffer et. al., 1999). Recently, in order to achieve longer shelf life for bakery products, refrigerating conditions are employed to prebaked or not doughs, as well as new technologies in packaging are investigated (Kotsianis et. al., 2002). Cakes and pastries provide a nutritious environment for microbial growth but probably show a greater diversity of moisture content, water activity (a_w) and pH than most other food groups (Voysey, 1999).

Material and Methods

Samples of pastries products called „Mrkvánky“ originated from producer and were packaged into special atmosphere. Samples were stored at refrigerator temperature (8 °C) and at room temperature (25 °C) during its shelf life (28 days). The samples were tested at the beginning, 9th, 14th, 21st and 28th day of storage. There were examined total plate count and moulds. The plate method on Plate count agar and DRBC agar were used according to ČSN EN ISO.

Results

From the first figure we can see that total plate count had decreasing trend both at 8 °C and 25 °C. The level of contamination at the beginning of our experiment was $\log 3,34 \text{ CFU.g}^{-1}$. There were lower counts of moulds during our experiment. The first day it was $\log 2,4 \text{ CFU.g}^{-1}$. From the day 14th there were detected any moulds in samples stored at 25 °C.

Figure 2 shows the water activity of the samples (dough and filling). The lowest a_w was at the beginning of our experiment 0,751 (dough). The first day was a_w of the filling 0,836. At the end of this experiment (28th day) was water activity of the dough between 0,753-0,792 and a_w of the filling 0,767-0,801.

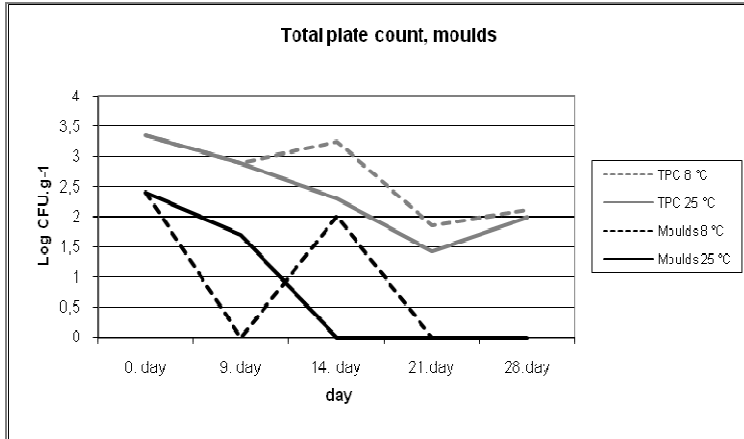


Figure 1: Total plate count and moulds during storage (28 days).

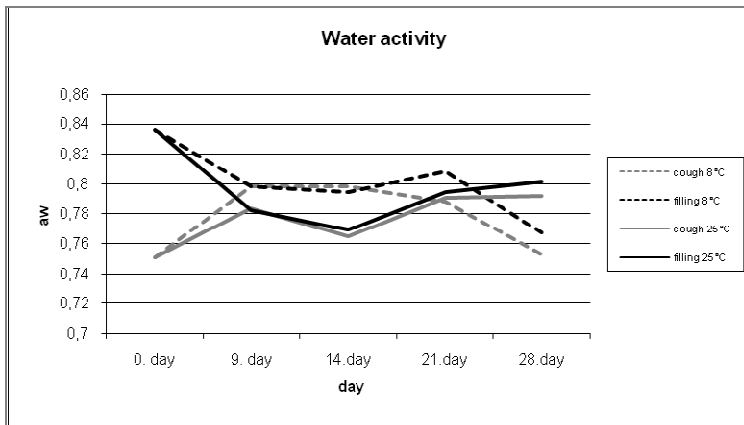


Figure 2: Water activity of dough and filling during storage (28 days).

Discussion

Many flour confectionery products are designed to be distributed, sold, stored and consumed at ambient temperatures. These are expected to have shelf lives of anything from a few days to several months and are generally very safe because their a_w is too low to support bacterial growth. In most flour confectionery products, the primary factor limiting shelf life is mould or yeast. The rate at which moulds and yeasts spoil flour confectionery is defined by the product a_w . Typically mould or yeast spoilage of flour confectionery can manifest itself in several ways, typical visible mould colonies are most often represented by moulds *Penicillium* or *Aspergillus*. Below a_w 0,6 no microbial growth occurs, thus dry ingredients (flour, sugar...) are not subject to microbiological spoilage. At a_w below 0,7 the range of microbes capable of growth is restricted and flour confectionery items can be considered to be safe, nevertheless, a few organisms can cause spoilage of e.g. fermentation of jam fillings caused by growth of the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* (min. a_w 0,65). As the a_w of products and ingredients increase, so does the range of microorganisms that are able to grow, until an a_w 0,95-0,99 almost all bacteria, yeast and moulds are able to proliferate. Temperatures also influence the rate of growth of microorganisms found in association with flour confectionery items (Voysey, 1999). Pitt and Miskam (1995) studied the colony growth

rates for *A. flavus* on malt extract media regulating a_w with glucose and fructose. They found that the minimum a_w for growth of *A. flavus* was 0.82 at 25 °C, 0.81 at 30 °C and 0.80 at 37 °C. The study of Abellana et. al. (2001) compared the effect of temperature and water activity and their interactions on the rate of mycelial growth of *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum* and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. They found the minimum a_w values for growth of the *Penicillium* spp. was 0.85–0.90. *A. flavus* was able to grow at 0.90 a_w when the temperature was above 15 °C. This study has shown that fungal growth by these species on a sponge cake analogue, with a composition similar to usual bakery products, is prevented if the a_w is kept at <0.85.

Conclusion

According to ČSN 56 9609 Good hygienic and manufacture practice – Microbial limits for foodstuff all samples were in accordance with microbial limits of this standard during the time of our experiment (28 days - shelf life). The limit for total plate count is 10^5 CFU.g⁻¹ and limit for moulds is 10^2 CFU.g⁻¹. Higher limit of Total plate count (TPC) stored at 8 °C was probably achieved because of higher humidity when storage at refrigerator temperatures. Temperature 25 °C during our experiment (28 days) seemed like appropriate storage temperature for this product.

Acknowledgments

This study was supported by project IGA VFU Brno IGA 16/2013/FVHE.

References

- ABELLANA, M.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 71, s. 151–157.
- KOTSIANIS, I.S.; GIANNOU, V.; TRIA, C. Production and packaging of bakery products using MAP technology. *Trends in Food Science & Technology*. 2002, vol. 13, s. 319–324.
- PFEIFFER, C.; D'AUJOURD'HUI, M.; WALTER, J.; NUESSELI, J.; ESCHER, F. Optimizing food packaging and shelf life. *Food Technology*. 1999, vol. 53, s. 52–58.
- PITT, J.I.; MISCAMBLE, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*. 1995, vol. 58, s. 86–90.
- VOYSEY, P.; LEGAN, J.D. Confectionery products-cakes and pastries. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1999, s. 474-480.

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

Optimalizace izolace bakteriální DNA z ovoce a zeleniny pomocí komerčních kitů

Optimization of bacterial DNA isolation from fruits and vegetables by means of commercial kits

Vojkovská Hana, Lorencová Alena, Králík Petr

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

Summary

Outbreaks of viral, bacterial and parasitic infections linked to the consumption of fresh fruits and vegetables are being reported with increasing frequency because of many different factors (unsatisfactory water sources, application of improperly composted manures, secondary contamination during handling of the products etc.). The detection of microorganisms by means of conventional culture methods is relatively time-consuming. The molecular methods such as real-time PCR may supplement or replace them. The effectiveness of real-time PCR is dependent upon the design of real-time systems and successful isolation of DNA. The objective of this study was to choose the most efficient kit for isolation of bacterial DNA from fruits and vegetables. Magnetic and column isolation kits were used. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) was used as a model microorganism due to its extremely robust cell wall. The quantification of bacterial cells was performed using real-time PCR. The PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit was the most efficient one for the isolation of bacterial DNA from fruits and vegetables.

Keywords: *fruits; vegetables; bacterial DNA isolation; Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis; food-borne infections*

Úvod

Spotřeba čerstvého ovoce a zeleniny v České republice vykazuje dlouhodobý nárůst, který také koreluje s vyšším počtem alimentárních onemocnění spojených s konzumací čerstvé zeleniny, v menší míře i ovoce. Tato situace je způsobena mnoha faktory, včetně nesprávné zemědělské a výrobní praxe, chování spotřebitelů a vlastností samotných mikroorganismů.

Pro detekci patogenních mikroorganismů jsou běžně užívány kultivační metody, jejichž hlavní nevýhodou je časová náročnost a nutnost typizace a charakterizace izolátů. Alternativou je jejich doplnění či nahrazení molekulárně-biologickými metodami.

Detekci patogenních mikroorganismů v potravinách molekulárně-biologickými metodami ztěžuje často nízký počet mikrobiálních buněk a jejich nerovnoměrná distribuce ve vzorku. Navíc potraviny představují velmi komplexní různorodou matici, která znesnadňuje separaci mikrobiálních buněk a obsahuje navíc řadu inhibičních látek. Je proto potřeba věnovat pozornost přípravě vzorku, izolaci nukleové kyseliny i vlastní detekci cílového mikroorganismu. Cílem práce bylo optimalizovat izolaci bakteriální DNA z ovoce a zeleniny prostřednictvím komerčního izolačního kitu, který by zajistil nejvyšší výtěžnost přítomné bakteriální DNA. Díky extrémní odolnosti buněčné stěny byl jako modelový mikroorganismus vybrán *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

Materiál a metody

Vzorky byly připravovány v triplikátech, kdy každý představoval 20 g předpřipravené zeleniny (směs salátu, mrkve a špenátu). Tyto vzorky byly rozděleny do 12 skupin dle kombinace izolační kit, vytřepávací roztok a množství vstupního počtu MAP (CFU). Vzorky zeleniny byly zaočkovány 100 μ l bakteriální suspenze MAP výchozí koncentrace asi $1 \cdot 10^8$ CFU/ml a $1 \cdot 10^7$ CFU/ml. Ke všem vzorkům bylo přidáno 40 ml vytřepávacího roztoku. V rámci studie byly porovnávány PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2) a TGBE (Tris Glycine Beef Extract, pH 9,5) s přidavkem detergentního činidla (0,05 % Tween 20). Po 15 min vytřepávání byl získaný supernatant centrifugován po dobu 15 min při 4 000 x g a 20 °C (Multifuge X3R, Thermo Scientific). Po odebrání supernatantu byly získané pelety přeneseny do mikrozkuhavek, centrifugovány po dobu 3 min při 14 100 x g (MiniSpin® plus, Eppendorf) a po odebrání zbylého supernatantu připraveny pro izolaci bakteriální DNA.

Pro izolaci byl vybrán kolonkový kit PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) a kity využívající principu magnetické separace Chemagic DNA Bacteria Kit (Perkin Elmer) a NucliSENS® miniMAG® (bioMérieux). Před samotou izolací byla provedena mechanická homogenizace buněk pomocí přístroje MagNA Lyser (Roche Applied Science) při 6 400 rpm po dobu 60 s.

Kvantifikace cílových kopií genomu MAP byla provedena pomocí systému kompetitivní duplex *F57* qPCR s vnitřní amplifikační kontrolou na přístroji LightCycler 480 II (Roche). Absolutní množství přítomných buněk MAP byla odvozena pomocí kalibrační křivky sestavené podle plazmidového gradientu. Pro jednotlivé triplikáty byla stanovena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Výsledky

Data dokumentující spolehlivost a účinnost izolace pomocí vybraných izolačních kitů jsou shrnuta v Tabulce č. 1.

Diskuze

Pro testování účinnosti izolace bakteriální DNA z rostlinné matrice byla zvolena metoda qPCR. Jako modelový mikroorganismus sloužilo MAP. Při porovnání účinností izolace bakteriální DNA ze zeleniny u tří různých kitů byla nejvyšší účinnost izolace dosažena použitím PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit. Avšak účinnost této izolace byla nízká, dosahovala většinou hodnoty pod 5 % v závislosti na vstupní koncentraci MAP a použitém vytřepávacím médiu. Na základě našich předchozích pokusů se lze domnívat, že k výrazným ztrátám docházelo během vytřepávání a při následné centrifugaci. V této práci dále nebyl pozorován rozdílný vliv vytřepávacích roztoků PBS a TGBE na účinnost izolace DNA.

Závěr

Z výsledků studie vyplývá, že PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit číselně vykazoval nejvyšší hodnoty účinnosti izolace bakteriální DNA z rostlinné matrice. Izolace pomocí tohoto kitu nebyla časově náročná a nekladla zvláštní nároky na manuální provedení. Pro další zvýšení účinnosti izolace bude třeba zaměřit se na snížení ztrát bakteriálních buněk během přípravy vzorků, zejména během vytřepávání a centrifugace. Použití kitu NucliSENS® miniMAG® bylo časově náročnější.

Pozorované inhibice u vzorků izolovaných pomocí kitu Chemagic DNA Bacteria Kit odrážejí skutečnost, že tento kit není primárně pro izolaci tohoto typu vzorků určen.

Tabulka 1: Hodnocení spolehlivosti a účinnosti izolace *MAP* ze zeleniny pomocí *F57* real-time kvantitativní PCR (qPCR) při použití tří izolačních kitů a dvou vytřepávacích roztoků.

Kit	Teoretické vstupní množství MAP		Výstupní množství MAP ^b		+/celkem ^c	Účinnost izolace DNA (%) ^d
	Průměr ^a	SD	Průměr ^a	SD		
NucliSENS - PBS			1,73·10 ⁷	5,82·10 ⁶	6/6	2,53
NucliSENS - TGBE			1,79·10 ⁷	3,59·10 ⁶	6/6	2,48
Chemagic - PBS			3,56·10 ⁷	2,69·10 ⁶	5/6	5,06
Chemagic - TGBE	3,31·10 ⁸	4,26·10 ⁵	6,93·10 ⁵	1,74·10 ⁵	3/6	0,05
PowerFood - PBS			1,92·10 ⁷	2,83·10 ⁶	6/6	2,92
PowerFood - TGBE			3,47·10 ⁷	1,84·10 ⁶	6/6	5,26
NucliSENS - PBS			1,53·10 ⁶	3,06·10 ⁵	6/6	2,89
NucliSENS - TGBE			1,43·10 ⁶	2,75·10 ⁵	6/6	2,69
Chemagic - PBS			1,06·10 ⁶	2,97·10 ⁵	6/6	2,41
Chemagic - TGBE	2,66·10 ⁷	1,28·10 ⁵	0	0	0/6	0
PowerFood - PBS			1,44·10 ⁶	3,33·10 ⁵	6/6	4,22
PowerFood - TGBE			1,55·10 ⁶	1,39·10 ⁵	6/6	4,53

^a Průměrná hodnota odpovídající absolutnímu množství buněk MAP v 1 g zeleniny

^b Počet buněk MAP získaných po izolaci pomocí qPCR, vytřepávací roztok PBS nebo TGBE

^c Počet pozitivních replikátů/celkový počet replikátů

^d Podíl průměrného experimentálního a teoretického výtěžku buněk MAP.

Poděkování

Práce vznikla z podpory grantů CZ.1.05/2.1.00/01.0006/ED 0006/01/01, MZe0002716202 a QJ1210114.

Literatura

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. 2002, vol. 4, no. 4, s. 413-423.

BREHM-STECHER, B.; YOUNG, CH.; JAYKUS, L. A.; TORTORELLO, M. L. Sample preparation: The forgotten beginning. *Journal of Food Protection*. 2009, vol. 72, no. 8, s. 1774-1789.

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.

Kontaktní adresa: Hana Vojkovská, Ing., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., odd. Bezpečnost potravin a krmiv, Hudcova 70, 621 00 Brno, vojkovska@vri.cz

Hygienické hodnocení klobásy se 45 % podílem masa kapra obecného Hygienic evaluation of sausages with 45 % meat from common carp

Kašpar Ladislav, Buchtová Hana

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

Summary

The aim of this work was the sensory evaluation and chemical analysis of shelf – life for sausages with 45 % meat from common carp (experimental samples). Sausages with 100 % pork meat was used as control samples. The results of sensory evaluation in experimental samples showing lower scoring for evaluated characters: overall appearance (16.2%), consistency (by 31.8%), juiciness (14.1%) and the appearance of the cut (by 25.0%) In basic chemical composition are apparent differences ($P < 0.05$) induced by higher content of qualitatively different type of muscle proteins (total, clean and pure muscle). Experimental samples also contained inconclusively more total fat, which is reflected in the increasing value of the energy contained per 100 g of this meat product. Conclusive dependence were found in the intensity of speed in primary and inconclusive dependence in secondary oxidation process, It was observed lower peroxide content and a higher malondialdehyde content in comparison with control samples.

Keywords: fish meat; carp; sausage; duality; lipid; protein

Úvod

Zvyšování obsahu zdraví prospěšných látek či používání netradičních surovin a snaha o originalitu při moderní produkci potravin otevírá dveře pro vznik nových rozličných druhů masných výrobků.

V posledních letech se rovněž rozšiřuje výroba tzv. funkčních potravin, které spotřebitelům nabízí vedle obecně přítomných nutričních složek i komponenty vyskytující se nad rámec běžného obsahu (Jimenez-Colmenero et al., 2006; Arihara 2006).

Jednou ze zmiňovaných inovací je přidavek rybího masa do masných výrobků. V ČR tyto výrobky v komerční síti doposud chybí, ale v přímořských oblastech s tradičně vysokou spotřebou rybího masa se objevují výrobky tohoto typu vyráběné z různých druhů ryb včetně rozdílného zastoupení jejich masa v surovině (De Oliveira Filho et al., 2010; Dincer and Cakli, 2010). V popředí bývají nejčastěji ekonomické aspekty vzniku a vývoje nových výrobků tohoto typu, s druhovými variacemi párků, klobás, karbanátků, i fermentovaných salámů. Hlavní výrobní surovinou bývá vepřové maso (ořez vzniklý při opracování větších celků), ale také maso skopové. Rybí surovina se do těchto výrobků dostává v podobě strojně odděleného masa, vzniklého při filetování, ale výjimku netvoří ani celé filety. Z druhového zastoupení ryb sladkovodních či mořských, od druhů v Evropě běžných (blíže nespecifikované treskovité, lososovité nebo tuňákovité ryby, štikozubec kapský *Merluccius capensis*, pstruh duhový *Onchorynchus mykiss*, pangas dolnooký *Pangasius hypophthalmus*, tilapie nilská *Oreochromis niloticus*, cípal hlavatý *Mugil cephalus*, kranas obecný *Trachurus trachurus*), Z kaprovitých ryb (*Cyprinidae*) jsou používány labeo avanské (*Labeo rohita*) nebo tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*). Ten sice je v ČR chován jako doplňkový druh (583 tun živ. hm.), nicméně není tak oblíbený jako kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.), který je u nás nejvíce konzumovanou rybou. Roční produkce

kapra (17 746 tun živ. hm.) v ČR činí více než 85% z celkové produkce sladkovodních ryb chovem (rok 2010: 20 420 tun živ. hm.) (Anonym, 2011).

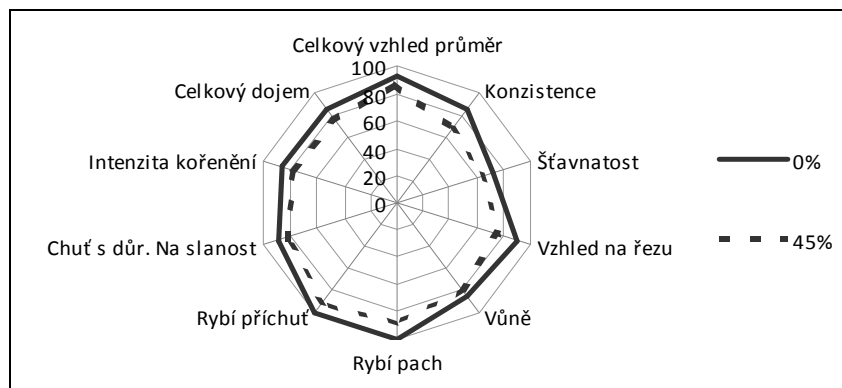
Materiál a metodika

Výroba experimentálních klobás byla prováděna v Technologické dílně na Ústavu hygieny a technologie masa FVHE VFU Brno běžným technologickým postupem (příprava suroviny, solení, mletí, míchání, narážení, tepelné opracování minimálně 70°C/10 min, uzení a chlazení). K výrobě byly použity kapří filety, ze kterých byly ručně vyjmuty všechny kosti. Jako kontrola sloužil vzorek vyrobený pouze z vepřového masa (plec a hřbetní špek). Z pomocných surovin byla použita dusitanová solící směs E 250, česnek a kořenící směs: SCZA 04006 Klobása Franta Excelent sólo v dávkování 5g/kg. Aplikován byl rovněž antioxidant E 315. Jako technologický obal byla použita vepřová tenká střeva. Celkem bylo vyrobeno 5 šarží klobás, které byly sensoricky hodnoceny vždy druhý den po výrobě. Sensorické hodnocení prováděli zaměstnanci, případně studenti postgraduálního studijního programu Hygiene a technologie potravin FVHE VFU Brno. Hodnocení probíhalo v sensorické laboratoři, která svým prostředím a vybavením odpovídá požadavkům normy ČSN ISO 8589. Výrobky byly hodnotitelům předkládány za studena (max +4 °C), ohřáté ve vodě (90 °C/15 min) a grilované (200 °C/15 min).

Při vlastním sensorickém hodnocení byl použit protokol s nestrukturovanými grafickými stupnicemi o délce 100 mm, kdy jeden okraj stupnice představoval plně vyhovující stav příslušného parametru a druhý okraj zcela nevyhovující stav daného parametru. Hodnotitelé posuzovali tyto parametry: celkový vzhled, konzistence, šťavnatost, vzhled na řezu, vůně, rybí pach* a příchutě*, chuť s důrazem na slanost, intenzita kořenění a celkový dojem. *U rybího pachu a příchutě byl kladen důraz na přijatelnost těchto vjemů.

Sledovány byly parametry chemického složení (obsah sušiny/vody, celkové, čisté a čisté svalové bílkoviny, tuku, popelovin) a údržnosti (amoniak, číslo kyselosti, peroxidové číslo, obsah malondialdehydu). Výsledky byly statisticky zhodnoceny (průměr ± s.d.) a stanoveny rozdíly hodnot parametrů (ANOVA, Excel 2007) na hladinách významnosti $\alpha=0.05$, $\alpha=0.01$.

Výsledky



Graf 1: Výsledky sensorického hodnocení klobás podávaných za studena (max.+4 °C).

Hodnoty u experimentálních vzorků vyrobených s přidavkem 45% rybího podílu ovlivňovaly předpokládané odlišné technologické vlastnosti. Ve sledovaném znaku (celkový vzhled) byly kontrolní vzorky hodnoceny (ze 100 max. možných bodů) 93,25 body, zatímco klobásy s 45% 86,5 body (Graf 1). Jinak tomu bylo ve studii De Oliveira Filho et al. (2010), kde v článku autoři uvádějí, že nejvhodnějším podílem rybí suroviny do klobás s přidavkem rybího masa z hlediska celkové senzorycké přijatelnosti spotřebitelů je 60 %.

Tabulka 1: Chemické složení (průměr ± sem) kontroly a klobás se 45% podílem masa z filetu kapra obecného (*Cyprinus Carpio* L.).

Parametr	Kontrola	Experimentální vzorky klobás s podílem kapra	Statistická významnost
	podíl 0 %	podíl 45 %	
Energetická hod. kJ/100 g	662 ± 22.01	683 ± 22.02	p > 0.05
Celková bílkovina g.kg ⁻¹	177.69 ± 2.32 ^a	183.79 ± 3.01 ^b	p < 0.05
Čistá bílkovina g.kg ⁻¹	157.61 ± 2.68 ^a	166.84 ± 3.20 ^b	p < 0.05
Čistá sval. bílkovina g.kg ⁻¹	148.38 ± 3.40 ^a	161.00 ± 3.67 ^b	p < 0.05
Celkový tuk g.kg ⁻¹	82.61 ± 8.51	93.18 ± 9.78	p > 0.05
NaCl g.kg ⁻¹	15,6 ± 0,48	15,4 ± 0,40	p > 0.05
Vlhkost	682,95 ± 1,31	684,65 ± 0,81	p > 0.05
Kolagen g.kg ⁻¹	7,15 ± 0,41	6,95 ± 0,36	p > 0.05
Sacharidy g.kg ⁻¹	31,75 ± 2,30	15,35 ± 2,15	p > 0.05
Popelovina g.kg ⁻¹	24,95 ± 0,13	2,3 ± 0,35	p > 0.05
Peroxidy mekvO ₂ /kg ⁻¹	5,27 ± 0,96 ^a	4,3 ± 0,92 ^b	p < 0.05
Malondialdehyd mg.kg ⁻¹	4,99 ± 1,08	5,47 ± 1,36	p > 0.05
Volné mastné kyseliny *	1,31 ± 0,31	1,13 ± 0,28	p > 0.05
Amoniak mg/100g	14,62 ± 2,88	13,95 ± 2,94	p > 0.05

*%celkového tuku jako kyselina olejová

Chemické složení klobás s různým podílem masa z filetu kapra bylo prakticky stejné jako u kontrolních vzorků vyrobených pouze z vepřového masa (Tabulka 1). Výjimkou byl obsah všech tří kvalitativně rozdílných typů bílkovin (celková, čistá a čistá svalová), kdy jsme zjistili průkazné rozdíly ($P < 0.05$) mezi obsahem těchto parametrů u kontrolních vzorků a vzorků klobás s 45% podílem kapřího masa. S rostoucím podílem rybí suroviny v díle se obsah bílkovin ve finálních výrobcích zvyšoval. K podobnému zjištění došli autoři Egbal and Ghada (2011) a také Berik and Kahraman (2010). Obdobný nicméně statisticky neprůkazný trend jako u bílkovin jsme prokázali u parametrů, jakými byl obsah tuku a energet. hodnota.

Závěr

Použití rybí suroviny, která nese odlišné technologické vlastnosti od masa vepřového, s sebou přineslo úskalí, jež se projevilo na senzoryckém hodnocení. I přes vzájemnou kombinaci s vepřovým masem byla změněna struktura výrobku především v parametru vzhledu na řezu a konzistenci. Snaha ve zlepšení těchto vlastností se v možném vývoji těchto výrobků může odvíjet od použití pomocných látek jako je např. transglutamináza, nebo obměnit vlastnosti díla na zcela homogenní profil i typ klobásového výrobku na typ párků. Pomocí chemických analýz byly získány hodnoty, které vyjadřují rozdílné

hodnoty u klobás s různým podílem v zastoupení rybí suroviny. Z výsledků vyplývá, že přídavek kapřího masa o množství 45% se projevil zvýšením obsahu všech tří kvalitativně rozdílných typů bílkovin v základním chemickém složení oproti kontrole následovně. Celková bílkovina byla vyšší o 3,43%; čistá bílkovina o 5,85%; čistá svalová bílkovina o 8,50%, obsah tuku vzrostl o 12,79% a energetická hodnota vzrostla o 3,17%.

Poděkování

Studie byla podpořena projektem Interní grantové agentury IGA VFU Brno 3/2012/ FVHE.

Literatura

K dispozici u autorů.

Kontaktní adresa: Ladislav Kašpar, MVDr., Ústav hygieny a technologie masa, FVHE VFU Brno, Palackého tř.1/3, 612 42 Brno, H11016@vfu.cz

Wild game meat as a source of human exposure to lead

¹Drápal Jiří, ²Ruprich Jiří, ³Šťastný Kamil

¹Central State Veterinary Administration of the State Veterinary Administration, Prague

²University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

³Veterinary Research Institute, Brno

Summary

Lead (Pb) is commonly found in food and is characterised as a contaminant. Although the concentration of Pb in the environment was significantly reduced as a consequence of the elimination of leaded petrol and of other measures adopted in recent decades, one of the unregulated sources of Pb in game meat still remains due to the contamination with Pb ammunition. Wild game meat can be one of the dominant sources of human exposure to Pb especially for high consumers of venison. During the years 2009-2011, the mean Pb content detected in the Czech Republic in meat of game mammals was of 3.80 mg.kg⁻¹ (median 0.01 mg.kg⁻¹) and in meat of game birds of 0.63 mg.kg⁻¹ (median 0.03 mg.kg⁻¹).

Keywords: wild game meat; lead; exposure of humans

Introduction

Lead (Pb) is a natural environmental contaminant but its ubiquitous occurrence is the result of anthropogenic activities like the use in the past of lead in water pipes, paints and petrol. Legislative control measures have been taken to remove Pb from paints, petrol, food cans and water pipes in Europe since the 1970s (EFSA, 2012). Food is the major source of human exposure to Pb. Lead accumulates in body and most seriously affects the developing central nervous system of young children. Maternal transfer of Pb occurs through the placenta and subsequently during breast feeding. Half-life for inorganic Pb in blood is of approx. 30 days and for bone, it is between 10 and 30 years. Due to its long half-life in body, chronic toxicity of Pb is of most concern when considering the potential risk to human health. There is no evidence of thresholds for a number of critical health effects. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified inorganic Pb as probably carcinogenic to humans (Group 2A) in 2006 (EFSA, 2012). In 1990, the European Commission's Scientific Committee for Food (SCF) endorsed the 1986 JECFA PTWI of 0.025 mg.kg⁻¹ b.w. per week for infants and children. In 1993, the JECFA re-confirmed the PTWI for infants and children and extended it to the overall population irrespective of the age group. CONTAM Panel EFSA stated in 2010 that established PTWI level was no longer adequate for the assessment of dietary exposure to Pb, since no evidence was available on the existence of a threshold dose for a number of health effects of Pb (Ruprich, J. et al, 2011). Regulation (EC) No 1881/2006 establishes the maximum limit (ML) for Pb content in meat (excluding offal) of bovine animals, sheep, porcine animals and poultry – 0.1 mg.kg⁻¹ wet weight; no explicit limit is established for game meat. In spite of that, it is necessary to evaluate the content of Pb in game meat from the viewpoint of consumer protection.

The aim of this paper is to evaluate the content of Pb in meat of basic species of game animals in the territory of the Czech Republic (CZ), warn about one potentially important source of the exposure to Pb and, at the same time, draw up measures for the reduction of the exposure to Pb from game meat within risk management.

Material and Methods

Game meat samples were taken by veterinary inspectors on a random basis within the National monitoring of residues and contaminants pursuant to Council Directive 96/23/EC in years 2009 – 2011. Homogenised samples were analysed for the content of Pb after previous pressure microwave digestion with concentrated nitric acid using AAS method or ICP/MS method, both methods: LOQ - 0.01 mg.kg⁻¹. Samples were grouped according to the FoodEx ver. 1 (EFSA, 2010a). The results obtained in this way correspond to one-dimensional random selections and were assessed using basic statistical analysis for easy mutual comparison.

Results and Discussion

The contents of Pb in game meat were considerably dispersed around mean and median. The levels of means, 95th percentiles (P95) and standard deviations (SD) indicate considerably asymmetric distribution and variability of detected levels. Statistic estimations of these parameters are given in Table 1.

Table 1: The number of game meat samples analysed for Pb content in the Czech Republic in years 2009 - 2011 (Pb mg.kg⁻¹). FoodEx1 level 2 (grey) and 3 (white).

Species of game	N	<= LOQ (%)	Mean	Median	Max.	P5	P95	SD
Deer	57	57.9	2.040	0.010	54.800	0.010	7.573	9.926
Mouflon	5	20.0	0.053	0.015	0.190	0.010	0.190	0.077
Roe deer	36	44.4	15.756	0.016	514.000	0,010	48.000	85.785
Wild boar	84	54.8	1.038	0.010	22.200	0.010	4.670	3.739
Hare	21	66.7	0.017	0.010	0.080	0.010	0.050	0.017
Game mammals	203	48.8	3.800	0.010	514.000	0.010	4.440	36.599
Pheasant	65	44.6	0.708	0.017	14.600	0.010	3.040	2.298
Wild duck	60	21.7	0.546	0.067	9.890	0.010	2.280	1.442
Game birds	125	33.1	0.625	0.030	14.600	0.010	2.850	1.922
All GAME	328	41.0	2.584	0.015	514.000	0.010	4.060	28.788

N: number of samples; LOQ: limit of quantification; P5: 5th percentile; P95: 95th percentile; Max: maximum level; SD: standard deviation

In compliance with the findings of the National Institute of Public Health (SZÚ Brno, 2010), the mean values do not represent the “standard” content of Pb in analysed samples and in consumed game meat. So, it cannot be expected that the Pb content in game meat not contaminated with ammunition would exceed the level of ML (i.e. 0.1 mg.kg⁻¹) established for meat of other food animal species. This assumption is supported by median levels which are by order lower than ML for Pb, as well as a relatively high number of results falling under the LOQ. On the other hand, the levels of maximum Pb content in samples indicate an additional contamination probably connected with ammunition, not with a natural contamination *via* feed chain. Such

a wide range of Pb content in game meat samples can be caused by an uneven distribution of Pb matter in tissues of shot animals or by the presence/absence of ammunition fragments in analysed samples. The presence of such “irremovable” minute ammunition fragments is the reason of a high Pb content in edible tissues of game animals which – from the consumer’s viewpoint – presents certain risk of a high Pb intake in high consumers of game meat or in children. Our results are comparable with the results retrieved from 14 EU Member States (including CZ) and Norway for years 2003 – 2009 and analysed by the EFSA from the viewpoint of Pb content in food and exposure to Pb from food. 2 521 game meat samples in total were analysed within the study and the mean Pb concentration in meat of all game animals was of 3.153 mg.kg⁻¹, the maximum Pb content was of 867.0 mg.kg⁻¹ and median was of 0.0200 mg.kg⁻¹ (EFSA, 2010b). Our assessment showed a little lower total mean Pb concentration, i.e. Pb 2.584 mg.kg⁻¹, the maximum level of 514.000 mg.kg⁻¹ and median of 0.015 mg.kg⁻¹.

Conclusion

At the assessment of the fitness of game meat placed on the market for human consumption, it seems appropriate to use – with respect to Pb content – the limit of 0.1 mg.kg⁻¹ established in Regulation (EC) No 1881/2006 for meat of other food animal species. High levels of Pb are most probably not caused by the contamination from feed chain but by the contamination with lead containing ammunition. So it is necessary to pay a consistent attention to the removal of tissues visibly damaged by ammunition and thus reduce the total Pb intake from consumed game meat. Furthermore, it seems appropriate to establish – within the relevant legislation rules – an obligatory seizure of tissues visibly damaged by ammunition.

References

- COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance) *OJ L 364*, 20.12.2006, p. 5–24
- COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, *OJ L 125*, 23.5.1996, p. 10–32
- EFSA, 2012; Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 2012; 10(7):2831. [59 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2831. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- EFSA, 2010a. Standard sample description for food and feed. *EFSA Journal* 2010; 8(1):1457 [54 pp.]. Available at: www.efsa.europa.eu/en/datexdata/docs/StandardSampleDescription.xls
- EFSA, 2010b. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1570. [147 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1570. Available online: www.efsa.europa.eu
- RUPRICH, J. ET AL: IV Dietární expozice člověka: CHEMON, SZÚ, 2011
- SZÚ BRNO, 2010; Hodnocení zdravotního rizika: Olovo v mase zvěřiny a ve výrobcích ze zvěřiny, SZÚ v Brně, 12/2010

Contact address: Jiří Drápal, MVDr., Central Veterinary Administration of the State Veterinary Administration, Slezská 7/100, 120 56 Prague, The Czech Republic, j.drupal@svscr.cz

Sledovanie koncentrácie kyseliny mliečnej a hodnoty pH počas zrecieho procesu mäsa prepelíc

Monitoring of lactic acid concentration and the level of pH during the ripening process in quail's meat

Brenesselová Martina, Koréneková Beáta, Mačanga Ján, Toropilová Júlia

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

Summary

The aim of our study was to monitoring of lactic acid concentration and the level of pH during the ripening process in quail's meat. The quails were divided into 3 groups of 10 quails. The first group contained 10 quails which were dissected. We subsequently took samples of breast and thigh muscles for our analysis. The second and third groups of quails were stored at 4^oC in a refrigerator and were analysed on 7th day and on 14th of experiment. We found out statistically significant decreased of lactic acid in the thigh muscle on 14th day compared with 1st day and statistically significant increased level of lactic acid on the 7th day compared with 14th day. The average level of pH in breast muscles statistically significant decreased on 7th day compared with 14th day and the average level of pH in thigh muscles statistically significant increased compared with 7th day of experiment.

Keywords: quails; meat; ripening process; lactic acid; pH

Úvod

Prepelica japonská (*Coturnix Japonica*) z pohľadu konzumenta, je v súčasnej dobe atraktívnou delikatesou v rôznych krajinách sveta hlavne pre jej vysokú nutričnú, chuťovú ale aj estetickú hodnotu. Mäso prepelice japonskej má vysokú hodnotu hlavne preto, že má nízky obsah tuku (Lagin, 2008). Po zabití zvierat'a dochádza k celému radu rozkladných biochemických procesov tzv. postmortálnych zmien. Tieto procesy prispievajú k tomu, že sa svalové tkanivo mení na mäso – zrecí proces. Priebeh týchto zmien ovplyvňuje výslednú kvalitu mäsa (Gál, 2004). Počas zrecieho procesu dochádza ku zmene mäsa z pohľadu fyzikálno – chemických, senzorických a kulinárskych vlastností. Pôsobením natívnych proteolytických enzýmov dochádza ku fragmentácii myofibríl a ku uvoľňovaniu *rigor mortis*. Postupným rozkladom kyseliny mliečnej dochádza ku zvyšovaniu pH. Disociuje sa aktín – myozínový komplex a mäso zostáva krehkejšie. Zvyšuje sa väznosť vody a výrazne sa zlepšujú senzorické vlastnosti mäsa (Lagin a kol., 2008). Zrenie mäsa predstavuje stupeň autolytických procesov degradácie energetických zložiek tkaniva a to hlavne glykogénu a adenoíntrifosfátu. Pri rozklade glykogénu v tkanive zabitých zvierat sa v anaeróbnom prostredí glykogén degraduje na kyselinu mliečnu a adenoíntrifosfát sa rozkladá na kyselinu fosforečnú (Winkelmayer, 2005). Doba zrenia je ovplyvnená druhom zvierat'a a teplotou, pri ktorej je mäso skladované (Sopková, 2002). Cieľom našej práce bolo sledovať koncentráciu kyseliny mliečnej a hodnoty pH počas zrecieho procesu v mäse prepelíc japonských.

Materiál a metódy

Do experimentu bolo zaradených 30 kusov prepelíc japonských (*Coturnix Japonica*) nosivého typu, vo veku 6 mesiacov. Prepelice boli rozdelené do 3. skupín po 10 kusov a pochádzali z farmového chovu v Rozhanovciach (UVLF). Prepelice boli omráčené a

usmrtené vykrvením. Následne boli do 30 minút dovezené na Ústav hygieny a technológie mäsa UVLF, kde boli najskôr vpitvané.

Prvú skupinu tvorilo prvých desať kusov, z ktorých boli odobraté vzorky prsnej a stehennej svaloviny, ktoré boli použité na analýzu. Zvyšných 20 kusov bolo uskladnených pri 4 °C v chladničke a boli analyzované na 7. deň (2. skupina) a 14. deň (3. skupina) experimentu.

Na analýzu bol použitý vodný výluh zo svalovín, kde sme získali sledované analyty. Stanovili sme pH mäsa (pH-meter – InoLab WTW 720) a Elektroforetickým analyzátorom EA102 (Villa Labeco, SR) s vodivostným detektorom sme stanovili hodnoty kyseliny mliečnej. Ako vodiaci elektrolyt bol použitý roztok 10 mM HCL, β -alanín a 0,1% mHEC a ako zakončujúci elektrolyt roztok 5 mM kyselina kaprónová a 5 mM TRIS. Výsledky z elektroforetického analyzátoru boli vyhodnotené v programe ITPPro 32 a následne štatisticky analyzované v programe Microsoft Excel 2007 pomocou Studentovho *t*-testu.

Výsledky a diskusia

V prsnej svalovine neboli zaznamenané štatisticky významné hodnoty kyseliny mliečnej. Na 14. deň sme pozorovali pokles kyseliny mliečnej oproti 7. dňu. Kyselina mliečna dosahovala najvyššie hodnoty na 7. deň pokusu (tab.1).

V stehennej svalovine sme zaznamenali na 14. deň pokusu štatisticky významne nižšie hladiny ($p \leq 0,01$) kyseliny mliečnej ($0,707 \pm 0,158$) oproti 1. dňu pokusu a na 7. deň štatisticky významný vzostup hladiny ($p \leq 0,001$) kyseliny mliečnej ($1,001 \pm 0,078$) oproti 14. dňu (tab.1).

Tabuľka 1: Hodnoty kyseliny mliečnej na 1., 7., 14. deň zrecieho procesu v prsnej a stehennej svalovine u prepelíc japonských.

Svalovina	1. deň	7. deň	14. deň
	kys. mliečna	kys. mliečna	kys. mliečna
X (prsia)	1,505	1,673	1,532
Sd (prsia)	0,224	0,227	0,276
X (stehno)	0,916	1,001***	0,707**
Sd (stehno)	0,160	0,078	0,158

** zaznamenaná štatistická významnosť na hladine $p \leq 0,01$

*** zaznamenaná štatistická významnosť na hladine $p \leq 0,001$

Tabuľka 2: Hodnota pH na 1., 7., a 14. deň zrecieho procesu v prsnej a stehennej svalovine u prepelíc japonských.

Svalovina	1. deň	7. deň	14. deň
	pH	pH	pH
X (prsia)	6,034	5,934*	6,064
Sd (prsia)	0,118	0,167	0,103
X (stehno)	7,014***	6,653	6,850
Sd (stehno)	0,075	0,133	0,274

* zaznamenaná štatistická významnosť na hladine $p \leq 0,05$

*** zaznamenaná štatistická významnosť na hladine $p \leq 0,001$

Priemerná hodnota pH v prsnej svalovine štatisticky významne klesla ($p \leq 0,05$) na 7. deň pokusu ($5,934 \pm 0,167$) oproti 14. dňu a priemerná hodnota pH v stehennej svalovine bola na 1. deň pokusu ($7,014 \pm 0,075$) štatisticky významne vyššia ($p \leq 0,010$) oproti 7. dňu (tab. 2).

Dynamika hodnôt pH, u ktorej najvýraznejší pokles sme zaznamenali na 7. deň pokusu, bola zapríčinená zvýšením hladiny kyseliny mliečnej. V procese premeny svaloviny na mäso prebieha anaeróbna glykolýza a glykogén je degradovaný na kyselinu mliečnu. Výrazný pokles hodnôt pH v svalovine je spôsobený vzostupom hladiny kyseliny mliečnej v procese zrenia (Stringer a Dennis, 2000).

Záver

Vyššie hodnoty kyseliny mliečnej sme zaznamenali počas pokusu v prsnej svalovine než v svalovine stehennej. Hladina pH zrkadlovito odrážala nárast a následný pokles množstva kyseliny mliečnej. Hladina kyseliny mliečnej stúpala a maximálna dosiahnutá hodnota bola na 7. deň experimentu.

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 původu*, 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, 200 s.

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

Detection of allergenic parvalbumin of Atlantic mackerel in fish products by real-time PCR

^{1,2}Kostelníková Darina, ^{1,2}Renčová Eva, ²Tremlová Bohuslava

¹Veterinary Research Institute, Brno

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

Summary

The objective of this study was to develop a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method to detect the major allergenic protein parvalbumin beta of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). The specific primers and probe were designed. The specificity of the method was tested using 16 various fish species. Thirty-one commercial fish products were investigated. This method with a sensitivity of 10 pg/μl allows the detection of allergenic parvalbumin even in heat-processed fish products.

Keywords: *Scomber scombrus*; fish allergens; fish food; DNA; analytical method

Introduction

Food allergies can cause a life-threatening reactions and greatly influence quality of life (Kattan and Wang, 2013). Fish allergy affects approximately 0.4% of the population (Sicherer et al., 2004) and major fish allergen parvalbumin is found at high levels in the muscle of fish and amphibians (Kretsinger and Nockolds, 1973).

The most common methods for detecting allergens in fish are enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and PCR technologies. Genetic technologies based on DNA analysis present advantages such as that the DNA molecules are more thermostable than the proteins, allowing analysis of the highly processed products. In addition, these techniques are faster and allow the detection of very small quantities. Shibahara et al. (2013) developed sandwich ELISA for the determination of Pacific mackerel parvalbumin in processed foods, whereas Choi and Hong (2007) reported on the possibility of the quick detection of parvalbumin allergen of Pacific mackerel (*Scomber japonicus*) in food by conventional PCR.

The objective of our study was to develop a quick and sensitive real-time PCR method to detect the main allergen parvalbumin of Atlantic mackerel in fish food to be in full compliance with food labeling regulations and ensure consumer protection.

Materials and Methods

DNA isolation from the fish and fish products meat (muscles) was performed using commercial DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufactures instructions. For the detection of Atlantic mackerel parvalbumin one set of primers and probe amplifying partial sequences of gene encoding parvalbumin beta protein were designed (GenBank accession number FN544077). A SimpleProbe (TibMolBiol GmbH, Berlin, Germany) was used inside the fragment of 113 bp. The amplification of the parvalbumin of Atlantic mackerel DNA samples were carried out in a final volume of 10 μL in a reaction mixture containing 5 μL of QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 1 μL of solution of primers and probe, 2 μL of water and 2 μL of sample. The final concentration of the solution of each primer was

0.5 μM and probe was 0.1 μM . To control the efficiency of the DNA isolation a primer pair for universal detection of the DNA *18S rRNA* gene for eucaryotes of 141 bp (Fajardo et al. 2008) and probe no. 66 (Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) were used with the following program: initial activation at 50 °C for 2 min and initial heat activation at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 60 s.

The specificity of the assay was tested using 16 different species of fish (*Oncorhynchus gorbuscha*, *Mullus surmuletus*, *Sparus aurata*, *Oreochromis niloticus*, *Thunnus albacares*, *Thunnus thynnus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus obesus*, *Katsuwonus pelamis*, *Gadus morhua*, *Merluccius merluccius*, *Micromesistius poutassou*, *Theragra chalcogramma*, *Euthynnus affinis*, *Auxis rochei*, *Platichthys flesus*).

Results and Discussion

In this study, a specific real-time PCR method for the detection of partial sequence of *Parvalbumin beta* gene of Atlantic mackerel was developed. While testing the specificity of the assay no cross reactions with other 16 fish species were detected (C_t values were ≥ 35). A serial dilution of DNA of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) was performed with RNase-free water in levels ranging from 10 ng/ μl to 10 pg/ μl . All measurements were performed in duplicates. The detection limit was 10 pg/ μl . with C_t value of 32,71. All measured samples that showed C_t value lower than 32,7 were considered as positive. This real-time PCR assay was applied to the analysis of first 31 commercial fish products from the retail market with the declaration of Atlantic mackerel (Table 1).

Table 1: Examined fish food products with Atlantic mackerel declaration.

1. Smoked mackerel	12. Mackerel in tomato juice	23. Smoked mackerel
2. Mackerel salad picnic	13. Mackerel fillets in oil	24. Mackerel in oil
3. Mackerel salad provencale	14. Mackerel in tomato sauce	25. Mackerel in own juice with oil
4. Mackerel fillets in tomato sauce	15. Smoked mackerel fillets in oil	26. Mackerel fillets with pepper
5. Mackerel fillets in oil	16. Mackerel fillets in oil with tabasco	27. Mackerel fillets in oil with Tabasco
6. Mackerel fillets in oil	17. Mackerel fillets in olive oil	28. Smoked mackerel fillets in oil
7. Mackerel smoked fillets in oil	18. Mackerel fillets Salamina in oil and tomato	29. Eviscerated mackerel
8. Mackerel in own juice	19. Mackerel in own juice with oil	30. Eviscerated mackerel
9. Mackerel salad piquant	20. Mackerel fillets on oil	31. Atlantic mackerel
10. Mackerel in own juice with oil	21. Mackerel fillets in tomato sauce	
11. Mackerel in tomato sauce	22. Smoked mackerel	

Atlantic mackerel parvalbumin was confirmed in 15 samples, C_t values were between 19,1 to 32,7. Herrero et al., (2012) estimated the presence of crustacean in processed products such as canned or pickled products spiked with crustacean cooking water, this

C_t values were between 28 and 34, but always <35 . This quite high C_t values can be caused by the thermal treatment and low pH of fish canned products. Also the presence of food additives used as spices and sauces often inhibits the DNA amplification (Espineira et al., 2009). In the rest sixteen fish products the parvalbumin was not confirmed. However on closer scan of tins, six of them were labeled with different fish species (Pacific mackerel, Sardinella, Trachurus spp.). Therefore accurate labelling is required to enable the allergic consumer to prevent the health difficulties of fish food products. Ten canned products with C_t value higher than 32,7 could contain different fish species or due to the food processing DNA could be degraded and affect nucleic acid-based analysis of the analytes. In all samples the detection of the eucaryotic DNA gene *18S rRNA* (Fajardo et al. 2008) as the amplification control with the product size of 141 bp was confirmed. Obtained C_t values were between 12,3 to 24.

Conclusion

This real-time PCR method can be used as fast, simple procedure for the detection of major allergen-parvalbumin of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). Our first results presented here demonstrates the applicability of the method.

Acknowledgements

This research was financially supported from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant MZe 00027 16202).

References

- HERRERO, B.; VIEITES, J.M.; ESPINEIRA, M. Fast Real-time PCR for the Detection of Crustacean Allergen in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, vol. 60, no. 8, s. 1893-1897.
- CHOI, K.Y.; HONG, K.W. Genomic DNA Sequence of mackerel parvalbumin and PCR test for rapid detection of allergenic mackerel ingredients in food. *Food Science and Biotechnology*. 2007, vol. , no. 1,s. 67-70.
- ESPINEIRA, M.; VIEITES, J.M.; SANTA CLARA, F.J. Development of a genetic method for the identification of salmon, trout and bream in seafood products by means of PCR-RFLP and FINS methodologies. *Journal of Food Chemistry*. 2009, vol. 229, no. 5, s. 785-793.
- FAJARDO, V., GONZALES, I., MARTIN, I., ROJAS, M., HERNANDEZ, P. E., GARCIA, T., MARTIN, R. Real-time PCR for quantitative detection of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) and Pyrenean Ibex (*Capra pyrenayca*) in meat mixtures. *Journal of AOAC International*, 2008, vol. 91, no. 1, s. 103-111.
- KATTAN, J.D.; WANG, J. Allergen Component Testing for Food Allergy: Ready for Prime Time? Current allergy and asthma reports. 2013, vol 13, no. 1, s. 58-63.
- KRETSINGER, R.H.; NOCKOLDS, C.E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *Journal of Biological Chemistry*. 1973, vol. 248, no. 9, s. 3313-3326.
- SHIBAHARA, Y.; UESAKA, Y.; WANG, J.; YAMADA, S.; SHIOMI, K. A sensitive enzyme-linked immunosorbent for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chemistry*. 2013, vol. 136, no. 2, s. 675-681.
- SICHERERER, S.H.; MUNOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H.A. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004, vol. 114, no. 1, s. 159-165.

Contact address: Darina Kostelníková, Mgr., Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, kostelnikova@vri.cz

Senzorická analýza, kvalita a bezpečnosť jogurtov vyrobených v laboratórnych podmienkach

Sensory analysis of quality and safety of yoghurt produced in laboratory conditions

Gallo Juraj, Vrabec Marek, Klapáčová Lýdia, Dudriková Eva

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Summary

The aim of our study was the physicochemical and microbiological analysis of cow and goat milk as an input stuff for the process of production of yoghurt under laboratory conditions. Through the subsequent sensorial comparison with yoghurt purchased from a supermarket, we came to the conclusion, that there were more differences in the attributes of sensorial profile. The results of milk microbiological analysis have demonstrated that both the milk and yoghurt were safe and had a sufficient concentration of the lactose-fermenting microorganisms as natural antagonists of undesirable microorganisms.

Keywords: *yoghurt; sensory analysis; physicochemical parameter*

Úvod

Z pomedzi všetkých druhov kyslomliečnych produktov sú jogurty jedny z najobľúbenejších a najvyhľadávanejších mliečnych potravín. Sú spotrebiteľmi vyhľadávané kvôli vysokej nutričnej hodnote, dietetickým vlastnostiam a senzorickej príťažlivosti (Eissa a kol., 2010; Haenlein, 2003; Jaworská a kol., 2005;). Jogurty vznikajú symbiotickou činnosťou mliekarenských kultúr *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Enzymatickou činnosťou týchto špecifických mikroorganizmov dochádza k fermentácii laktózy na kyselinu mliečnu, čím dochádza k miernemu okysleniu výrobku, čo má význam z hľadiska zvýšenia vstrebateľnosti vápnika a jeho následného využitia v organizme.

Cieľom našej práce bola výroba jogurtov z kozieho a kravského mlieka pochádzajúceho z registrovaných fariem, následné mikrobiologické vyšetrenie, fyzikálno-chemické vyšetrenie a senzorické posúdenie jogurtov študentmi a zamestnancami Ústavu hygieny a technológie mlieka v UVLF v Košiciach.

Materiál a metodika

V laboratórnych podmienkach pracoviska Ústavu hygieny a technológie mlieka UVLF v Košiciach boli podľa nami zvoleného postupu (pasterizácia 85°C/10min, ochladenie na 44°C, prídavok 24h jogurtového zákvasu vyrobeného z jogurtovej kultúry: Sacco ST430, plnenie, inkubácia, chladenie) vyrobené 2 druhy jogurtov. Hodnoty použitého kozieho mlieka sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Charakteristika použitého kozieho, kravského mlieka.

	Obsah sušiny %	Obsah bielkovín %	Obsah tuku %	Obsah laktózy %	Hustota g/cm ³	pH	Titračná kyslosť °SH
Kravské mlieko	14,22	3,50	4,90	5,14	1,030	6,70	8,00
Kozie mlieko	12,18	3,96	2,32	5,90	1,038	6,88	6,00

Pre senzoričnú analýzu bol použitý formulár s bodovými stupnicami so slovným popisom jednotlivých bodov. Hodnotitelia (n=19) boli pred zahájením práce oboznámení s cieľom, postupom senzoričného hodnotenia a pred samotným senzoričným hodnotením vyplnili dotazník o konzumácii jogurtov. Jednotlivé vzorky analyzovaných jogurtov boli označené a hodnotiteľom anonymne predkladané v rovnakom množstve v priehľadných plastových miskách 14. deň po ich výrobe spolu so vzorkou z obchodnej siete. Získané výsledky senzoričného hodnotenia boli vyhodnotené v štatistickom programe GraphPad Prism a pomocou Tukey post testu boli porovnávané hodnoty jednotlivých deskriptorov.

Finálne výrobky, ako aj mlieko ako vstupná surovina boli z mikrobiologického hľadiska podrobené vyšetreniu na celkový počet mikroorganizmov podľa STN ISO 4833 na Plane count agare, prítomnosť *Salmonella sp.* (RapidChek® SELECT™ Salmonella Sample Pack), prítomnosť *Listeria monocytogenes* podľa STN EN ISO 11290-1/A1, prítomnosť baktérii rodu *Enterobacter*, prítomnosť koaguláza pozitívnych stafylokokov na Baird Parker Agare, prítomnosť baktérii rodu *Campylobacter* podľa ISO 10272 – 1 a prítomnosť baktérií mliečného kvasenia na MRS agare a M-17 agare.

Jogurty sme v štádiu zrenia (v 1, 3, 7, 14 deň) podrobili fyzikálno-chemickému vyšetreniu pozostávajúcemu zo stanovenia obsahu tuku metódou podľa Gerbera, sušiny, meraním titračnej kyslosti podľa Soxhlet-Henkela a meraniu pH (Dudriková a Pažáková, 2009).

Výsledky a diskusia

Mikrobiologickým vyšetrením mlieka bol zistený celkový počet mikroorganizmov u kozieho mlieka $1,4 \times 10^5$ u kravského mlieka $5,2 \times 10^4$. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č 853/2004 udáva limity \leq ako 100 000 pre mlieko kravské a \leq 1500000 pre mlieko pochádzajúce od iných druhov. Prítomnosť rodov *Listeria* a *Campylobacter* nebola preukázateľná ani v mlieku a ani vo vyrobených jogurtoch. Bola zaznamenaná prítomnosť baktérii mliečného kvasenia v dostačujúcej koncentrácii.

Tabuľka 2: Zloženie, pH a titračná kyslosť jogurtov vyrobených z kravského a kozieho mlieka.

Jogurt	1 deň		3 deň		7 deň		14 deň	
	kozí	kravský	kozí	kravský	kozí	kravský	kozí	kravský
voda (%)	87,9	86,6	87,9	86,4	87,9	86,6	87,9	86,6
sušina (%)	12,1	13,4	12,1	13,6	12,1	13,5	12,1	13,4
tuk (%)	2,2	5,1	2,4	4,8	2,4	5,2	2,3	5,2
bielkoviny (%)	4,2	3,5	4,2	3,6	4,3	3,4	4,2	3,5
pH	4,13	4,40	4,09	4,34	4,07	4,20	3,90	4,22
titračná kyslosť (°SH)	52,0	42,0	55,0	41,2	55,7	44,6	58,3	49,0

Senzoričného posúdenia jogurtov sa zúčastnilo 19 respondentov. 68,4% z nich uviedlo že konzumuje jogurty denne, 78,9% uviedlo že pri výbere jogurtu je pre nich dôležitá chuť, 16,8% sa nechá zlákať reklamou a pestrosťou obalu a len 5,26% uviedlo že rozhodujúcim kritériom je cena jogurtu. Až 57,9% respondentov by pri výbere preferovalo jogurt číslo 3 ktorým bol jogurt pochádzajúci z obchodnej siete. 21,04%

respondentov by si súčasne zvolilo jogurt vyrobený z kravského a kozieho mlieka. Ako vyplýva z tabuľky 3 najväčšie rozdiely boli zaznamenané vo viskozite jogurtov kde hodnotitelia ohodnotili jogurty vyrobené z kozieho mlieka ako jogurty vodnaté ba až málo súdržné.

Tabuľka 3: Senzorické hodnotenie jogurtov.

	Vz. 1	Vz. 2	Vz. 3
farba	3,11 ^{AA} ±0,81	4,00 ^B ±1,00	4,63 ^C ±0,59
vôňa	4,17±1,10	3,78 ^B ±1,06	4,72 ^C ±0,46
kyslosť	3,83±1,50	3,00 ^F ±1,24	4,16 ^G ±0,92
viskozita	2,72 ^{EA} ±1,18	1,83 ^{IB} ±0,62	4,44 ^{CC} ±0,86
chuť	3,95±0,94	3,45 ^B ±1,15	4,39 ^C ±0,50
int. vône	3,45±0,92	3,38±0,98	4,00±0,90
celk.dojem	3,50 ^B ±0,71	2,89 ^B ±1,28	4,44 ^{CC} ±0,62
vyst. tuk	3,33 ^{AA} ±0,77	4,44 ^B ±0,78	4,78 ^C ±0,43
uvoľnená srvátka	3,50±0,92	3,72±0,83	4,22±0,94

Výsledky v tabuľke sú uvedené v priemerných hodnotách spolu s vyjadrením smerodajných odchýlok. Vz.1 – kravský jogurt, Vz.2 – kozí jogurt, Vz. 3 kupovaný jogurt, e,f,g – P<0,05, a,b,c - P<0,01, A,B,C - P<0,001

Záver

Z výsledkov prevedených pokusov vyplýva že jogurty vyrobené v laboratórnych podmienkach z mlieka pochádzajúceho z registrovaných fariem nepredstavujú zdravotné riziko pre svojich konzumentov. Ako vyplýva z tabuľky 3 hodnotitelia za najvýznamnejšie nedostatky v laboratóriu vyrobených jogurtov v porovnaní z jogurtom z obchodnej siete považujú viskozitu predovšetkým jogurtu vyrobeného z kozieho mlieka, ktorá ovplyvnila aj celkový dojem daného jogurtu.

Podakovanie

Práca bola finančne podporená projektom KEGA č. 011UVLF-4/2012.

Literatúra

DUDRIKOVÁ, E., PAŽÁKOVÁ, J.: Praktická cvičenia z hygieny mlieka a mliečnych výrobkov. II. časť. UVLF v Košiciach, 2009, 115s. ISBN 978-80-8077-134-8

EISSA, E. A., MOHAMED AHMED, I. A., YAGOUB, A. E. A., BABIKER, E. E.: Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of yoghurt produced from goat milk, Animal Production Science, ISSN 1836-0939, 2010, vol. 51, no. 1, s. 53–59.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research, ISSN 0921-4488, 2004, vol. 51, no. 2, s. 155-163.

JAWORSKÁ, B., WASKIEWICZ-ROBAK, B., KOLANOWSKI, W., SWIDERSKI, F.: Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of natural yoghurts. International Journal of dairy Technology, ISSN 1471-0307, 2005, vol 58, no. 1, s. 39–44.

ŠULCEROVÁ, H., ŠUSTOVÁ, K., VACULÍNOVÁ, H.: Sledovanie zmien senzorických vlastností bielych jogurtov po dobu ich minimálnej trvanlivosti. Celoštátna prehliadka syrov 2007 Výsledky prehliadok a zborník prednášok semináre mlieko a syry, 2007, s. 208–212.

Kontaktná adresa: Juraj Gallo, MVDr., Ústav hygieny a technológie mlieka, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice, gallo@uvm.sk

Changes the selected parameters for Edam 30 % in three seasons

Vlášek Václav, Langová Jitka, Jovanovic Danijela

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

Summary

The aim of the study was to compare selected parameters of the standard type of Edam cheese in three seasons after purchasing and storage. Storage was carried out in three atmospheres and a common gas CO₂ and N₂ gas. The products were standardized selling point and permanent supplier. For samples was measured by water activity, dry matter and sensory changes. The results show highest content of dry matter in the autumn months 57.89 % and lowest in the spring months 49.93 %. Solids changed during storage with increasing tendency. Water activity is highest in the spring months 0.97 and lowest in summer months 0.95. During storage there is a gradual decrease it. In the free atmosphere, the most stable samples sold in the summer, in the atmosphere with carbon dioxide samples are stable also in the summer and in the atmosphere with nitrogen atmosphere are stable samples autumn. From a sensory point of view from the beginning like cheese. After 12 daily monitoring, most samples appeared mycoses, except the summer samples where mycoses occur until after 15 days.

Keywords: Edam cheese; water activity; solid; modified atmosphere

Introduction

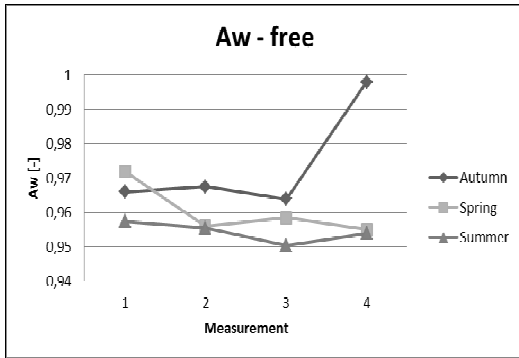
Cheese itself is very large and diverse group of milk-based products, which have very different properties, so they are divided into many groups in terms of their production and consistency (Picqué, 2011). However, the differences among the individual products in the course of the year? We know that the composition of the milk changes during the year depending on the nutrition of dairy cows and other parameters (Sympoura, 2009), this has an impact on cheese, which is marked by the same name from the same vendor? In this work was used as standard available Edam 30% (Cell, 2013), which is the most widely used and best selling cheese in the Czech Republic and has been tested in three seasons, when compared with the stability of the parameters water activity and dry. Water activity indicates the availability of water for microorganisms and is the limiting factor (Castell-Palou, 2012). There was also intended to change the water activity, dry matter during storage in three different atmospheres (normal atmospheric CO₂ and N₂ atmosphere). Technology in food packaging modified atmosphere is used to extend the shelf-life of foods (Sandhya, 2010) and was also monitored the effect of extending the shelf life of cheese with no visible mycoses.

Materials and Methods

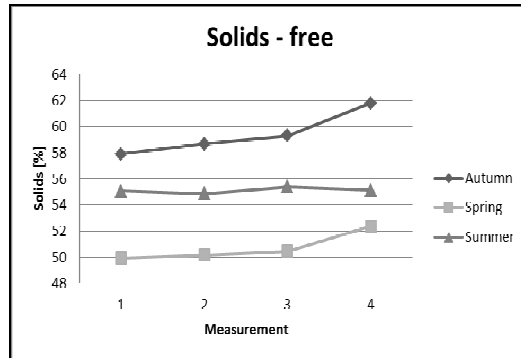
Samples were used for cheese 30%, which was bought in a store, in May, August and October as pad. In the laboratory was sliced into wedges about the size of 5x5 cm and inserted into prepared containers, which were then sealed in packaging machine at the desired atmosphere. In this experiment, was used standard atmosphere (free) atmosphere of carbon dioxide (CO₂) and the atmosphere with nitrogen (N₂). All such packaged samples were stored in a cooler temperature and analyzed weekly. The analysis parameters were chosen water activity (aw) using manometric measurement methods, solids using halogen oven and sensory evaluation.

Results and Discussion

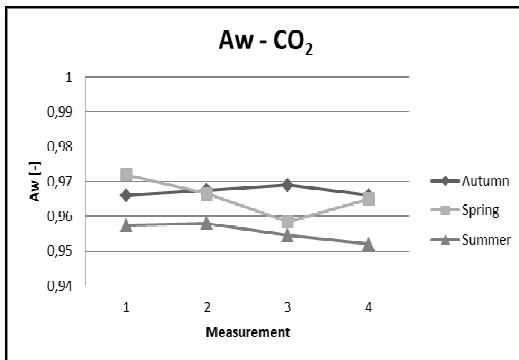
From the measured values shows that in each of the measured seasons has Edam cheese type different water activity and dry. This value is similar in each year, so we could for each cheese sold in individual seasons, for a certain characteristic value. The lowest water activity showed samples measured in the summer, when the average value was 0.95, but the lowest dry matter was evident in samples measured in the spring and an average of 49.93%. The highest average value of aw showed samples in spring (average 0.97) and the highest content of dry matter is evident in the autumn (average 57.89%).



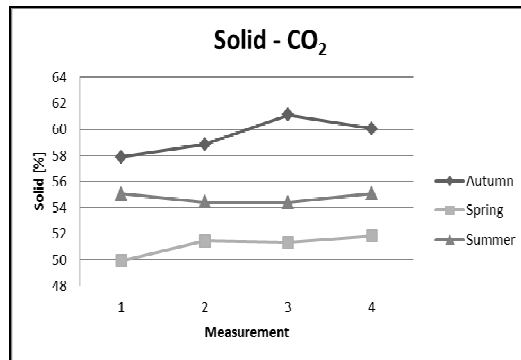
Graf 1: Aw Edam to free atmosphere.



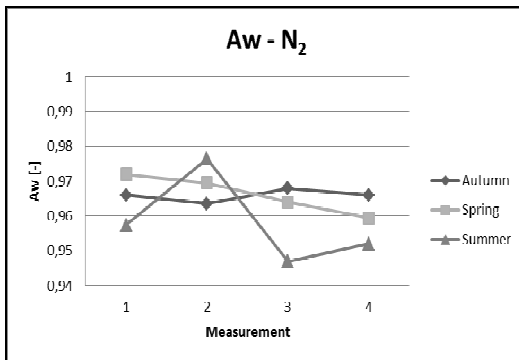
Graf 2: Solid Edam to free atmosphere.



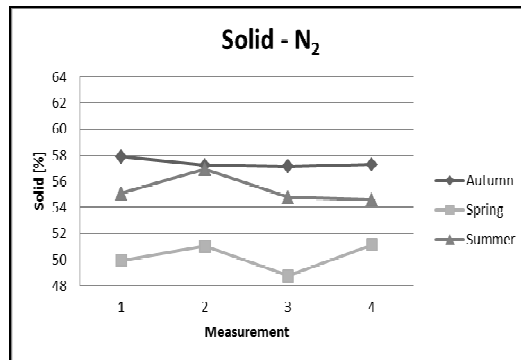
Graf 3: Aw Edam to CO₂ atmosphere.



Graf 4: Solid Edam to CO₂ atmosphere.



Graf 5: Aw Edam to N₂ atmosphere.



Graf 6: Solid Edam to N₂ atmosphere.

When stored in the free atmosphere occurred in the spring and summer samples to decrease the water activity value approaching 0.95 and solids exerted increasing trend

for all samples. For samples of cheese autumn However, when the water activity of the minimal decline and increasing the contrary. When using the modified atmosphere of carbon dioxide, all the samples were relatively stable water activity measured in all seasons, as well as the dry matter content showed no significant fluctuations. Nitrogen atmosphere in this measurement seemed very not corresponding, because samples behaved differently, summer water activity of samples during storage at this highly volatile atmosphere and at other times has been relatively stable for the spring samples and stable in autumn. Dry matter in this atmosphere the most varied in the spring and was stable in the autumn.

In the free atmosphere, the most stable samples sold in the summer, in the atmosphere with carbon dioxide samples are stable also in the summer and in the atmosphere with nitrogen atmosphere are stable samples autumn. From a sensory point of view from the beginning like cheese. After 12 daily monitoring, most samples appeared mycoses, except the summer samples where mycoses occur until after 15 days.

Conclusion

Edam cheese type in the course of a very variable in terms of food and water activity of dry matter. If we eliminate the variability of suppliers, vendors variously habits and other factors, it remains as the most important element that affects the individual quarter milk cheese. Milk is mainly influenced by the nutrition of dairy cows. This effect would explain why even in the same seasons, he is similar to Edam. Unfortunately on this factor does not affect the cheese maker. When packing in modified atmosphere is appropriate to extend the shelf life of cheese, but due to the quarterly changes in the cheese seems to fall Edam marketed as the most different atmosphere than Edam sold in the summer period. The results therefore suggest to poorly understood problems and point to a very interesting changes that would be necessary to further substantiate the physic-chemical analysis.

References

- BUŇKA, F.; PACHLOVÁ, V.; PERNICKÁ, L.; BUREŠOVÁ, I.; KRÁČMAR, S.; LOŠÁK, T. The Dependence of Peleg's Coefficients on Selected COnditions of a Relaxation Test in Model Samples of Edam Cheese. *Journal of Texture Studies*, 2013, vol. 44, no. 1, p. 45-55.
- CASTELL-PALOU, A.; VÁQUIRO, H.A.; CÁRCEL, J.A.; ROSSELLÓ, C.; FEMENIA, A.; SIMAL, S. Mathematical Modeling of Moisture Distribution and Kinetics in Cheese Drying. *Drying Technology: An International Journal*, 2012, vol. 30, issue 11-12, p. 1247-1255.
- PICQUE, D.; LECLERCQ-PERLAT, M. N.; GUILLEMIN, H.; CATTENOZ, T.; CORRIEU, G.; MONTEL, M. CH. Impact of packaging on the quality of Saint-Nectuire cheese. *International Dairy Journal*, 2011, vol. 21, p. 987-993.
- SANDHYA, J. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Curent status and future needs. *LWT – Food Science and Technology* [online], May 2010, vol. 43, p. 381 – 392. [cit. 2012-10-23].
- Dostupné na: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643809001546>>.
- SYMPOURA, F.; CORNU, A.; TOURNAYRE, P.; MASSOURAS, T.; BERDAGUÉ, J. L.; MARTIN, B. Odor compounds in cheese made from the milk of cows supplemented with extruded linseed and alpha-tocopherol. *Journal of Dairy Science*, 2009, vol. 92, no. 1, p. 3040-3048.

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

Modelování a predikce rovnovážných vlhkostí sušeného nízkotučného mléka

Modelling and prediction of equilibrium moisture content of skim milk powder

Langová Jitka, Vlášek Václav, Jovanovic Danijela

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Moisture sorption isotherms of skim milk powder were determined using the manometric method. Equilibrium data for adsorption and desorption of skim milk powder were investigated at ambient temperature in the range of 5 and 20°C and equilibrium relative air humidity from 11 to 97%. Models for moisture sorption isotherms and coefficient of determination were created using Maple program. Isotherm curves were evaluated. Coefficients of determination are 0.998 and 0.996 (for adsorption and desorption at 5°C), 0.999 and 0.998 (for adsorption and desorption at 10°C), and 0.997 and 0.993 (for adsorption and desorption at 20°C). Equilibrium moisture contents for critical $A_w = 0.6$ are 6.666 at 5°C, 8.712 at 10°C, and 8.256 at 20°C for adsorption. Equilibrium moisture content for critical $A_w = 0.6$ are 9.412 at 5°C, 10.338 at 10°C, and 10.841 at 20°C for desorption. There is no growth of undesirable microorganisms below these values.

Keywords: *adsorption; desorption; water sorption isotherm; critical water activity; spray dried milk products*

Úvod

Vnitřní parametry sušených výrobků jsou důležité z hlediska vlivu chování při skladování, manipulaci a zpracování (Fitzpatrick *et al.*, 2004). Sorpční izotermy vlhkosti (SIV) objasňují schopnost těchto výrobků v určité atmosféře adsorbovat či desorbovat vodu při konkrétní teplotě. Voda v sušených výrobcích může výrazně ovlivňovat sypkost či náchylnost k tvrdnutí. Potraviny s hodnotou vodní aktivity nižší než 0,6 jsou v mikrobiálním růstu stabilní (Leite Medeiros *et al.*, 2006).

Sorpce vody závisí na čase. Finální obsah vlhkosti v sušeném výrobku je dán ustavením dynamické rovnováhy mezi vodou nacházející se v tomto výrobku a vodou obsaženou v okolním prostředí (Teunou, Fitzpatrick, 1999). Průběh SIV je podmíněn hygroskopičností sušeného výrobku, sorpčními vlastnostmi a teplotou okolního prostředí. Vysoce hygroskopické výrobky mají strmé SIV, zatímco méně hygroskopické výrobky vykazují SIV plošší (Fitzpatrick *et al.*, 2004).

Cílem práce bylo vytvořit prediktivní model SIV a stanovit koeficienty determinace. Dalším cílem bylo určit rovnovážné vlhkosti pro kritickou hodnotu vodní aktivity $A_w = 0,6$, pod kterou je omezen mikrobiální růst.

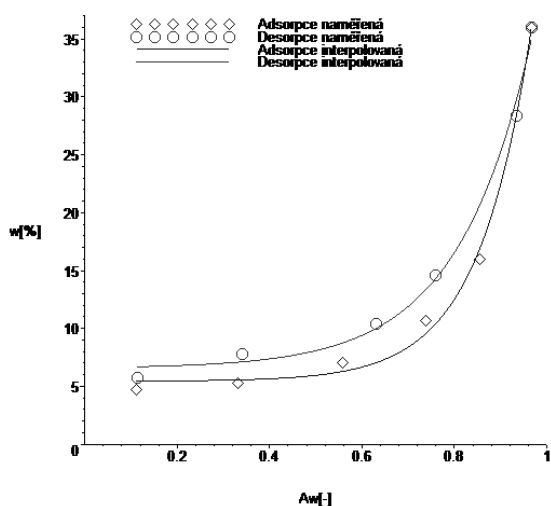
Materiál a metody

Ke stanovení SIV bylo použito nízkotučné sušené mléko (5 %) (Bohemilk, a.s., 400 g). Dle doporučení na obalu by se měl tento výrobek skladovat při teplotě do 24 °C a relativní vlhkosti do 70 %. Obsah tuku byl stanoven acidobutyrometrickou metodou dle

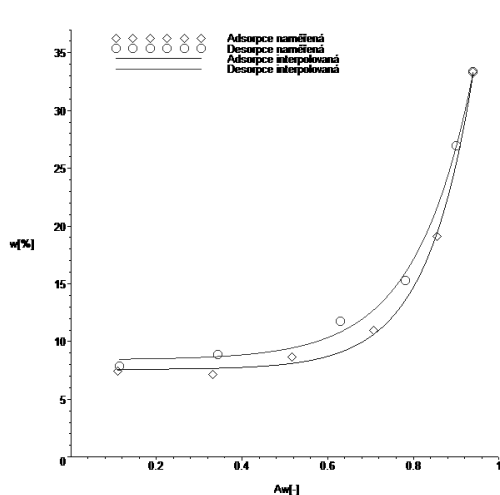
ČSN 57 0530 (Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků). Obsah tuku činil $5,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sušeného mléka, tj. $0,6 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ mléka obnoveného.

Princip stanovení byl založen na manometrické metodě. A_w byla měřena na A_w -metru Novasina a byl vyhodnocován rovnovážný stav při teplotách 5, 10 a 20 °C. Konstantních relativních vlhkostí bylo dosaženo standardy nasycených solných roztoků Novasina SALT-T & Sensor-Check SC. Rovnovážné vlhkosti solí byly 11, 33, 58, 75, 84 a 97 %. Obsah vlhkosti vzorků byl stanoven gravimetricky za použití halogenového analyzátoru vlhkosti Mettler Toledo HB-43. Měření pro jednotlivé vlhkosti bylo zopakováno vždy 3×. Pomocí programu Maple byly vytvořeny modely pro sorpce vlhkostí. Ze zadaných bodů byly vygenerovány exponenciální rovnice platící pro rozsah naměřených dat. Byly stanoveny koeficienty determinace.

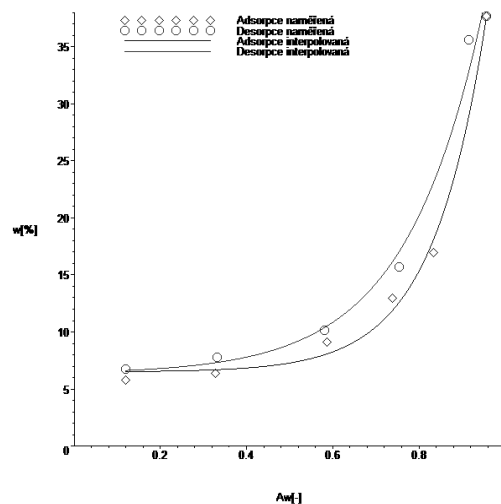
Výsledky a diskuse



Obrázek 1: SIV sušeného nízkotučného mléka při 5 °C.



Obrázek 2: SIV sušeného nízkotučného mléka při 10 °C.



Obrázek 3: SIV sušeného nízkotučného mléka při 20 °C.

Obrázky 1, 2 a 3 znázorňují průběh SIV sušeného nízkotučného mléka při teplotách 5, 10 a 20 °C. Tyto SIV jsou klasifikované jako typ II (sigmoidní typ) nejběžněji se vyskytující u potravin. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu stanovení je dlouhá doba stabilizace vzorků, průměrně 2–4 týdny (Leite Medeiros *et al.*, 2006). Rovnovážný obsah vlhkosti testovaných vzorků nízkotučného sušeného mléka za konstantní teploty vzrůstal s rostoucí hodnotou A_w během adsorpce i desorpce. Exponenciální rovnice SIV vygenerované ze zadaných bodů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Exponenciální rovnice odpovídající průběhu SIV

Teplota	Adsorpce	Desorpce
5 °C	$6432,601^{(x-0,577)} + 5,439$	$529,434^{(x-0,433)} + 6,559$
10 °C	$9628,580^{(x-0,586)} + 7,577$	$1883,288^{(x-0,514)} + 8,419$
20 °C	$3126,324^{(x-0,529)} + 6,492$	$270,746^{(x-0,331)} + 6,321$

Rovnovážné vlhkosti odpovídající kritické $A_w = 0,6$ pro adsorpci a desorpci při teplotě 5 °C mají hodnoty 6,666 a 9,412 %, při teplotě 10 °C pak 8,712 a 10,338 % a při teplotě 20 °C 8,256 a 10,841 %.

Závěr

Znalostí SIV je možné získat informace o možném poškození sušených mléčných výrobků vlivem relativní vlhkosti. Nastavením vhodných skladovacích podmínek je možné zabránit růstu nežádoucích mikroorganismů. SIV testovaného sušeného nízkotučného mléka vykazovaly při teplotě 5–20 °C a relativní vlhkosti 11–97 % sigmoidní tvar v souladu s hypotézou. Rovnovážný obsah vlhkosti při dané relativní vlhkosti vzrůstal s rostoucí hodnotou A_w při konstantní teplotě. Byly stanoveny hodnoty rovnovážné vlhkosti odpovídající kritické hodnotě $A_w = 0,6$. Pro hodnoty $A_w < 0,6$ nenastává množení a růst mikroorganismů. Nad touto limitující hodnotou se jako první z mikroorganismů objevují plísňe. Při dodržování limitních podmínek, tj. při zacházení se sušeným nízkotučným mlékem tak, aby při teplotě 5 °C nepřesáhla vlhkost sušeného nízkotučného mléka 6,666 %, při 10 °C 8,712 % a při 20 °C 8,256 %, lze dosáhnout nezneškodnění produktu nejen při balení, ale i během skladování.

Literatura

ČSN 57 0530. *Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků*. 1972.

FITZPATRICK, J.J.; IQBAL, T.; DELANEY, C.; TWOMEY, T.; KEOGH, M.K. Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. *Journal of Food Engineering*. 2004, vol. 64, no. 4, s. 435–444.

LEITE MEDEIROS, M.; BARTOLOMEU AYROSA, A.M.I.; NOGUEIRA DE MORAES PITOMBO, R.; CAETANO DA SILVA LANNES, S. Sorption isotherms of cocoa and cupuassu products. *Journal of Food Engineering*. 2006, vol. 73, no. 4, s. 402–406.

TEUNOU, E.; FITZPATRICK, J.J. Effect of relative humidity and temperature on food powder flowability. *Journal of Food Engineering*. 1999, vol. 42, no. 2, s. 109–116.

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

Moisture sorption isotherms of organic milk powder for infants in the temperature range of 10-30 °C

Jovanovic Danijela, Vlášek Václav, Langová Jitka

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

Summary

The first aim of this work was to determine effect of near air temperature on adsorption and desorption of moisture from organic milk powder for infants. Moisture sorption isotherms of organic milk powder were determined in the temperature range of 10 – 30 °C and water activity (Aw) from 0.11 to 0.97 using manometric static method. The next aim was to determine mathematical models of sorption isotherms with the best fitting for the experimental data. Results showed that the equilibrium moisture content (EMC) of milk powder samples increased with an increase of Aw at a constant temperature both for water adsorption and desorption. Created isotherms were sigmoidal shape. They are the most typical common for foods. Critical values of EMC of tested samples corresponding to the Aw equal to 0.6, were between 6,40% MC (w.b.) and 8,66% MC (w.b.) both for moisture adsorption and desorption. These values are usefull for optimisation of storing from the point of growing microorganisms.

Keywords: *critical water activity; optimisation; sorption curve; modeling*

Introduction

Organic milk powder for nutrition infants is dried dairy product, which contains unique combination of prebiotics and probiotics modeled on the mother's milk, with the highest organic quality. It contains purified cow's milk, whey and casein as a protein sources, a mixture of vegetable oils as a source of fat, lactose as a source of carbohydrates and vitamin-mineral mixtures. Water activity is a measure of the water that a microorganisms can use for growth. Numerically, Aw is equal to the equilibrium relative humidity divided by 100 (RH/100). This definition enables the study of the relation between water activity and moisture content. When a range of Aw values and the corresponding moisture contents are depicted graphically, the resulting construct is called a moisture sorption isotherm (MSI). Critical Aw also exists below which no microorganisms can grow. For most foods this is in the range 0.6 – 0.7. In general, dehydrated foods have Aw's less than 0.6; semi moist foods 0.62 – 0.92 and the greatest Aw values over 0.92 have cheeses, jams, jellies, meat and fish. Therefore, with knowledge of the MSI, we can predict the maximum moisture content that the food can be allowed to gain during storage (Štencl, 1999). The objectives of the present study were as follows: Aw measurements of milk powder in the temperature regime 10-30 °C, moisture content determination of samples tested and preparing graphically ratio between these values shaped as sorption isotherms.

Material and Methods

For measurements was used static manometric method for sorption tests (Iglesias and Chirife, 1982). Moisture content (MC) of samples for water adsorption and water desorption, were determined in the range of relative air humidity (RH) between 11 % and 97 % (six certified hygroscopic salts of Novasina were used for tests), the following procedure: after reaching the equilibrium moisture content of each sample at certain ERH and constant temperature and pressure, the corresponding salt was change: with

increasing ERH for water adsorption and decreasing ERH for water desorption. The experimental equilibrium moisture content data were processed in the statistical software of Maple and analyzed using the nonlinear regression procedure. In this study four equations were used to fit the experimental data, finding the best model for describing relation between EMC and ERH (such as presented in Table 1).

Table 1: Moisture sorption models used.

<i>Name of model</i>	<i>Equation</i>
Halsey (Halsey, 1948)	$A_w = \exp(-a \cdot w e^{-b})$
Henderson (Henderson, 1952)	$1 - A_w = \exp(-a \cdot w e^{-b})$
Oswin (Oswin, 1946)	$w e = a \cdot (A_w / (1 - A_w))^b$
Chung & Pfof (Chung & Pfof, 1967)	$\ln A_w = -a \cdot \exp(-b \cdot w e)$

a, b, ...coefficients for particular equation; A_w ...water activity; $w e$...equilibrium moisture content

Results and Discussion

The moisture sorption behavior for both adsorption and desorption at 20 °C as observed in Figure 1. is manifested in the form of sigmoid shaped curves reflecting a Type II isotherm (Brunauer, Emmet & Teller, 1938). Form of curves will be the same on temperatures at 10 and 30 °C for organic milk powder (OMP) for infants.

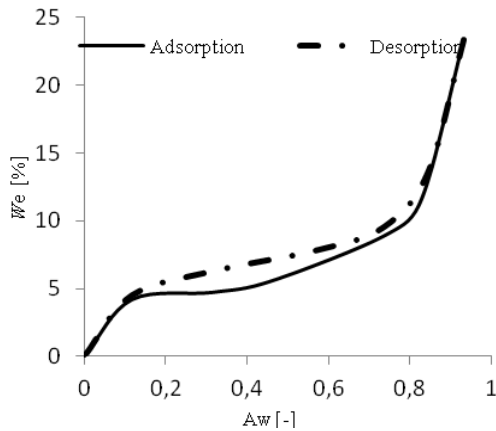


Figure 1: MSI'S for OMP at 20 °C.

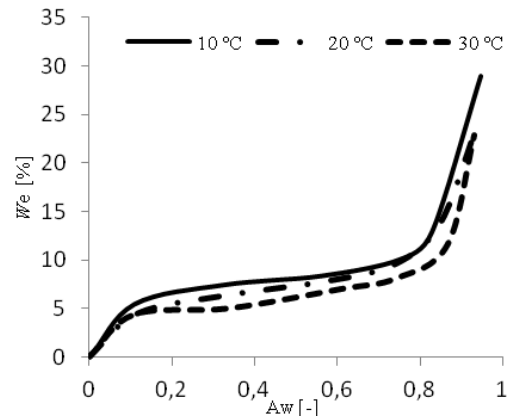


Figure 2: Desorption isotherms for OMP at 10, 20 and 30 °C.

An increase in temperature caused an increase in A_w for the same moisture content and if A_w was kept constant, an increase in temperature caused a decrease in the amount of absorbed water, as presented on Figure 2. In this figure presented desorption isotherms for OMP in temperature range 10 – 30 °C. Same results and form of curves were obtained for adsorption in temperature range 10 - 30 °C (data no shown). Investigation of the results obtained from equations (presented in Table 1) indicated that all models good describe the experimental sorption data for OMP samples throughout the entire range of A_w . They give the low values of statistic error of estimate (SEE) and mean relative percentage deviation (P) for predicted and experimental values.

Conclusion

MSI'S showed that values of EMC of milk powder samples increased with an increase of A_w at a constant temperature and with for increasing in temperature caused an decrease in the amount of absorbed water for constant A_w . EMC's decrease with increasing temperature on critical $A_w=0.6$ as following: for adsorption from 8.0% on 10 °C to 6.40% on 30 °C and for desorption from 8.66% on 10 °C to 6.96% on 30 °C. It means that in higher temperature the material becomes less hygroscopic. The results (analysed values of t , RH, EMC and A_w) would be valuable in appraising the shelf-life of product under different storage conditions.

References

- BRUNAUER, S.; EMMET, P. H. & TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layer. *Journal of American Chemical Society*. 1938, vol. 60, no. 2, s. 309-319.
- CHUNG, D. S. & PFOST, H. B. Adsorption and desorption of water vapor by cereal grains and their products. Part II. Development of the general isotherm equation. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. 1967, vol. 10, no. 4, s. 552-555.
- HALSEY, G. Physical adsorption on non-uniform surfaces. *Journal of Chemical Physics*. 1948, vol. 16, no. 10, s. 931-937.
- HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. *Agriculture Engineering*. 1952, vol. 2, s. 29-32.
- IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. Handbook of food isotherms: water sorption parameters for food and food components. *Academic Press, Buenos Aires, Argentina*. 1982, s. 8-32.
- OSWIN, C. R. The kinetics of package life III. The isotherm. *Journal of Chemical industry (London)*. 1946, vol. 65, s. 419-423.
- ŠTENCL, J. Water activity of skimmed milk powder in the temperature range of 20-45 °C. *Acta Veterinaria Brno*. 1999, vol. 68, no. 3, s. 209-215.

Contact address: Danijela Jovanovic, Mgr., Institute of Milk Hygiene and Technology, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H12022@vfu.cz

Stanovenie retinolu a tokoferolu v kozom kolostre s využitím ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC)

Simultaneous determination of retinol and tocopherol in goats' colostrum by ultra performance liquid chromatography (UPLC)

Hodulová Lucia, Kostrhounová Romana, Borkovcová Ivana, Vorlová Lenka

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The interest in colostrum is increasing nowadays prepared as a food supplement in human diet due to higher content of biological active components in comparison with milk. The aim of this work was to determinate two lipophilic vitamins, retinol and tocopherol in goats' colostrum by ultra performance liquid chromatography UPLC, the new category of analytical separation technique, which retains the practicality and principles of HPLC while increasing the overall attributes of speed, sensitivity and resolution, with UV detection at wavelength 325 nm for retinol and 295 nm for tocopherol. For extraction was used direct saponification and liquid liquid extraction with n-hexan. The concentrations of vitamins vary a lot considering that the colostrums were obtained from different farms in the Czech Republic during the Spring for retinol 1,54 mg/L - 18,46 mg/L and for tocopherol 2,04 mg/L - 23,05 mg/L.

Keywords: UPLC; colostrum; retinol; tocopherol

Úvod

Kolostrum je sekretom mliečnej žľazy produkovaný niekoľko dní (3-4) po pôrode. Okrem preukázanej vysokej energetickej hodnoty, vykazuje i špecifickú biologickú aktivitu sprostredkovanú jeho veľmi cenenými organickými zlúčeninami. V posledných rokoch vzrastá záujem o kolostrum, pretože sa považuje za veľmi dobrý zdroj esenciálnych biomolekúl. Na trhu sa stretávame so sušeným kolostrumom vo forme toboliek ako potravinového doplnku. Jeho tuková zložka je nositeľom vitamínov, ktoré plnia dôležité biologické funkcie a oproti zrelému mlieku sú ich koncentrácie v nezrelom mlieku (kolostre) niekoľkokrát vyššie. V našej práci sme sa zamerali na simultánne stanovenie dvoch lipofilných vitamínov – retinolu a tokoferolu v kozom kolostre pomocou ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC) s UV detekciou. Hlavnou úlohou tokoferolu je jeho antioxidačná funkcia, dôležitejšia pre mláďatá, ktoré sú náchylnejšie k oxidačnému stresu než dospelé jedince. Retinol je nepostrádateľný pre tvorbu fotosenzitívneho pigmentu dôležitého pre zrak, veľkú úlohu zohráva pri diferenciácii a delení buniek. (Elfstrand, Debir).

Metóda UPLC je novou separačnou technikou v oblasti kvapalinovej chromatografie. Celá separácia prebieha za veľmi vysokých tlakov. Oproti klasickej HPLC technike sa vyznačuje kratšou dobou analýzy, zvýšením separačnej účinnosti a zvýšenej citlivosti, čím sa dosahuje kvalitnejších výsledkov. Výhodou je zníženie objemu rozpúšťadiel, tým menšie náklady na analýzu a minimalizácia záťaže k životnému prostrediu.

Materiál a metódy

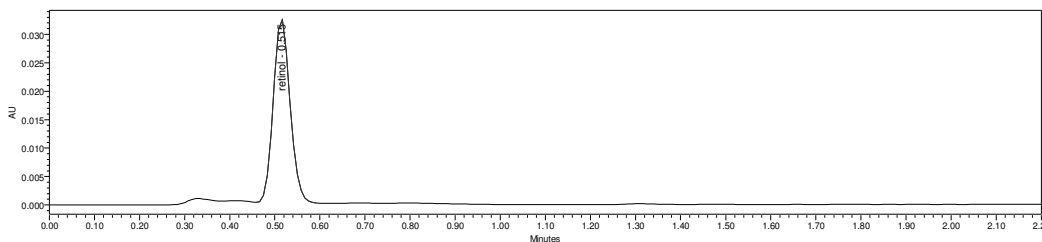
Vzorky kolostra boli získané z rôznych kozích fariem v ČR v období od februára do júna 2012. Celkovo bolo paralelne analyzovaných 96 vzoriek. Pre vzorky kolostra boli optimalizované podmienky saponifikácie a extrakcie kvapalín/kvapalina do n-haxenu. Bol navážený jeden gram zhomogenizovaného kolostra, pridané stopy antioxidantov (kyselina askorbová, hydrochinon) a 10 ml metanolickeho KOH k priamej saponifikácii urýchlenej varom pod refluxom pod dobu 30 minút. Nasledovala extrakcia kvapalina/kvapalina do nepolárneho rozpúšťadla n-hexanu, neutralizácia vodou, odparenie na vákuovej rotačnej odparke a prefiltrovanie extraktu v metanole pomocou 45µm membránového filtra do vialky.

Prístrojové vybavenie

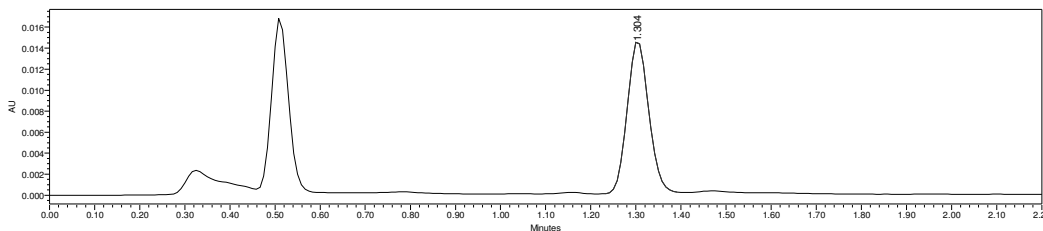
UPLC system Acquity pozostávajúci z binárnej pumpy, autosamplaru, TUV detektora so softwarom Empower (Waters, USA). Použitá kolona BEH C18, 2.1x100 mm, 1.7 µm.

Chromatografické podmienky

Mobilná fáza 98:2 (v/v) metanol:voda, izokratická elúcia, prietok 0,45 ml/min, nástrek na kolonu 3µl. Celkový čas analýzy 2,20 minúty. K detekcii boli použité dva kanály UV detektoru: 325 nm pre retinol a 295 nm pre tokoferol.



Obrázok 1: UPLC Chromatogram retinolu pri $\lambda = 325$ nm.



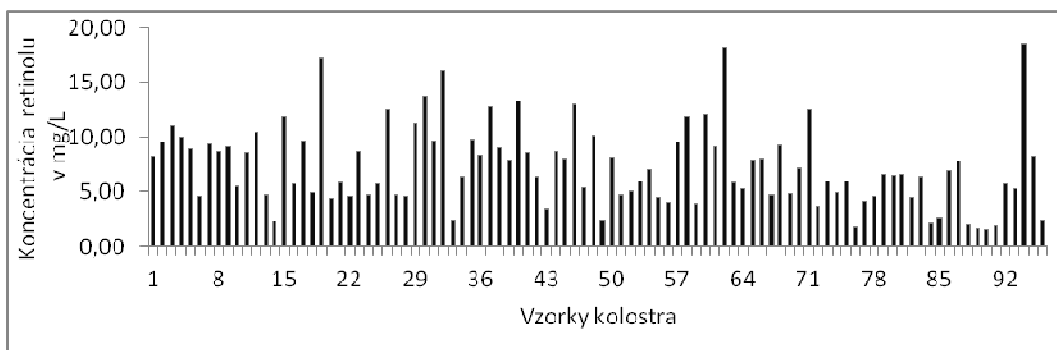
Obrázok 2: UPLC Chromatogram tokoferolu pri $\lambda = 295$ nm.

Výsledky a diskusia

Koncentrácie vo vzorkách kozieho kolostra sú veľmi variabilné a to v rozmedzí 1,54 mg/L - 18,46 mg/L pre retinol a 2,04 mg/L - 23,05 mg/L pre tokoferol., vzhľadom na to že boli odobrané v rôznych dňoch po pôrode. Stredná hodnota pre retinol je 6,54mg/L a pre tokoferol 6,2 mg/L.

Podľa nameraných hodnôt u jednotlivých vzoriek spoločne so základným chemických vyšetrením je možné ohodnotiť kvalitu kolostra a približne zistiť deň, kedy bolo

kolostrum odobrané. Od týchto hodnôt sa môže následne odvíjať cena za liter kolostra od chovateľov a selekcia k ďalšiemu použitiu.



Graf 1: Obsah retinolu v mg/L.



Graf 2: Obsah tokoferolu mg/L.

Záver

Použitím UPLC separačnej techniky sa znížil objem použitých rozpúšťadiel desaťkrát (u HPLC bol prietok 1 ml/min, čas analýzy 10 minút, u UPLC prietok 0,45 ml/min, čas analýzy 2,2 minúty), tým sa znížili náklady na jednu analýzu a negatívne pôsobenie na životné prostredie.

Kozie kolostrum si zasluhuje vyššiu pozornosť vďaka jeho zdraviu prospešným účinkom na organizmus a kvôli nedostatku informácii o jeho obsahu prírodne sa vyskytujúcich esenciálnych biomolekúl.

PodĎakovanie

Práca bola finančne podporená projektom NAZV KUS č. QJ1230044.

Literatúra

DEBIR C., POTTIER J., GOFFE Ch., LARONDELLE Y. Present knowledge and unexpected behaviours of vitamin A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science*. 2005, vol.98, s. 135-147.

ELFSTRAND L. et al. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, s. 879-887.

Kontaktná adresa: Lucia Hodulová, MVDr., Ústav hygieny a technológie mlieka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11012@vfu.cz

Screening rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu – prehľad metód

Screening of antibiotic residues in food of animal origin – a review of methods

Poláková Zuzana, Kožárová Ivona

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

Summary

Antibiotics are widely used drugs in human and veterinary medicine. Their false and frivolous application animals used for food may lead to the presence of residues in their tissues and animal products. In order to protect human health, the control of residues of antibiotics in live animal and animal products must be performed. Methods for determining the presence of residues of veterinary drugs in foodstuffs intended for human consumption are based on microbiological, immunochemical and physico-chemical principles. In recent years, due to an increase in the rate of antibiotic residues in foodstuffs, there is a demand for fast, sensitive and reliable methods. This paper presents a review of the methods used worldwide for the determination of residues of veterinary drugs in foodstuffs of animal origin.

Keywords: *screening; residues; methods; food*

Úvod

Vyšetrovanie potravín z hľadiska prítomnosti patogénov, cudzorodých látok, antibiotík, ich zloženia a ďalších parametrov je dôležitou úlohou z pohľadu ich neškodnosti a kvality. Jednou z oblastí testovania potravín, ktorej význam v posledných rokoch stúpa, je sledovanie prítomnosti rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu (Grexa a Károlyi, 2012).

Intenzívne podávanie antibiotík vo veterinárnej praxi spôsobuje kontamináciu potravín týmito zlúčeninami a predstavuje riziko pre ľudské zdravie (Byzova a kol., 2011). Stanovenie rezíduí antibiotík v mlieku a mäse je navyše dôležitým technologickým kritériom pre nákup a spracovanie mlieka, mäsa a medu (<http://www.biopro.cz/>).

Kontrola farmakologicky aktívnych látok u zvierat určených na jatočné účely je primárne vykonávaná veterinárnym lekárom, ktorý venuje pozornosť druhu, množstvu, dobe, spôsobu a miestu aplikácie veterinárnych liečiv a prípravkov. Úradnú kontrolu v Slovenskej republike vykonáva ŠVPS SR. V prípade podozrenia z porušenia legislatívy sa „vzorky“ analyzujú v akreditovaných referenčných laboratóriách (Staruch a Mati, 2012). Kontrola prítomnosti rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu sa vykonáva v súlade so Smernicou Rady 96/23/ES. Nariadením č. 37/2010 v platnom znení sú v záujme ochrany zdravia konzumentov stanovené maximálne limity rezíduí (MRL) liečiv pre jednotlivé potravinové komodity. (Sokol a kol., 2007).

Prehľad metód

Podľa autorov Sokol a kol. (2007) je množstvo rezíduí antibiotík možné stanoviť s využitím rozličných metód, ktoré rozdeľujeme na *depistážne* a *konfirmačné metódy*. Medzi depistážne metódy sa zaraďujú mikrobiálne inhibičné testy (MIT), imunoreceptorové a imunochemické metódy a chromatografia na tenkej vrstve (TLC). Ku konfirmačným metódam patria plynová chromatografia (GC), plynová

chromatografia-hmotnostná spektrometria (GS-MS), vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC) a kvapalinová chromatografia-hmotnostná spektrometria (LC-MS).

Druhým spôsobom delenia metód je ich rozdelenie na *mikrobiologické* a *fyzikálno-chemické*. Mikrobiologické metódy sú pre plošný monitoring vhodnejšie vďaka svojej jednoduchosti, spoľahlivým výsledkom a časovej nenáročnosti. Sú to testy kvalitatívne, širokospektrálne, komerčne vyrábané. Sú založené na špecifickej reakcii medzi citlivým organizmom (najčastejšie baktériou) a antibiotikom prítomným vo vyšetrovanej vzorke. Fyzikálno-chemické metódy sú kvalitatívne i kvantitatívne metódy, tzn. že je možné stanoviť ako druh použitej látky, tak aj jej množstvo. Metódy kladú vyššie nároky na prístrojové vybavenie. Stanovenie je však časovo i finančne náročnejšie (Cháfer-Pericás, 2010, <http://cit.vfu.cz/>).

Jedným z najjednoduchších testov na detekciu rezíduí antibiotík v živočíšnych produktoch je tzv. *antibiotest*, ktorý využíva techniku použitia reakčných prúžkov, ktoré sa ponárajú do testovacej vzorky (mlieko) (Staruch a Mati, 2012). Prvým referenčným MIT na detekciu rezíduí antibiotík v surovom mlieku a tepelne ošetrovanom mlieku bol MIT s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149. V rámci vývoja metód možno pozorovať postupný prechod od platňových metód k metódam s použitím liekoviek alebo mikrotitračných platničiek. Liekovková forma je určená pre individuálne vzorky, alebo nízky počet vzoriek (Delvotest, Eclipse), kým mikrotitračné platničky sú na hromadné vyšetovanie (Charm Farm Test, Charm Rapid Inhibition Test). Medzi diskové difúzne platňové testy určené pre vyšetovanie mlieka zaraďujeme metódu STAR a difúznu diskovú metódu na stanovenie penicilínu. Väčšina mikrobiologických metód určených na skrining rezíduí antibiotík v mäse využíva svalovinu a obličky ako terčové tkanivá. Testovacie systémy využívajúce len obličky, ako indikátorové tkanivo, sú výhodné pre svoju vyššiu citlivosť, pretože vo všeobecnosti platí, že najvyššie koncentrácie voľných liekov sa nachádzajú práve v obličkách a obličkových panvičkách. K testom určeným na vyšetovanie mäsa a tkanív zaraďujeme hlavne New Dutch Kidney Test (NDKT), Four plate test (FPT), metódu STAR, PREMI[®]TEST (Sokol a kol., 2007).

Metóda *Charm-Test II.* je imunoreceptorová metóda založená na väzobnej reakcii medzi funkčnými skupinami liekov a receptorovými miestami na pridaných mikrobiálnych bunkách. Test možno považovať ako doplnok mikrobiologických metód alebo ako konfirmačný test. Umožňuje detekciu siedmich skupín antibiotík: beta-laktámy, tetracyklíny, makrolidy, sulfónamidy, aminoglykozidy, novobiocín a chloramfenikol. *β-STAR Test* bol vyvinutý na stanovenie beta-laktámových antibiotík. Výsledok je hodnotený vizuálne porovnávaním vzniku intenzity zafarbenia prebehnutej reakcie. Na podobnom princípe je založený aj *Charm MRL Test* určený pre beta-laktámové antibiotiká. Výsledok môže byť zhodnotený vizuálne alebo s použitím readra. Ďalším testom je *Penzym Test*. Má dve verzie, *Penzym* a *Penzym S*, ktoré sa od seba odlišujú dĺžkou inkubácie a citlivosťou. Test bol prvotne vyvinutý pre beta-laktámové antibiotiká, je však extrémne citlivý aj na cefalosporíny (Sokol a kol., 2007).

Imunochemické metódy sú založené na interakcii protilátky a antigénu bez predošlej úpravy vzorky. V súčasnosti väčšinu imunochemických metód tvoria stanovenia pomocou *ELISA*, metódy enzýmovej imunoanalýzy (*EIA*), *RIA* (rádioimunologická analýza). Medzi metódy *EIA* zaraďujeme testy kvantitatívne (Microtitre plate assay)

a testy kvalitatívne alebo vizuálne (Dipstick tests) (Kožárová a kol., 2001; Sokol a kol., 2007). Chromatografia na tenkej vrstve (TLC) predstavuje rýchlu a selektívnu metódu stanovenia niektorých druhov antibiotík a sulfónamidov v mnohých biologických matriciach. Umožňuje analýzu veľkého počtu vzoriek súčasne v krátkom čase (Sokol a kol., 2007).

Záver

Stanovenie rezíduí antibiotík nespočíva len v ochrane zdravia ľudí, ale niektoré z nich, i v množstvách človeku v zásade neškodných, môžu byť prekážkou bakteriálnej fermentácie pri priemyselnom spracovaní mlieka alebo mäsa. Screening rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu sa vykonáva za účelom zabránenia vstupu rizikových potravín do potravinového reťazca, ale aj kontroly dodržiavania dĺžky stanovených ochranných lehôt v prípade aplikácie antibiotík zvieratám určených na produkciu potravín.

Pod'akovanie

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

Literatúra

BYZOVA, N., A., ZVEREVA, E., A., ZHERDEV, A., V., EREMIN, S., A., SVESHNIKOV, P., G., DZANTIEV, B., B.: Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products. *Analytica Chimica Acta*, 701, 2011, 209-217.

GREXA, O., KÁROLYI, L.: Potreba vyšetovania potravín a niektoré súčasné trendy v diagnostických metódach. In: Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Hygiena Alimentorum XXXIII, Štrbské Pleso, Vysoké Tatry, 9.-11.5.2012. Bratislava: Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, 2012, 71 – 72. ISBN 978-80-7148-063-1

CHÁFER-PERICÁS, C., MAQUIEIRA, Á., PUCHADES, R.: Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 9, 2010, 1038 – 1049.

KOŽÁROVÁ, I., MÁTÉ, D., CABADAJ, R.: Metódy stanovenia rezíduí sulfónamidov v mlieku a ostatných živočíšnych produktoch. In: Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Hygiena Alimentorum XXII“, Košice: UVL, 5.-7.6.2001, 211-213. ISBN 80-88985-39-0

SOKOL, J., ŠNIRC, J., KOŽÁROVÁ, I.: Farmakológia – špecifické aspekty jej uplatňovania pri produkcii potravín. In: ŠNIRC, J., SOKOL, J., SEGINKO, J., HERA, A. a kol.: *Klinická veterinárna farmakológia*. Martin: Neografia a.s., 2007, 60-73. ISBN 978-80-88892-75-5

STARUCH, L., MATI, M.: Detekcia inhibičných látok v hydinovom mäse a jeho kvalita. . In: Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Hygiena Alimentorum XXXIII, Štrbské Pleso, Vysoké Tatry, 9.-11.5.2012. Bratislava: Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, 2012, 166-169. ISBN 978-80-7148-063-1

http://cit.vfu.cz/ivbp/inovovana-vyuka/predmet/prohlidka-jatecnych-zvirat-a-masa/rezidua_latek

<http://www.biopro.cz/Diagnostika/Diagnostika-pro-kontrolu-kvality-potravin/Stanoveni-rezudii-inhibicnich-latek-v-mlece-a-mase/>

Kontaktná adresa: Zuzana Poláková, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, zuzutegdesova@gmail.com

Porovnanie detekčnej citlivosti mikrobiálnych inhibičných testov na sulfónamidy a tetracyklínové antibiotiká

Comparison of detection sensitivity of the microbial inhibition tests to sulphonamides, and tetracycline antibiotics

Gondová Zuzana, Kožárová Ivona

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Ústavy 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 five sulphonamides (SPH): sulphadimidin (SD), sulphachlorpyridazin (SCHP), sulphametoxazol (SMX), sulphathiazol (STZ), sulphamerazin (SMZ) and three tetracycline antibiotics: tetracycline (TTC), oxytetracycline (OX) and chlortetracycline (CL). The LOD of both MITs to SPH and TTC 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 conclude that the LOD of the STAR with the test strain *B. cereus* ATCC 11788 was at the level of maximum residue limit (MRL) for all TTC antibiotics, but the LOD of *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 to SPH antibiotics was not at the level of MRL for SD. In the case of NAT test, the LOD of *B. cereus* ATCC 11788 to TTC antibiotics was at the level of MRL, but the LOD of *B. pumilus* CN 607 to sulphonamide antibiotics was not at the level of MRL only for STZ.

Keywords: screening; antibiotics; microbial inhibition tests

Úvod

Tetracyklínové antibiotiká a sulfónamidy sú používané na liečbu bakteriálnych ochorení rozličných orgánových systémov zvierat a ľudí. Aplikácia antibiotík u potravinových zvierat však predstavuje potenciálne riziko ohrozenia verejného zdravia, pretože sa rezíduá antibiotík, nevyhnutne prítomné vo všetkých tkanivách potravinových zvierat, stávajú súčasťou potravinového reťazca.

V záujme ochrany zdravia ľudí je kontrola rezíduí veterinárnych liekov u zvierat a v ich živočíšnych produktoch je v Slovenskej republike legislatívne pokrytá zákonom Národnej Rady Slovenskej republiky č. 39/2007 Z. z. a nariadením vlády Slovenskej republiky č. 320/2003 Z. z. v znení neskorších predpisov. Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie 2002/657/ES. V súčasnosti sú pre prvotný screening rezíduí v SR schválené platňová metóda (STAR) a liekovkové testy (PREMI[®]TEST, KALIDOS TB, MP a ECLIPSE 50). Metóda STAR využíva päť testovacích kmeňov (*B. subtilis* BGA, *K. rhizophila* ATCC 9341, *B. cereus* ATCC 11788, *E. coli* ATCC 10303 a *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149), každý citlivý na inú skupinu ATB. NAT predstavuje nový testovací systém, taktiež využívajúci päť testovacích kmeňov: *B. cereus* ATCC 11788, *Y. ruckeri* NCIM 13282, *K. rhizophila* ATCC 9341, *B. subtilis* BGA a *B. pumilus* CN 607, 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 SPH a TTC antibiotiká na základe hodnotiaceho kritéria – detekčného limitu metódy (LOD). LOD oboch metód sme porovnávali s maximálnymi limitmi reziduí určenými pre jednotlivé látky zo skupiny SPH a TTC antibiotík nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 v platnom znení.

Materiál a metódy

Použili sme štandardné roztoky zakúpených od firmy Sigma Chemical Co. a Serva Electrophoresis GmbH., s reziduálnymi koncentraciami 100; 200; 300; 400; 500 a 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pre SD, SCHP, SMX, STZ a SMZ a 50; 60; 70; 80; 90; 100; 200; 300; 400; 500 a 600 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pre TTC, OXY a CL. Testovacie kmene a kultivačné médiá boli pripravené v súlade s postupom uvedeným v Zozname úradným metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív – metóda STAR (CH 12.19, 2006) a pre NAT test podľa autorov Pikkemaat a i. (2008). Pre metódu STAR sme použili médium s *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (5×10^6 spór.ml⁻¹) a médium s *B. cereus* ATCC 11788 (3×10^4 spór.ml⁻¹). Disky nasiaknuté 30 μl SD, SCHP, SMX, STZ, SMZ, TTC, OXY a CL sme aplikovali na povrch agaru a inkubovali platne počas 12 – 15 hod. pri 55 °C \pm 1 °C (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149) a počas 16 – 18 hod. pri 30 °C \pm 1 °C (*B. cereus* ATCC 11788). Pri metóde NAT sme použili médium s *B. pumilus* CN 607 (10^6 KTJ.ml⁻¹) a médium s *B. cereus* ATCC 11788 (10^5 KTJ.ml⁻¹). Disky nasiaknuté 100 μl SD, SCHP, SMX, STZ, SMZ, TTC, OXY a CL sme aplikovali do otvorov v médiu (\varnothing 14 mm), k diskom sme pridali 0,1 M (*B. cereus* ATCC 11788) a 0,133 M (*B. pumilus* CN 607) platňovo špecifický tlmivý roztok (200 – 300 μl) a inkubovali platne počas 16 – 18 hod. pri 30 °C \pm 1 °C (*B. cereus* ATCC 11788) a 37 °C \pm 1 °C (*B. pumilus* ATCC 11788).

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 koncentraciami štandardov pre metódu STAR a NAT sú prezentované v tabuľkách 1 - 4.

Tabuľka 1: Veľkosti IZ \pm SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov TTC, OXY a CL pri metóde STAR (*B. cereus* ATCC 11778).

$\mu\text{g.l}^{-1}$	50	60	70	80	90	100 (MRL)	200	300	400	500	600
TTC	3,21 \pm 1,43	1,34 \pm 0,15	2,46 \pm 0,56	1,97 \pm 0,5	2,13 \pm 0,22	2,73 \pm0,68	2,97 \pm 1,2	3,25 \pm 0,76	5,58 \pm 2,55	5,42 \pm 0,54	5,86 \pm 0,57
OXY	-	-	-	-	3,28 \pm 0,46	2,95 \pm1,16	3,36 \pm 0,33	3,86 \pm 1,53	3,12 \pm 0,99	4,05 \pm 0,71	4,78 \pm 0,47
CL	2,89 \pm 1,18	3,71 \pm 1,58	3,05 \pm 0,74	4,45 \pm 1,25	3,46 \pm 1,53	4,32 \pm1,45	6,41 \pm 2,3	7,17 \pm 0,64	7,16 \pm 0,85	6,64 \pm 0,39	9,96 \pm 0,63

Tabuľka 2: Veľkosti IZ \pm SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov SD, SM, STZ, SCHP a SMZ pri metóde STAR (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149).

$\mu\text{g.l}^{-1}$	100 (MRL)	200	300	400	500	1000
SD	-	2,60 \pm 0,81	3,11 \pm 1,01	4,96 \pm 2,33	7,49 \pm 0,60	8,13 \pm 0,41
SMX	3,73\pm1,92	3,83 \pm 1,18	4,71 \pm 1,41	6,93 \pm 1,66	6,93 \pm 1,66	6,93 \pm 1,66
STZ	5,99\pm1,15	6,49 \pm 0,95	6,49 \pm 0,95	7,09 \pm 0,52	9,40 \pm 2,20	9,56 \pm 1,22
SCHP	4,96\pm1,24	5,21 \pm 1,24	5,38 \pm 0,75	6,75 \pm 1,50	6,82 \pm 3,89	7,01 \pm 1,16
SMZ	3,04\pm1,18	3,47 \pm 0,92	4,27 \pm 1,01	4,70 \pm 1,19	4,82 \pm 1,16	5,04 \pm 1,04

Tabuľka 3: Veľkosti IZ \pm SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov TTC, OXY a CL pri NAT teste (*B. cereus* ATCC 11778).

$\mu\text{g.l}^{-1}$	50	60	70	80	90	100 (MRL)	200	300	400	500	600
TTC	-	-	-	-	19,35 $\pm 0,18$	19,86 $\pm 0,41$	21,85 $\pm 1,93$	21,21 $\pm 2,14$	20,9 $\pm 1,37$	19,91 $\pm 1,54$	22,66 $\pm 1,63$
OXY	-	-	-	-	18,29 $\pm 0,38$	21,91 $\pm 1,45$	18,17 $\pm 0,82$	18,68 $\pm 2,43$	20,81 $\pm 0,64$	21,17 $\pm 0,88$	19,71 $\pm 0,66$
CL	-	17,69 $\pm 0,06$	17,69 $\pm 0,06$	19,7 $\pm 1,57$	17,71 $\pm 0,48$	20,42 $\pm 1,85$	24,68 $\pm 0,87$	25,07 $\pm 0,18$	27,4 $\pm 2,59$	27,26 $\pm 1,26$	28,8 $\pm 3,02$

Tabuľka 4: Veľkosti IZ \pm SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov SD, SMX, STZ, SCHP a SMZ pri NAT teste (*B. pumilus* CN 607).

$\mu\text{g.l}^{-1}$	100 (MRL)	200	300	400	500	1000
SD	27,12\pm2,33	27,46 \pm 0,18	31,00 \pm 2,13	32,82 \pm 0,03	34,89 \pm 0,08	36,04 \pm 1,16
SMX	28,69\pm0,37	28,7 \pm 1,44	29,33 \pm 0,89	29,74 \pm 0,19	29,75 \pm 0,21	31,93 \pm 0,28
STZ	-	23,78 \pm 0,40	25,03 \pm 0,82	25,13 \pm 0,64	25,48 \pm 2,29	29,41 \pm 0,49
SCHP	27,20\pm2,29	28,85 \pm 1,52	28,95 \pm 0,05	29,19 \pm 0,57	30,02 \pm 0,74	30,09 \pm 2,06
SMZ	26,13\pm0,61	27,15 \pm 0,78	30,98 \pm 0,46	31,40 \pm 0,20	33,17 \pm 0,53	33,91 \pm 0,49

Oba testovacie kmene metódy STAR a NAT spoľahlivo zachytávali všetky látky zo skupiny TTC antibiotík. V prípade SPH antibakteriík metódou STAR s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 nebol na požadovanej úrovni (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) stanovený len SD, kde bola tvorba IZ zaznamenaná na úrovni 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$. NAT testom sme zo skupiny sulfónamidov na úrovni MRL (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) stanovili všetky sledované látky okrem STZ, kde bola tvorba IZ zaznamenaná na úrovni 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

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, 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, 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, časťka 145*, 2003, 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, 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, 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, časťka 28*, 162 - 223.

Kontaktná adresa: Zuzana Gondová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, zuzana.gondov31@gmail.com

Konfirmácia rezíduí kokcidiostatík metódou kvapalinovej chromatografie v potravinových maticiach

Confirmation of coccidiostat residues in food matrices by liquid chromatography

Maďarová Michaela, Kožárová Ivona

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

Summary

The aim of our study was to create an overview of the methods used for the determination of coccidiostats residues in food matrices using liquid chromatography with different detection options. The residues of coccidiostats in foods of animal origin are mostly detected using the HPLC-UV detection. However, this method does not fulfil all requirements set for the simultaneous determination of coccidiostats in comparison with LC-MS/MS, which is a highly sensitive, and a broad-spectrum method for the simultaneous determination of coccidiostats residues with a single extraction procedure. The administration of coccidiostats to food-producing animals would be a risk transfer of coccidiostat residues to animal products, and thus the food chain. In order to protect the human health, the current legislation, Regulation of the European Parliament and the Council No. 37/2010 sets the maximum residue limits (MRL) for coccidiostats, Regulation (EC) No. 1831/2003 authorises coccidiostats as feed additives and Council Directive 96/23/EC requires Member States the control of residues of these substances in food matrices.

Keywords: *coccidiostats; detection; liquid chromatography; LC – MS/MS*

Úvod

Kokcidióza je závažné parazitárne ochorenie spôsobené jednobunkovými organizmami *Eimeria* a *Isospora*. Napriek používaniu antikokcidík ostáva kokcidióza jednou z chorôb, ktoré spôsobujú najväčšie straty najmä v produkcii hydiny. Najcitlivejšími druhmi sú kurčatá (Mortier et al., 2005). Kokcidióza je často pozorovaná v teplom a vlhkom prostredí s vysokou intenzitou chovu na malej ploche. Kokcidie sú nielen príčinou znižovania telesnej hmotnosti, ale aj poklesom produkcie vajec a v masívnom meradle môžu spôsobiť aj smrť (Shao et al., 2009). V dôsledku dlhodobého podávania antikokcidík počas života zvieratám, ktoré produkujú potraviny, je nutné kontrolovať hladiny ich rezíduí. Používanie kokcidiostatík ako preventívne opatrenie na kontrolu kokcidiózy v modernej produkcii hydiny je veľmi dôležité. Významne to prispieva k ochrane zdravia zvierat a starostlivosti o zvieratá prevenciou ochorenia, ktoré sa vyskytuje vo všetkých hospodárstvach. Bez kokcidiostatík by výroba za súčasných podmienok v Európe bola vážne ekonomicky ohrozená. Alternatívy v súčasnosti neponúkajú rovnaké výhody ako používanie kokcidiostatík ako kŕmnych doplnkových látok. Alternatívy sú očkovanie a rastlinné produkty (ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-2008EN.pdf).

Materiál a metodika

Z literárnych prameňov vyplýva, že vhodnou separačnou chromatografickou metódou na konfirmáciu rezíduí kokcidiostatík je kvapalinová chromatografia, ktorá je založená na rôznej afinite zložiek zmesi k stacionárnej (solid, liquid) a mobilnej fáze, ktorou je

kvapalina. S nástupom používania vysokotlakových čerpadiel sa vysokotlaková alebo vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – high performance liquid chromatography (HPLC) stala najpoužívanejšou metódou v stanovovaní kokcidiostatík. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia pracuje pri teplotách v rozsahu 20 – 60 °C. Tieto podmienky sú vhodné pre stanovovanie liečiv (Tkáčiková, 2010). Používané detektory pri detekcii analytu sú univerzálne: **diferenciálny refraktometer (RI)**, ktorý meria zmenu indexu lomu efluentu (analyt v eluente, ktorý preteká meracou celou) a mobilnej fázy, ktorá je v referenčnej cele. Zaznamenáva akýkoľvek typ látky. Selektívne detektory ako **spektrofotometrický detektor** meria žiarivý tok po prechode roztokom eluentu v prietokovej cele pri vlnovej dĺžke od 180 – 600 nm. Je vhodný pre stanovenie všetkých analytov, ktoré v tejto oblasti žiarenia vykazujú absorbciu. Univerzálne majú nižšiu citlivosť oproti selektívnym (Garaj a kol., 1987, Tkáčiková, 2010). **Detektor diódového poľa (photodiode-array, PDA, DAD)** sníma celé spektrum v reálnom čase bez prerušenia chromatografickej separácie. Spektrálne rozlíšenie je dané počtom diód na poli, pri spektrálnom rozsahu od 190 do 800 nm je pri 512 diódach spektrálne rozlíšenie 1,2 nm. Tieto detektory detegujú látky pri akejkoľvek zvolenej vlnovej dĺžke, umožňujú porovnávať snímané spektrá so zoznamom spektier, vypočítajú čistotu píku, čiže identifikujú látky (http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html).

Najcitlivejší je **fluorescenčný detektor (FLD)**, ktorý meria fluorescenčné žiarenie analytu fotonásobičom v kolmom smere na zdroj žiarenia. Jeho využitie je limitované schopnosťou analytov excitovať pri špecifickej vlnovej dĺžke a následne emitovať žiarenie tiež špecifickej vlnovej dĺžky, teda je vysoko selektívny. Deteguje látky v nízkych koncentráciách a je citlivejší ako UV detektor (Tkáčiková, 2010). Ďalší typ detektora je **voltamperometrický detektor**, ktorý meria limitný prúd medzi pracovnou (polarizovateľnou) a pomocnou elektródou v závislosti od vloženého potenciálu, pri konštantnom napätí. Analýzy sa realizujú pri veľmi malých objemoch (menej ako 1 µl), sú veľmi citlivé (Garaj a kol., 1987, Tkáčiková, 2010). Odparovací detektor **ELSD detektor** (Evaporative Light Scattering Detector) pracuje na princípe detekcie rozptylu laserového lúča na molekulách vzorky, ktoré sa od mobilnej fázy oddelia nebulizačným plynom (dusíkom) pri pôsobení vysokej teploty. Je citlivejší ako RI a vhodný na detekciu liečiv.

Hmotnostný spektrofotometer je komerčne prístupný a vhodný na stanovovanie akéhokoľvek analytu, ktorý je schopný tvoriť ióny (katióny alebo anióny). Je to zariadenie, ktoré produkuje prúd iónov vzorky, separuje ich podľa efektívnych hmotností m/z (m - hmotnosť, z - náboj), určuje ich relatívne zastúpenie a množstvo. Hmotnostné spektrum je závislosť iónového prúdu od pomeru relatívnej hmotnosti a počtu elementárnych nábojov iónu (m/z). Zapojením viacerých hmotnostných analyzátorov za sebou sa získa vysoko selektívny **tandemový hmotnostný analyzátor**, ktorý je najčastejšie používaným hmotnostným spektrometrom. Je zložený z dvoch hmotnostných analyzátorov typu quadrupól a kolíznej cely – tzv. triple quadrupól. Prvý analyzátor slúži ako hmotnostný filter, ktorý do kolíznej cely vpúšťa len ióny so vyšpecifikovanou hmotnosťou – prekurzorové (rodičovské) ióny, v závislosti od stanovovaného analytu a jeho molekulovej hmotnosti. V kolíznej hexapólovej cele sú vyšpecifikované ióny bombardované atómami argónu a fragmentujú na produktové (dcérske) ióny. Druhý hmotnostný analyzátor odfiltruje neželané ióny a do detektora vpustí len dcérske ióny s analytom presne vyšpecifikovanou hmotnosťou. V detektore

ióny atakujú konverznú dynódu, ktorá ďalšími fyzikálnymi procesmi konvertuje ióny až na fotóny, ktoré sú v detektore spočítané. Technika LC/MS/MS je konfirmačná. Tento typ detektora je definitívny, pretože analyty sú identifikované na základe ich molekulovej hmotnosti a štruktúry, a to je nespochybniteľné (Tkáčiková, 2010).

Poznáme aj **UPLC-MS/MS** (ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry), ktorá je založená na princípe využitia stacionárnej fázy obsahujúcej častice menšie ako 2,5 µm (kým HPLC kolóny obsahujú častice vo veľkosti 3 až 5 µm). Je pomerne nová technika, ktorá dáva nové možnosti v kvapalinovej chromatografii, pokiaľ ide o zníženie času a spotreby rozpúšťadiel (Gaikwad et al., 2010). Ďalej **HRLC-ToF/MS** (high resolution liquid chromatography time of flight mass spectrometry), ktorý meria čas, za ktorý prejde ión z iónového zdroja do detektora, ktorý je zvyčajne umiestnený 1 až 2 m od zdroja. Ak častice majú rovnaký náboj, kinetická energia bude rovnaká a ich rýchlosť bude závisieť iba od ich hmotnosti. Ťažšie častice dosiahnu nižšie rýchlosti, ľahšie ióny dosiahnu detektor ako prvé (http://en.wikipedia.org/wiki/Time-of-flight_mass_spectrometry). Používaná je aj **HPLC-ESI-MS/MS** (high performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry), kde kvapalina obsahujúca analyt, ktorý chceme stanoviť, je rozptýlený elektrosprejom do jemného aerosólu. Je to najpopulárnejšia MS technika, ktorá je vhodná na analýzu polárnych molekúl, pričom si nevyžaduje derivatizáciu vzorky (http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospray_ionization#Liquid_chromatography.E2.80.93mass_spectrometry_.28LC-MS.29).

Záver

Vývoj metód v posledných rokoch prešiel takým technickým zdokonalením, že hmotnostná spektrometria je považovaná za rýchlu, citlivú, konfirmačnú a aj cenovo prístupnú metódu determinácie viacerých tried kokcidiostatík v rôznych matriciach. Z literárnych prameňov vyplýva, že stále viac do popredia sa dostávajú techniky UPLC-MS/MS, HRLC-ToF/MS a HPLC-ESI-MS/MS. V záujme ochrany zdravia spotrebiteľov pred rezíduami kokcidiostatík v potravinách živočíšneho pôvodu Európska komisia bude naďalej monitorovať vývoj nových látok a metód zameraných na detekciu kokcidiostatík.

PodĎakovanie

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

Literatúra

<http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-2008EN.pdf> (2008-5-5).

http://en.wikipedia.org/wiki/Time-of-flight_mass_spectrometry (2013-2-27).

http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospray_ionization#Liquid_chromatography.E2.80.93mass_spectrometry_.28LC-MS.29 (2013-6-7).

http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html

GAIKWAD, P. V., SAWANT, S. D., GHANTE, M. R. AND MUNOT, N. M.: Ultra Performance Liquid Chromatography: A Recent Novel Development In HPLC. *Pharmacie Globale (IJCP)* 2010, 2 (08). ISSN 0976-8157

GARAJ, J., BUSTIN, D. A HLADKÝ, Z.: *Analytická chémia*. Bratislava : Alfa SNTL, 1987, 121-129.

MORTIER, L., DAESELEIRE, E. AND PETEGHEM, C. V.: Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B*, 820, 2005, 261–270.

TKÁČIKOVÁ, S.: Využitie metódy HPLC pri stanovení hladín rezíduí vybraných moderných antikokcidíí v potravinovom reťazci. Dizertačná práca. Košice : UVLF v Košiciach, 2010, 126 s.

SHAO, B., WU, X., ZHANG, J., DUAN, H., CHU, X. AND WU, Y.: Development of a rapid LC-MS-MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia*, 69, 2009, 1083-1088.

Kontaktná adresa: Michaela Maďarová, Mgr., Katedra hygieny a technológie mäsa, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, mad.michaela@gmail.com

Nedestruktivní hodnocení kvality vajec v průběhu jejich skladování

Non destructive evaluation of the egg quality during their storage

¹Strnková Jana, ¹Nedomová Šárka, ²Buchar Jaroslav

¹Ústav technologie potravin, Mendelova univerzita, Brno

²Ústav techniky a automobilové dopravy, Mendelova univerzita, Brno

Summary

Non destructive method of the egg quality evaluation is described. This method is based on the non destructive impact of the egg. The loading force as well as the response function have been recorded. The eggs have been examined during 8 weeks. It has been found that the eggshell strength is not affected by the time of the egg storage. This time influences the response of the eggshell. This response, i.e. eggshell surface displacement has been studied both in the time and frequency domain. The frequency representation is characterized by a maximum. The corresponding frequency is called as the dominant (resonance) frequency. This frequency increases with the time of the storage.

Keywords: eggshell; impact loading; eggshell displacement; storage time; resonance frequency

Úvod

Kvalita vajec během skladování je většinou sledována pomocí stanovení tzv. Haughových jednotek. Tato veličina je určována na základě destruktivních zkoušek vajec. Z tohoto důvodu jsou hledány nedestruktivní metody sledování změn vlastností vajec, zejména pak vaječných tekutin, které jsou výraznými prvky uplatňovanými v potravinářském průmyslu (Karouri *et al.*, 2006). Změny během stárnutí vedou ke změně konzistence bílku, zvyšování pH, snížení pevnosti membrán a k zvýšení obsahu vody ve žloutku. Intenzita těchto změn může být popsána pomocí reologických vlastností vaječných tekutin. Touto problematikou se zabývá např. práce Severy *et al.* (2010), kde byly sledovány změny reologických vlastností žloutků v průběhu skladování při různých teplotách. Změny reologických vlastností vaječných tekutin se mj. uplatňují při dynamickém namáhání vajec, kdy dochází k interakci mezi vaječnou kapalinou a skořápkou. Na základě těchto skutečností byla v rámci dané práce sledována možnost detekce změn vlastností vaječných kapalin pomocí odezvy vaječné skořápky na nedestruktivní ráz. Pro tento účel byla použita metoda vyvinutá v práci Nedomové *et al.* (2009), kdy je vejce zatěžováno rázem duralového razníku a je zaznamenávána odezva skořápky jako časová závislost výchylky skořápky v různých bodech. Tato metoda, či její obdobné verze, byly a jsou s úspěchem aplikovány pro hodnocení pevnosti vaječných skořápek a pro detekci trhlin (Lin *et al.*, 2009).

Materiál a metody

Nedestruktivní rázové zatěžování bylo realizováno pomocí metody, kdy je vejce uloženo v bloku polyuretanové pěny, což zaručuje minimální vliv uložení na výslednou odezvu a současně opakovanou přesnost tohoto uložení. Vejce je zatěžováno dopadem duralové tyče kruhového průřezu délky 200 mm, průměru 6 mm. Na tyči je nalepen polovodičový tenzometr, který umožňuje snímat časový průběh síly v místě kontaktu tyč – povrch vaječné skořápky. Tyč je upevněna na bifilárním závěsu a výška dopadu, a tím i dopadová rychlost, může být prakticky spojitě měněna.

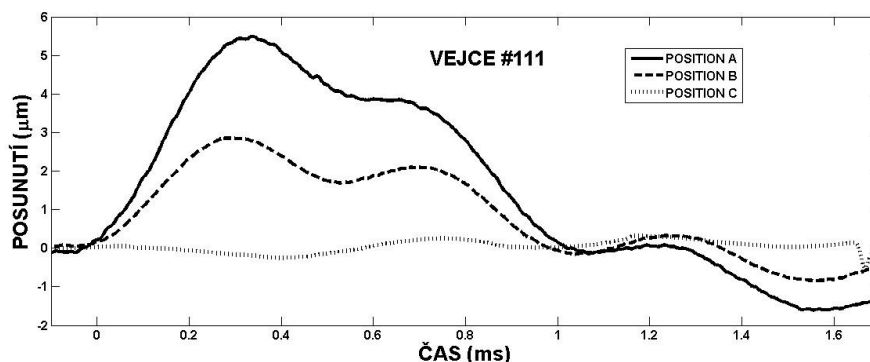
Pro experiment byla použita vejce, která byla zatěžována dopadem zmíněného razníku na tupý konec, tzn. na oblast vzduchové bubliny, z výšky 10 mm, což zaručovalo, že nedojde k poškození skořápky. Výchylka skořápky byla snímána ve třech bodech podél poledníku. Bod A byl vzdálen 5 mm, bod B 20 mm a bod C 35 mm od místa dopadu razníku. Vejce byla skladována při 7 °C během 8 týdnů.

Výsledky a diskuze

Na obr. 1 je uveden příklad časového průběhu posunutí povrchu skořápky. Je zřejmé, že výchylka povrchu vykazuje značný útlum. Z výsledků vyplývá, že doba skladování neovlivňuje průběhy rázových sil, tzn., že pevnostní charakteristiky vaječné skořápky nejsou dobou skladování ovlivněny. Totéž platí o průběhu výchylky povrchu skořápky v bodě A, který je v místě, kde se pod skořápkou vyskytuje vzduchová bublina. Na druhé straně výchylky v bodech B a C se s dobou skladování výrazně mění. Tyto změny je obtížné popsat v časové oblasti. Z tohoto důvodu je vhodnější popsat odezvu ve frekvenční oblasti. Základem tohoto přístupu je Fourierova transformace, kdy časové funkci, např. $f(t)$ přiřazujeme její spektrální funkci $F(\omega)$ pomocí vztahů uvedených např. v práci Stein a Stakarchi (2003):

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt.$$

Je zřejmé, že spektrální funkce je obecně komplexní a je tak charakterizována amplitudou a fází.



Obrázek 1: Průběhy výchylek povrchu vaječné skořápky po prvním týdnu skladování.

Závislost amplitudy spektrální funkce na frekvenci je charakterizována maximem. Frekvenci ω_r , při které dochází k tomuto maximu, nazýváme rezonanční, nebo též dominantní frekvenci. Analýza výsledků ukazuje, že velikost této frekvence nezávisí na poloze B a C. Její velikost roste s dobou skladování pomocí funkce:

$$\omega_k (s^{-1}) = 80 + 121.7t^{0.75},$$

kde t je doba skladování v týdnech.

Závěr

Poznatky, které byly získány pro 48 vajec, ukazují na to, že použitá metoda nedestruktivního rázového zatěžování umožňuje stanovit dobu skladování nedestruktivním způsobem. Je zřejmé, že změny odezvy skořápky během skladování jsou důsledkem změn vlastností vaječných tekutin. Je tedy oprávněné očekávat, že po

další analýze, založené na srovnání s Haughovými jednotkami, resp. reologickými parametry, bude možné stanovit i kvalitu vaječných tekutin. Tento směr výzkumu bude náplní dalších prací.

Poděkování

Studie byla podpořena projektem Interní grantové agentury AF MENDLU č. IP 2/2013.

Literatura

KAROUI, R.; KEMPS, B.; BAMELIS, F.; KETELAERE, B.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. Methods to evaluate egg freshness in research and industry: A review. *European Food Research and Technology A*. 2006, vol. 222, no. 5-6, s. 727-732.

LIN, H.; ZHAO, J. W.; CHEN, Q. S.; CAI, J. R.; ZHOU, P. Eggshell crack detection based on acoustic impulse response and supervised pattern recognition. *Czech Journal of Food Science*. 2009, vol. 27, no. 6, s. 393-402.

NEDOMOVÁ, Š.; TRNKA, J.; DVOŘÁKOVÁ, P.; BUCHAR, J.; SEVERA, L. Hen's eggshell strength under impact loading. *Journal of Food Engineering*. 2009, vol. 94, no. 3-4, s. 350-357.

SEVERA, L.; NEDOMOVÁ, Š.; BUCHAR, J. Influence of storing time and temperature on the viscosity of an egg yolk. *Journal of Food Engineering*. 2010, vol. 99, no. 2, s. 266-269.

STEIN, E. M.; SHAKARCHI, R. *Fourier analysis: an introduction*. Princeton: Princeton University Press, c2003, 311 p. ISBN 06-911-1384-X.

Kontaktní adresa: Jana Strnková, Ing., Ústav technologie potravin, AF MENDELU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, jana.strnkova@mendelu.cz

Vývoj HACCP na Slovensku a jeho vplyv na fungovanie systémov zabezpečenia hygieny potravín živočíšneho pôvodu

Development of HACCP in the Slovak Republic and its impact on functionality of hygiene management systems in production of food of animal origin

Toropilová Júlia, Bystrický Pavel, Brenesselová Martina

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF Košice

Summary

The study aims on to search functionality of the HACCP systems applied throughout the Slovak Republic and the impact of understanding and implementation of HACCP systems in the food industries and official controls as failures can jeopardise to a failure of system and to endanger food safety not only at the local level but also at the national level. (e.g. dioxins in Belgium, Germany, 1999 and 2011, 2012, Escherichia coli O104: H4 in Germany 2011, loss of control over the meat origin when horse meat or pork declared as beef). Changes in legislation and economic pressures affect motivation and thus also the functionality of HACCP systems. Therefore it is necessary to monitor and evaluate functionality not only of the individual HACCP systems but also the overall effect of mutually connected systems providing protection for the whole country. Feedback available through this analysis can increase the protection level of the population against food associated hazards.

Keywords: HACCP; GMP; food safety; foods of animal origin

Úvod

HACCP – systém, ktorý identifikuje, vyhodnocuje a kontroluje riziká významné pre bezpečnosť potravín je užitočným nástrojom pre prevádzkovateľov takých potravinárskych podnikoch, ktoré sa zaoberajú operáciami, u ktorých je pravdepodobnosť, že ak sa nesprávne vykonávajú, môže sa vyskytnúť nebezpečenstvo v potravinách¹. Tento systém na zabezpečenie výroby zdravotne bezchybných potravín sa postupným spracovávaním do právnych úprav stal celosvetovým štandardom². Na Slovensku bol HACCP zavádzaný vo väčšom rozsahu už od roku 1996, no jeho zavedenie sa stalo povinnou súčasťou správnej výrobnéj praxe a teda aj predmetom kontroly kontrolných orgánov od januára roku 2000^{3,4}. Od roku 2006 nadobudol účinnosť vo všetkých európskych štátoch tzv. „hygienický balíček“. Je to súbor štyroch nariadení Európskeho parlamentu a Rady^{5,6,7,8,9}. Tieto ustanovujú, že výrobcovia potravín sú zároveň zodpovední za zdravotnú bezpečnosť nimi produkovaných potravín a musia zaviesť systém zabezpečenia hygieny výroby zložený na princípoch HACCP.

Ako každá krajina, aj Slovensko, má svoje špecifiká, ktoré podmieňujú efektivitu systémov zabezpečujúcich kontrolu hygieny pri výrobe potravín (SVP, HACCP) nielen na miestnej úrovni vo vzťahu ku domácemu spotrebiteľovi, ale aj ku zahraničnému obchodu. Kombinácia požiadaviek správnej praxe HACCP spoločne s požiadavkami Správnej hygienickej praxe a Správnej výrobnéj praxe prešli viacerými legislatívnymi úpravami. Vytvárajú prvky potravinovej bezpečnosti a poskytujú nástroje a metódy zaistenia potravinovej bezpečnosti¹.

Potreba riešenia problému

Cieľom plošného zavedenia HACCP do systémov produkcie je zvýšenie zdravotnej bezpečnosti potravín cestou preventívnych opatrení. Po prekonaní počiatkových ťažkostí s tvorbou a zavádzaním HACCP vystupuje do popredia potreba jeho verifikácie ako na miestnej, tak aj na štátnej úrovni. Dôležitým ukazovateľom funkčnosti HACCP systému je výskyt alimentárnych ochorení. Na základe zverejnených správ MP SR o zoonózach a pôvodcoch zoonóz za roky 2010 a 2011 možno situáciu na úrovni produkcie potravín na Slovensku zhodnotiť za veľmi dobrú¹⁰. Výskyt pôvodcov ochorení z priemyselne vyrobených potravín bol ojedinelý. Vzplanutí alimentárnych ochorení bolo síce relatívne mnoho, ale nálezy v potravinách boli zriedkavé a spôsobené najmä pochybeniami pri príprave a podávaní potravy.

Aj keď HACCP systém teoreticky pokrýva celý potravinový reťazec od produkcie až po distribúciu, miera samotného porozumenia systému a tým spoľahlivosti tvorby a implementácie HACCP systému značne kolíše. Dôsledkom toho môže byť prienik nebezpečenstiev do potravín v miestach ich vzájomného prepojenia. Preukázaná funkčnosť systémov na zabezpečenie hygieny výroby potravín je zámienkou čoraz viac ustupovať ekonomickým tlakom cestou podhodnotenia rizika a tým aj potreby jeho kontroly. Postupom času sa tiež môže zmeniť vnímanie HACCP systému. Preventívny prístup ku kontrole nebezpečenstiev sa nahrádza rutinnou kontrolou už implementovaných opatrení a preventívny kontrolný systém sa nenápadne mení na SVP čím sa zvyšuje pravdepodobnosť prieniku zdravotného nebezpečenstva, ktoré následne môže ohroziť zdravie konzumenta. Za povšimnutie stojí, že takéto občasné vzplanutia alimentárnych ochorení poukazujú, že zdroje nebezpečenstva prenikajú najmä tam kde, kde to umožnil ľahostajný prístup k HACCP systému, kde sa pri styku HACCP systémov v potravinovom reťazci vyskytol neošetrený krok a kde šetrenie na kontrolných úkonoch pootvorilo dvere nepoctivým producentom a obchodníkom.

Globalizácia a voľný pohyb tovaru zvýšili v poslednom období riziko dovozu potenciálne nebezpečných potravín. Sú známe prípady zo zahraničia ako je prienik mikroorganizmov do potravín *E.coli* O104:H4 v Nemecku (2011), prienik dioxínov v Belgicku (1999) a v Nemecku (2011, 2012) a strata kontroly nad pôvodom mäsa a tým aj nad asociovanými zdravotnými nebezpečenstvami (bravčové a konské mäso predávané ako hovädzie). Vzniká tak tlak na spracovateľov a distribútorov dovážaných surovín a potravín, aby prehodnotili svoje postupy na zabezpečenie vysledovateľnosti potravín v rámci celého potravinového reťazca.

Cieľom projektu je monitorovať funkčnosť individuálnych plánov HACCP systémov nielen v mieste produkcie, ale aj celkového efektu vzájomne prepojených a spoločne fungujúcich systémov, analyzovať zmeny ktoré sa v tejto oblasti udiali a pokúsiť sa vyvodiť ich dopad na funkčnosť systémov zabezpečenia hygieny výroby a navrhnúť riešenia umožňujúce zvýšiť mieru zdravotnej bezpečnosti potravín cestou efektívnejšej prevencie prieniku nebezpečenstva.

Plánované použitie materiálov a metodika

Aby bolo možné vytýčené ciele dosiahnuť, je potrebné získať a spracovať veľké množstvo informácií. Najskôr bude potrebné analyzovať relevantné odborné a legislatívne texty. Posúdenie vzťahu producentov potravín k HACCP a posúdenie prepojenia jednotlivých systémov s ďalšími účastníkmi v produkčnej oblasti a kontrolnými orgánmi je po dohode s producentmi možné zistiť formou dotazníkov.

Detaily analýzy rizika a kontroly identifikovaných nebezpečenstiev a tiež nadväznosť na správnu výrobnú prax, je potrebné získať cestou osobne a to pomocou auditov v mieste produkcie potravín. Keďže ide o dôverné informácie a je potrebné počítať s opatrnosťou producentov potravín, musíme rátať s tým, že bude obtiažne vykonať audit na reprezentatívnej vzorke zavedených systémov. Dôležitá je spätná väzba pre zber informácií z prostredia kontrolných orgánov. Ako použiteľné sa javia byť publikované údaje o výskyte a charaktere alimentárnych ochorení z prostredia kontrolných orgánov a zo zdravotných inštitúcií, pričom je nevyhnutné rozlišovať alimentárne ochorenia spôsobené nebezpečenstvami prítomnými vo vyrobených potravinách od ochorení spôsobených nebezpečenstvami prenesenými do potravín pri ich príprave a podávaní. Dôležitým zdrojom informácií vo vzťahu k funkčnosti HACCP na národnej a nadnárodnej úrovni sú tiež informácie o identifikovaných potravinových nebezpečenstvách zverejnených cez RAS a EFSA.

Záver

Analýza funkčnosti HACCP systému ako ochrany konzumentov na úrovni produkcie potravín a na úrovni krajiny posluží ako jeden z overovacích postupov funkčnosti HACCP a umožní lepšie využitie konceptu proaktívneho zabezpečovania zdravotnej bezpečnosti potravín. V prípade potreby bude možné navrhnúť opatrenia na zlepšenie funkčnosti systému a prípadne aj poukázať na ekonomické dopady z takého zlepšenia vyplývajúce.

Literatúra

- ¹ CAC (Codex Alimentarius Commission) 2001. Food Hygiene Basic Texts. 2nd ed. Food and Agriculture Organization / World Health Organization, Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/006/y4743e/y4743e0i.htm>, <http://www.sanielit.sk/>
- ² POLÁK, Róbert. Čo sa skrýva za skratkou HACCP. Všeobecne o HACCP [online]. 2008, Január [cit.20.2. 2013]. <http://www.poling.sk/haccp.php>.
- ³ ZÁKON NÁRODNEJ RADY SLOVENSKEJ REKUBLIKY č.152/1995 Z.z.
- ⁴ VÝNOS MINISTERSTVA PÔDOHOSPODÁRSTVA SLOVENSKEJ REPUBLIKY A MINISTERSTVA ZDRAVOTNÍCTVA SLOVENKEJ REPUBLIKY č.577/1998-100.
- ⁵ NARIADENIE EUROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 852/2004, Úradný vestník EÚ, L 139, 30.4.2004.
- ⁶ NARIADENIE EUROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004. Úradný vestník EÚ, L 139, 30.4.2004.
- ⁷ NARIADENIE EUROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 854/2004. Úradný vestník EÚ, L 139, 30.4.2004.
- ⁸ NARIADENIE EUROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 882/2004. Úradný vestník EÚ, L 191, 28.5.2004.
- ⁹ SMERNICA EUROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2004/41/ES. Úradný vestník EÚ, L 157, 30.04.2004.
- ¹⁰ Správa o zoonózach a pôvodcoch zoonóz v Slovenskej republike za rok 2011. [online]. Vydalo Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja SR. 2011, [cit. 2013-18-3]. ISBN 978-80-970552-5-7. <http://www.mpsr.sk/sk/index.php?navID=506>.

Kontaktná adresa: Júlia Toropilová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, julia.toropilova@gmail.com.

Prebiotické sladidlo Tagatosa

Prebiotic sweetener Tagatose

Olšovcová Zuzana, Vespalcová Milena

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Brno

Summary

The tagatose is a new sweetener discovery a few years ago. Structure of tagatose is like fructose, it is L-epimer derived from D-fructose. Properties is like saccharose; same appearance, crystalic structure and sweetness. Apart from these simple carbohydrates is ranked among tagatosa non-nutrition sweeteners. The foods contain tagatose are used like prevention to obesity, diabetes type two, hyperglycemia, anemia and haemophilia. Tagatose is processed by metabolic as in the small intestine, where it is transported to the liver, but also in the colon, which acts as a soluble fermentable fiber for microflora. Tagatose are used as sweetening to food like cereals, soft drinks, ice cream, confectionery, toppings etc. Tagatose is used like sweetening to toothpaste and mouthwash. Problem with production of tagatose is financial side, therefore the properties tagatose are not use as prebiotic sweetener.

Keywords: tagatose; prebiotic; sweetener; applications; HPLC

Úvod

Systematický název tagatosa je (3S,4S,5R)-1,3,4,5,6-pentylhydroxy-hexan-2-on nebo také D-lyxo-2-hexulosa, ale můžeme říci, že jde o L-epimer odvozený od D-fruktosy. Svými senzoryckými vlastnostmi je velmi podobná sacharose a to jak svou sladkou chutí, krystalickou strukturou či bílou barvou. Na rozdíl od sacharosa nese jen 33 % její sladivosti a řadíme ji tak do sladidel nízkokalorických. Stejně jako ostatní monosacharidy je i tagatosa redukující sacharid, který se může účastnit Maillardových reakcí.

Tagatosa je považována za prebiotikum. Hlavním požadavkem tudíž je dosažení tlustého střeva a to tagatosa splňuje. Do tlustého střeva přechází asi 80-85 % zkonsumované tagatosa. Tam je fermentována mikroflórou, která produkuje krátkořetězcové mastné kyseliny. Zbytek je absorbováno v tenkém střevě a dále transportováno do jater. V játrech je zpracována podobnou cestou jako D-fruktosa.

Tagatosa je navržena jako sladidlo do potravin typu snídanových cereálií, sycených a nesycených nealkoholických nápojů, zmrzlin, cukrářské výrobků a polev. Lze ji ovšem aplikovat i do zubních past.

Výroba tagatosa může probíhat různými způsoby, podle poptávky nebo čistoty. Základní postup výroby je produkce z laktosy. Tento proces probíhá v několika krocích od základní suroviny až po velmi čistou krystalickou D-tagatosu. Nejprve je laktosa enzymově hydrolyzována laktasou na D-galaktosu a D-glukosu. Frakce D-galaktosa je převedena na D-tagatosu L-arabinoisomerázou nebo alkalického prostředí hydroxidu vápenatého ve spojení s chloridem vápenatým. Tímto postupem lze připravit krystalickou tagatosu s čistotou 99 %. Dalším postupem výroby tagatosa je konverze D-talitolu prostřednictvím bakterií. Z D-altrosy je katalytickou redukcí připraven D-talitol, který je dále rychle oxidován bakteriemi *Acetobacter suboxydans* na D-tagatosu. Takto vyrobená D-tagatosa má čistotu v rozmezí 74-85 %.

Problémem produkce a průmyslové výroby tagatosy je stránka finanční. Jiným problémem, legislativním, je nedostatečný analytický aparát pro analýzu reálných vzorků obsahující tagatosu. Z těchto důvodů se tagatosa prozatím jako náhradní sladidlo s prebiotickými vlastnostmi v mnoha zemích nevyužívá.

Obsahem prezentované práce je krátká pilotní studie možnosti využít kapalinové chromatografie k separaci modelových směsí jednoduchých sacharidů obsahujících tagatosu.

Materiál a metoda

Analyzované modelové směsi jednoduchých sacharidů byly připraveny ze sloučenin uvedených v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Informace o sacharidech.

Sacharid	Čistota	Mr	Firma
D-glukosa	99,8	180,16	Penta
D-fruktosa	99,5	180,16	ROTH
sacharosa	99,8	342,30	Lach-Ner spol. s r. o.
D-tagatosa	99,0	180,16	Sigma-Aldrich spol. s r. o.

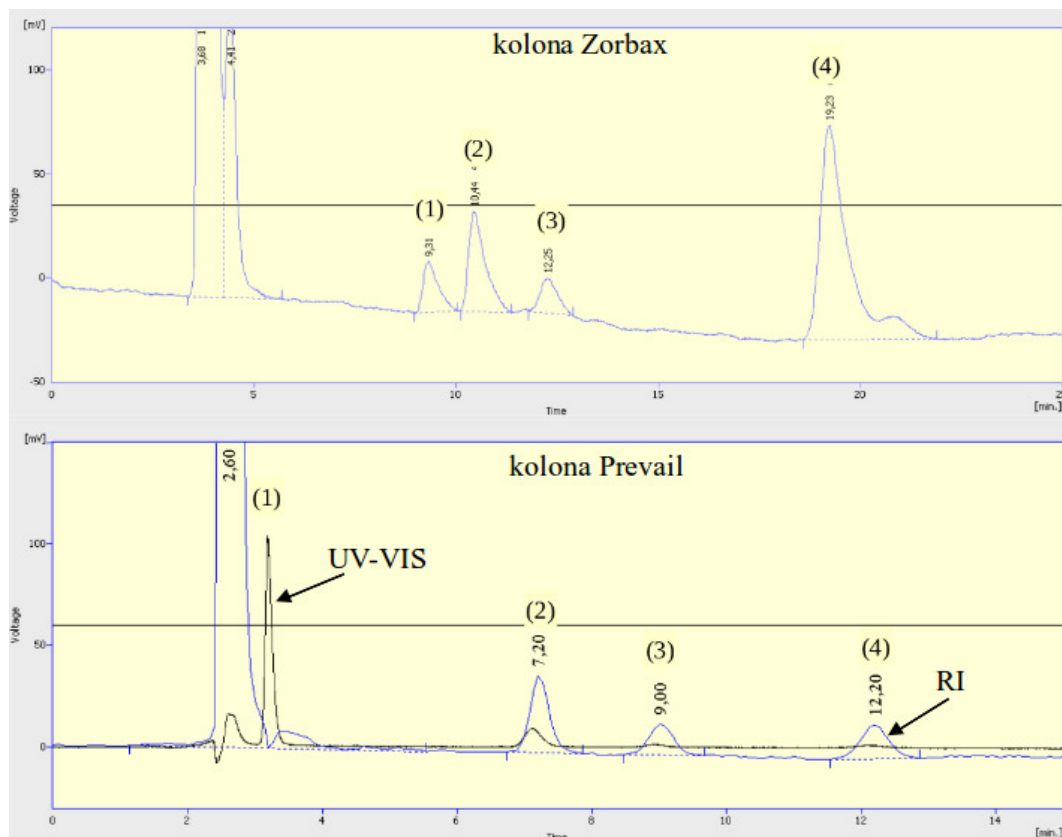
Pro separaci směsi sacharidů byly testovány dvě chromatografické kolony plněné odlišnými sorbenty. První byla kolona C18 Zorbax Carbohydrate, 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm), Agilent Technologie, USA. Jako druhá byla použita ionexová kolona Prevail Carbohydrate ES, 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm), Grace Davison Discovery Sciences, USA.

Teplota kolony v termostatu byla ustálena na 30°C. Hlavní detekcí byl refraktometrický detektor, jako kontrolní UV-VIS detektor s vlnovou délkou 190 nm. Všechny vzorky byly rozpuštěny v čisté demineralizované vodě. Do mobilní fáze o složení acetonitril:demineralizovaná voda v objemovém poměru 80:20 byla směs sacharidů, dávkována v nástřikovém objemu 5 µl. Koncentrace každého sacharidu v modelové směsi byla vždy 1 g.l⁻¹. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml.min⁻¹.

Výsledky a diskuze

Na počátku byla vždy provedena optimalizace metody pro každou kolonu. Výsledkem byly shodné separační podmínky pro obě již zmíněné kolony. Kritériem pro určení vhodnosti kolony byla brána doba analýzy.

Z výsledných chromatogramů, viz *Obrázek 1*, je patrné, že na koloně Zorbax je výsledná analýza příliš dlouhá a s horšími separačními parametry. Na ionexové koloně Prevail byla doba analýzy kratší s lepšími parametry. Pro separaci na této koloně byl použit kontrolní UV-VIS detektor, protože retenční čas D-tagatosy byl velmi blízký mrtvému času kolony.



Obrázek 1: Porovnání výsledných chromatogramů separace směsi sacharidů D-tagatosa (1), D-fruktosa (2), D-glukosa (3) a sacharosa (4).

Závěr:

Tato pilotní studie o možnosti využití kapalinové chromatografie k separaci směsi sacharidů obsahující tagatosu byla prozatím provedena se dvěma chromatografickými kolonami různého typu. Přičemž jako kritérium pro vhodnost dané kolony byla brána doba každé analýzy. Tento požadavek lépe splňuje kolona ionexového typu Prevail a lze ji doporučit jako kolonu vhodnou pro analýzu a stanovení tagatosa a jednoduchých sacharidů.

Literatura

ADACHI, S.. *Improved chemical method for syntesis of tagatose from galactose. Animal husbandry.* 1997, s. 33-36.

CHOI, J.. *Business proposal of technology transfer: manufacturing method of tagatose, a functional sugar-substitute, using galactose isomerase (Gali).* R a D Centre. 2000, č. 10, s. 3-7.

Compendium of food additive specifications. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003, viii, 166 p. ISBN 92-510-5002-3.

CORTI, A.. *Low-calorie sweeteners: present and future : World Conference on Low-Calorie Sweeteners, April 25-28, 1999, Barcelona, Spain.* New York: Karger, c1999, xiv, 244 p. ISBN 38-055-6938-6.

ČOPIKOVÁ, J.. *Náhrada sacharosu a tuků v čokoládových a nečokoládových cukrovinkách. Chemické listy.* 1999, č. 93, s. 3-14.

Evaluation of certain food additives and contaminants: fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization, 2002, x, 171 p. Technical report series (World Health Organization), 909. ISBN 92-412-0909-7.

KAI, T. M.. *Initial assesment report: Aplication A472: D-tagatose as a novel food.* *Food standards.* 2002, 04/03, s. 5-9.

KAWAMURA, Y.. *D-tagatose: Chemical a technical assesment.* *CTA.* 2004, č. 61, s. 1-3.

LEVIN, G.. *Tagatose, the new gras sweetener and health product.* *Journal of medicinal food.* 2002, č. 1, s. 1-19.

NABORS, L. O.. *Alternative sweeteners.* New Yourk: Marcel Dekker, 2001. 3. ISBN 08-247-0437-1.

OH, D. K.. *Tagatose: Properties, application and biotechnological processes.* *Appl microbial biotechnology.* 2007, č. 76, s. 1-8.

TAYLOR, P., FASINA, O., BELL, N.. Physical properties and consumer liking of cookies prepared by replacing sucrose with tagatose. *Journal of food science: Senzory and food quality.* 2008, s. 145-152.

SALWAY, J., GREENSTEIN, B.. *Medical biochemistry at a glance.* 2nd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub., 2006, 144 p. ISBN 14-051-1322-7.

Kontaktní adresa: Zuzana Olšovcová, Ing., Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, xcolsovcova@fch.vutbr.cz

Vliv přidavku ječných krup na obsah nerozpustné vlákniny a objem celozrnného pečiva

The influence of the addition of peeled barley on the amount of insoluble dietary fibre and the volume of wholemeal bakery products

Elišová Martina, Ošťádalová Martina, Čáslavková Petra, Bartl Pavel,
Tremlová Bohuslava

Ústav vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

This work deals with the influence of the addition of peeled barley on the properties of wholemeal bakery products which made from three types of wholemeal flour (wholemeal wheat, spelt and rye flour). Using modified baker's attempt were made wholemeal bakery products with an addition of 10% and 20% milled peeled barley. Wholemeal bakery products with 80 % wholemeal flour and 20 % smooth wheat flour were made to compare. The samples were marked as a controls. For final bakery products, the influence of the addition of peeled barley on the amount of insoluble dietary fiber and the volume of wholemeal bakery products. The addition of 20% peeled barley decreased volume (statistically significant $p < 0.05$) of the bakery products compared to control samples. The volume of wholemeal bread was change according to increasing concentrations of peeled barley and using flour. The amount of dietary fiber were decrease after the addition of peeled barley compared to the control.

Keywords: whole meal flavour; barely; fiberback; NIR-spectrofotometry

Úvod

Celozrnné pečivo je dle vyhlášky č. 333/1997 Sb. pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta definováno jako pečivo, které obsahuje nejméně 80 % celozrnných mouk z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků nebo jim odpovídající množství upravených obalových částic z obilky. Obliba celozrnného pečiva se zvyšuje u konzumentů, zejména díky vyššímu obsahu vlákniny, minerálních látek či vitaminů. Všechny tyto zdraví prospěšné látky nalezneme v obalových vrstvách obilky, které jsou u jemně mletých mouk odstraňovány. Mezi základní suroviny-používané v pekařské technologii, patří mouka pšeničná (*Triticum aestivum*) a žitná (*Secale cereale*) o různém stupni vymletí. Stupeň vymletí je definován obsahem minerálních látek. V poslední době se v tržní síti objevují výrobky obsahující mouku z pšenice špaldy. Pšenice špalda (*Triticum spelta*) je z hlediska chemického složení podobná pšenici seté (*Triticum aestivum*), ale vyznačuje se vyšším obsahem nutričně významných látek (Lacko-Bartošová, Otepka, 2001). Důležitým ukazatelem mouk pro výrobu pečiva je pekařská jakost, která je dána množstvím a jakostí pšeničných bílkovin, viskoelastickými vlastnostmi lepku a enzymatickou aktivitou zrna, která je u jednotlivých mouk odlišná. Hlavní a nejdůležitější zkouškou technologické jakosti mouk pro pekárenské použití je pekařský pokus (Koč, 2001). V návaznosti na současný trend je z nutričního pohledu významný i obsah hrubé vlákniny (Whole Grains Council pushes action plans to increase whole grain intakes, 2006). V poslední době se do pečiva přidávají netradiční obilniny, které by mohly zvýšit nutriční hodnotu výrobku. Jednou z potenciálních cereálií by mohl být i ječmen setý (*Hordeum vulgare*). Pro použití ječmene na pekařské výrobky i pro přímou spotřebu je významné,

že se využívá příznivého vlivu ječné vlákniny a to zejména účinné složky ječných β -glukanů na trávicí systém, na snižování hladiny krevního cholesterolu a na hladinu krevní glukózy (Smrž a kol. 2012). Cílem této práce je posoudit vliv ječných krup na objem a obsah hrubé vlákniny celozrnného pečiva.

Materiál a metodika

Pro analýzy byly použity 3 celozrnné mouky, pšeničná mouka hladká a ječné kroupy. Jednalo se o celozrnnou pšeničnou mouku (dále jen CPM), celozrnnou špaldovou mouku (dále jen CŠM) a celozrnnou žitnou mouku (dále jen CŽM) společnosti PRO-BIO ČR. Ječné kroupy (Penam, ČR) byly pomlety na mouku stejné hrubosti (Mlýnek FOSS Cemotec™ 1090, Höganäs, Sweden). Pro výrobu celozrnného pečiva jsme vycházeli z modifikovaného pekařského pokusu firmy Penam a.s. pro celozrnné pečivo. Tento pekařský pokus je založen na přímém vedení těsta („zaráz“). Do těchto celozrnných mouk byly přidány semleté ječné kroupy (Penam, ČR) v koncentraci 10 % a 20 %. Postup je uveden v obrázku č. 1. Rovněž byly upečeny vzorky z celozrnných mouk s přídatkem 20 % pšeničné hladké mouky a označeny jako kontrolní. Po upečení byl u všech vzorků stanoven objem pečiva a obsah hrubé vlákniny. Objem pečiva byl stanoven pomocí odměrného válce metodou s řepnými semínky. Obsah hrubé vlákniny byl zjišťován na přístroji FiberBag (Gerhardt, GmbH & Co, Germany).

Výsledky a diskuze

Vliv na objem pečiva má především množství a vlastnosti bílkovin. Je všeobecně známo, že bílkoviny pšenice jsou v rostlinné říši zcela unikátní, protože jsou schopny při smísení vodou navzájem reagovat pomocí disulfidických vazeb a tvořit biopolymer – lepek. Lepek vytváří vnitřní strukturu („kostru“) těsta, která podmiňuje technologickou zpracovatelnost těsta a objem pečiva. Dalším parametrem majícím vliv na objem pečiva je škrob. Konkrétně jeho vaznost a poškození škrobu a v neposlední řadě také enzymatická aktivita. Objem pečiva je kromě mechanické pevnosti těsta dán schopností mouky konvertovat škrob na cukry, které jsou kvasnicemi zpracovány na CO₂. Množství vytvořeného plynu společně s vlastnostmi těsta tak ovlivňuje množství a velikost bublin ve stříde chleba a tím i jeho objem (Sedláček, 2013). Celozrnné pečivo z pšeničné mouky nabývá většího objemu (CPM – 1,64 l, CŠM – 1,83 ml) než u mouky žitné (CŽM – 0,95 l). Lze konstatovat, že pečivo vyrobené z pšeničné mouky tvoří dobře zpracovatelné těsto (dáno lepkem a škrobem) s vysokým objemem pečiva (dáno enzymatickou kapacitou a vlastnostmi škrobu) (Sedláček, 2013). U pečiva vyrobeného z žitné mouky byl objem statisticky významně nižší ($p < 0,05$). Žitná bílkovina totiž není schopná vytvořit samostatnou prostorovou síť jako pšeničná a na vytvoření struktury těsta a následně objemu pečiva se podílí škrob a žitné pentozany (Breslauer, Kalentunc, 2003). Přídavek ječných krup ve výrobcích z pšeničné i špaldové mouky statisticky významně ($p < 0,05$) snížil objem pečiva. Příčinou malého objemu pečiva je nižší podíl makromolekulárních bílkovin v ječmeni a jejich odlišné vlastnosti neumožňují vytvoření dostatečně pevné a pružné bílkovinné struktury těsta, která není schopna vytvořit tak klenutý výrobek jako bílkoviny pšeničné, jak uvádí Smrž (2012). U pečiva z celozrnné žitné mouky (dále jen CŽP) byl objem také nižší po přidavku ječných krup. U CŽP docházelo k nárůstu objemu až po koncentraci 30 % (ječných krup), kde byl zaznamenán jen o 3,4 % menší objem pečiva než u kontrolního vzorku. Vyšší koncentrace (nad 30 %) ječných krup způsobila opětovného snížení objemu u CŽP. Odlišný vliv přídatku ječných krup na objem pečiva je i u pečiva vyrobeného z CPP a

celozrnné mouky špaldové (dále jen ČŠP). U vzorku s přídatkem 10 % ječných krup u ČŠP pozorováno snížení objemu v porovnání s CPP a to o 12,7 %. Výrazný pokles je zaznamenán u ČŠP s přídatkem 20 % ječných krup, kdy se ve srovnání s přídatkem 10 % ječných krup, objem pečiva snížil o 30,4 % a u CPP jen o 3,8 %. Obsah hrubé vlákniny byl po přídatku ječných krup vyšší. Po přídatku 20 % ječných krup byl celkový obsah hrubé vlákniny u CPP 4,6 %, ČŠP 4,3 % a u ČŽP 2,9 %, tedy až o 1 % vyšší než u kontrolních vzorků (80 % celozrnné mouky + 20 % pšeničné hladké mouky). Nepatrně vyšší obsah hrubé vlákniny byl u vzorků z CPM bez i s přídatkem ječných krup (20 %) v porovnání se vzorky ČŠM. Ukazuje se, že ječné kroupy by mohly zvýšit podíl hrubé vlákniny v pekařských výrobcích, jejich použití však omezuje nižší podíl makromolekulárních bílkovin, které neumožňují vytvoření dostatečné pevné a pružné bílkovinné struktury těsta jak je tomu v případě pečiva vyrobeného z pšeničné mouky.

Závěr

Z hodnocení výsledků pečiva vyplývá, že přídatkem ječných krup zvyšuje nutriční hodnotu celozrnného pečiva a to zejména obsah hrubé (nerozpustné) vlákniny. Další výhodou je obsah ječných β -glukanů, které mají příznivý vliv na snížení hladiny krevního cholesterolu a jsou považovány za účinné látky při prevenci civilizačních onemocnění. Přídatkem 20 % semletých ječných krup se zvýšil obsah hrubé vlákniny až o 1 %. Přídatkem ječných krup v koncentraci 10 % a 20 % měl ve všech případech negativní vliv na objem pečiva, došlo ke snížení objemu až o 41 % (ŠM + 20 % krup) v porovnání s kontrolou ($p < 0,05$). Avšak nevýhodou přídatku ječných krup do celozrnného pečiva je negativní vliv na konečný objem pečiva, který je jedním z důležitých ukazatelů jakosti pekařských výrobků.

Poděkování

Tato práce byla řešena v rámci projektu IGA 17/2012/FVHE.

Literatura

Vyhláška č. 333/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta. In: Sbírká zákonů České Republiky. 1997.

KOČ, Břetislav. Laboratoře ÚKZÚZ mají žně v zimě. In: AGROWEB [online]. 2001 [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/roslinna-vyroba/Laboratoře-UKZUZ-maji-zne-v-zime__s44x10316.html

LACKO-BARTOŠOVÁ, M. A P. OTEPKA. Evaluation of choosen yield components of spelt wheat cultivars. Journal of Central European Agriculture. 2001, roč. 2, 3-4.

SEDLÁČEK, Tibor. Kvalita pšenice. In: Selgen, a.s. [online]. 2013 [cit. 2013-03-20]. Dostupné z: <http://selgen.cz/sprava/wp-content/uploads/2012/02/Kvalita-p%C5%A1enice-a-jak-ji-zjist%C3%ADme.doc.pdf>

SMRŽ, František, Josef PŘÍHODA a Marcela SLUKOVÁ a kol. Renesance ječmene. In: Publikace české technologické platformy pro potraviny [online]. 2012 [cit. 2013-02-28]. Dostupné z: <http://www.socr.cz/assets/zpravodajstvi/tiskove-zpravy/renesance-jecmene-ctp.pdf>

BRESLAUER, Ed. by Gönl Kaletunç; Kenneth J. Characterization of cereals and flours: properties, analysis, and applications. New York [u.a.]: Dekker, 2003. ISBN 08-247-0734-6.

Kontaktní adresa: Martina Eliášová, Ing. Mgr, Ústav vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, eliasova.martinka@seznam.cz

Posouzení vlivu vybraných přísad na barvu cereálních pekařských výrobků

Assessment of the influence of selected ingredients to the color cereal bakery

¹Čáslavková Petra, ¹Tremlová Bohuslava, ¹Eliášová Martina,
¹Ošťádalová Martina, ²Štarha Pavel, ¹Pokorná Jana

¹Ústav vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Odbor počítačové grafiky a geometrie, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně

Summary

With the growing interest in a healthy lifestyle and nutrition, the production of bakery products has expanded the number of new species of the cereal bread. This type of bread has a higher amount of crude fiber, minerals, and has a lower GI, which is very important for a healthy diet of consumers. The aim of the study was to assess the change in color of the model bakery rye wholemeal flour, to which were added increasing concentrations of groats. Monitoring of the color change was chosen due to the fact that color is an important indicator of sensory and has predictive value in relation to the conventional consumer acceptance of products. To fulfill the objectives were used image analysis and sensory analysis and the results of these methods were compared with each other.

Keywords: *color of bakery products; instrumental methods; whole rye flour; barley groats*

Úvod

Cereálie výrazně ovlivňují výživovou bilanci světové populace a mezi ostatními zemědělskými produkty mají výsadní postavení. Cereální výrobky hrají ve výživě obyvatel ČR velmi významnou roli, a i přes mírně stoupající spotřebu těstovin, mají rozhodující podíl. Obiloviny (cereálie) patří botanicky mezi traviny (*Gramineae*) a téměř všechny známé, v současné době využívané obiloviny se řadí do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) [1]. Z nutričního hlediska lze obiloviny v potravě považovat za dodavatele hlavních živin a energie v podobě sacharidů, bílkovin, menší části tuků a biologicky hodnotných složek jako jsou minerální látky a vitamíny. Kromě toho jsou rovněž významným zdrojem látek balastního charakteru, jako je vláknina, rezistentní škrob, které mají příznivý vliv na fyziologické funkce trávicí soustavy a rovněž disponují vyšším zastoupením polyfenolů, lignanů, karotenoidů a flavonoidů [2]. Obecně se v pekárenské výrobě k výrobě pečiva používají výhradně jen dva druhy mouk – pšeničná a žitná. Ostatní druhy (bramborová, kukuřičná, ovesná) se používají ojediněle [3]. V našem průmyslu se jako základní surovina používá výhradně mouka pšeničná a žitná různého stupně vymletí. Mouky vymleté z jiných obilnin, luskovin nebo jiných plodin jsou považované za přísady (mouka kukuřičná, ječná, sójová, bramborová a další [4, 5]. V rámci této studie byla použita pro výrobu modelových vzorků použita vysoko vymletá celozrnná žitná mouka s přísadou ječných krup ve formě mouky. Vysoko vymletá mouka byla zvolena na základě jejího příznivého významu pro lidskou výživu, protože obsahuje zachované neškrobové polysacharidy, které jsou základem vlákniny, jež tvoří důležitou součást potravy a má příznivý vliv na prevenci proti cévním chorobám a nádorovým onemocněním [6]. Vysoko vymílané tmavé mouky s vysokým obsahem popelovin si zachovávají také značný podíl vitamínů

z původního zrna. Popeloviny v sobě zahrnují především důležité biogenní prvky (P, Ca, Mg, K, S aj.). [7]. Prospěšná nutriční hodnota ječmene, jež byl použit jako přísada, spočívá v obsahu některých vitamínů komplexu B, vitamínu E, antioxidantů a minerálních látek, zejména také v přítomnosti neškrobových polysacharidů, které společně s ligninem tvoří ječnou vlákninu s β – glukánovou složkou, která má schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi [1]. Z výživového hlediska lze považovat tyto modelové pekařské výrobky za zdraví prospěšné, nicméně lukrativnost výrobku zvyšuje i jeho vzhled. Nejběžnějším deskriptorem vzhledu je barva, která je stěžejním kritériem pro přijetí výrobku zákazníky. Barvu kůrky pekařských výrobků vytvářejí především tzv. Maillardovy reakce. Tmavší vybarvení střídy může být podporováno vznikem produktů odvozených z polysacharidů na bázi žitných a ječných pentosanů. Barvu střídy může výrazně ovlivnit i použití dalších surovin, např. kukuřičné zápy nebo různých drcených semen či koření [8]. Pro posouzení změny byly vybrány dva zástupci v současné době používaných metod. Na jedné straně senzoričká analýza, která je značně subjektivní a vypovídá o vnímání barvy výrobků budoucích konzumentů a na straně druhé obrazová analýza, která poskytuje objektivní výsledky prostřednictvím počítačového vidění barevného systému *rgb*.

Materiál a metodika

Testované modelové pekařské výrobky byly vyráběny v laboratorních podmínkách dle receptury pro cereální výrobky společnosti Penam a.s. K výrobě modelových výrobků byla použita celozrnná žitná mouka, do které byly přidávány ve stoupající koncentraci kroupy ve formě rozemleté mouky. Pro účely tohoto testování byly zvoleny koncentrace přísadů 10 %, 20 %, 30 %, 40 % a 50 %, tj. 40 g, 80 g, 120 g 160 g a 200 g do 400 g celkové hmotnosti použitých surovin. V rámci testování byla sledována barva pekařských výrobků, která byla hodnocena senzoričkou a obrazovou analýzou.

Senzoričká analýza byla provedena 12 – ti předem zaškolenými hodnotiteli, kteří posuzovali barvu kůrky a střídy do dotazníků, které obsahovaly lineární profilové diagramy a bodové stupnice. Diagram byl tvořen 100 mm nestrukturovanou úsečkou, kde levý konec znamenal nevýraznou hodnotu daného deskriptoru a pravý konec velmi intenzivní hodnotu. Hodnocení intenzity barvy bylo provedeno zaškrtnutím na uvedené stupnici k danému deskriptoru. Obrazová analýza byla provedena v první fázi digitalizací vzorků, která převedla vzorky pekařských výrobků do digitální podoby. V tomto kroku je nezbytné vybrat vhodný typ osvětlení a dodržet po celou dobu standardní světelné podmínky, které zamezí vzniku nežádoucích vedlejších efektů, které mohou negativním směrem ovlivnit zpracování obrazu obrazovou analýzou. Získané snímky byly pořizovány v bezkompresních formátu.

Programem Adaptive Contrast Control Structure and Object Analyser verze 6.1 (ACC Sofo, 2002) byla u získaných snímků provedena na základě jasů pozorovaného objektu segmentace obrazu, která umožnila oddělit od pozadí snímky pekařských výrobků nebo-li objekty zájmu pro nadcházející kolorimetrickou analýzu.

Kolorimetrie byla hodnocena na základě barevného systému *rgb*, kde byly získány výpočtem pro jednotlivé barvy tyto hodnoty: červená barva $h = 0,0000$, oranžová barva $h = 0,4636$, žlutá barva $h = 0,7854$ a zelená barva $h = 1,5707$. V rámci hodnocení barvy byla studie zaměřena i na její saturaci, pro kterou platí, že pokud

nabývá hodnoty 0, jedná se pouze o odstín šedé, pokud nabývá hodnoty 1, jedná se o barvu s maximální intenzitou.

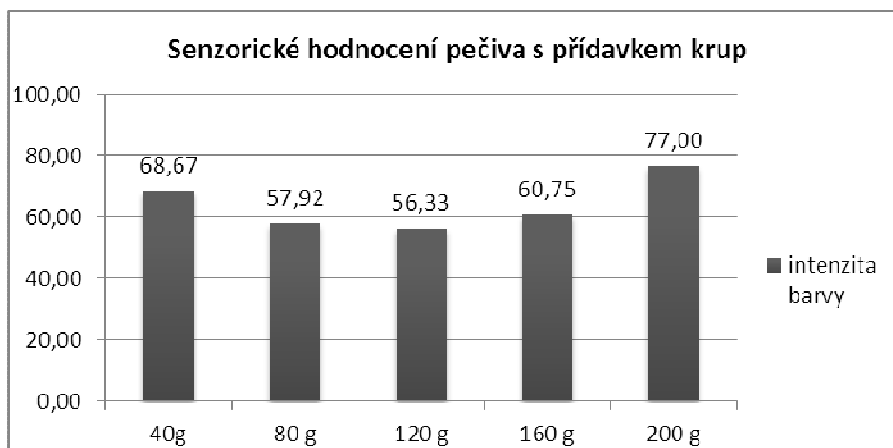
Výsledky a diskuze

Výsledky sensorického hodnocení byly statisticky zpracovány a vzájemně porovnávány v programu UNISTAT pomocí oboustranného Studentova t – testu ($p < 0,05$). Celkem hodnotitelé posuzovali 5 modelových pekařských výrobků.

Data získaná analýzou obrazu byla vyhodnocena v programu MiniTab (State College, Pennsylvania, USA) a zpracována ve formě marginálních četností pro parametry barvy a saturace. Celkem bylo touto metodou zpracováno 35 snímků z 5 hodnocených vzorků (z každého vzorku bylo nafoceno 7 řezů).

Jak je znázorněno v grafu č. 1, sensorická analýza hodnocených vzorků ukázala, že hodnotitelé vnímali nejvyšší intenzitu barvy (77 %) u výrobků s přidavkem 200g ječných krup a rovněž byla vysoká intenzita barvy (68,7 %) pozorována u přidavku 40 g. Naopak u přidavku 120 g byla hodnotiteli vyhodnocena nejnižší intenzita barvy (56,3 %).

Obrazovou analýzou byla u přidavku 200 g krup zjištěna nejvyšší saturace barvy, z čehož vyplývá, že se výsledky v této kategorii shodují se sensorickou analýzou. Druhá nejvyšší saturace byla však pozorována u přidavku 80 g krup a nejnižší saturace byla vyhodnocena u výrobků s přidavkem 160 g krup. V těchto kategoriích přidavků krup do mouky se tyto metody rozcházejí.



Graf 1: Sensorické hodnocení výrobků.

Závěr

Ze získaných výsledků lze říci, že se zvyšujícím se přidavkem krup do mouky se zvyšuje sytost barvy, což bylo prokázáno shodnými výsledky ze sensorické a obrazové analýzy. V případě zbylých kategorií přidavků, se tyto metody rozcházejí, což je podnětem pro další zkoumání a získání dat, které by mohly zpřesnit citlivost použitých metod.

Poděkování

Tato práce byla řešena v rámci projektu 17/2012/FVHE.

Literatura

KOPÁČOVÁ, O. Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům. In: *Ministerstvo zemědělství: UZPI* [online]. 2007 [cit. 2013-03-28]. ISBN 978-80-7271-184-0 [1]

PELIKÁN, M. Zpracování obilovin a olejnin. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. 152 s. ISBN 80-7157-195-4 [2]

HAMPL, J. a kol. Jakost pekárenských a cukrárenských výrobků. 1. vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981. 232 s. ISBN: 04-818-81 [3]

PŘÍHODA, J., HAMPL, J. *Cereální chemie a technologie II. (Pekárenství)*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1985. 248 s. SNTL [4]

KUČEROVÁ, J. *Technologie cereálií*. 1. vyd. Brno: MENDELU, 2004. 141 s. ISBN 80-7157-811-8 [5]

PŘÍHODA, J., HUMPOLÍKOVÁ, P., NOVOTNÁ, D. *Základy pekárenské technologie*. 1. vyd. Praha: Pekař cukrář s. r. o., 2003. 363 s. ISBN 80-902922-1-6 [6]

SKOUPIL, J., MÜLLEROVÁ, M., ŠTROBACH, J. *Zpracování mouky: technologie pro 3. ročník SPŠ potravinářské technologie*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981. 286 s. [7]

Prugar a kolektiv [8]

Kontaktní adresa: Petra Čáslavková, Mgr., Ústav vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a technologie, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, email: petra.caslavkova@seznam.cz

Comparison of methods for processing samples of soy protein for fluorescence microscopy

Talandová Michaela, Charousová Zuzana, Pospiech Matej, Tremlová Bohuslava

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

Summary

The aim of the study was to prove the methodology for determination of soy protein in meat products by fluorescence microscopy. Three different procedures were used for preparation of samples. First one was a classical approach which uses the preparation of paraffin Block with fixation in formaldehyde. Second procedure uses cryo slices with fixation in acetone. Third procedure uses cryo slices with fixation in methanol. Developed methodology was validated on soy protein, which was added to the model samples of meat product.

Keywords: soybeans; fluorescence; allergen

Introduction

The use of soy protein in the food industry is possible due to their excellent nutritional and technological properties and health benefits (Singh et al., 2008). In the case of meat products, are soy protein used in emulsified products due to their functional properties, such as water binding capacity and fat texture formation and emulsifying capability, as well as organoleptic properties, such as appearance, strength and sctility (belloque, et al 2002). Soy protein helps improve technological processes used in the production of meat products and reduce their production costs (Criado et al, 2005). On the other hand, soy protein classified among the most important allergens. Food allergy is a relatively rare immune disease (Mills et al 2004). Food allergies affect 6-8% of children and 2% of adults (Sampson 2002). For this reason, it is necessary to detect soy protein in food.

Materials and Methods

Materials under investigation were model meat products with the addition of 2.5% soy protein. Prepared samples were processed by three different methods, and these methods were then compared with each other with regard to the suitability of using fluorescence microscopy. As stabilizing agents have been used formaldehyde, acetone and methanol. Procedure for fixation using formaldehyde was carried out by standard immunohistochemical procedure with the production of paraffin block. For fixation in acetone, and methanol were used cryo slices. Part of the procedure for the paraffin slices was dewaxing using xylene. Then cuts were pulled through descending series of alcohol. After rinsing slides with PBS (5 min), the samples were heated in a citrate buffer, and subsequently cooled to room temperature. After washing the slides in PBS for 5 minutes was performed blockade of endogenous peroxidase. This step was removed in the case of fixation with acetone and methanol. Instead, the sample was immersed for 5 minutes in fixative reagent. After repeated rinsing with PBS (2 x for 5 min.) samples were placed in a humid chamber, in which the non-specific binding was blocked with normal goat serum diluent for 30 minutes. Then the biotinyl primary antibody (anti-soya) was applied on the cuts. Humid chamber was left overnight in the refrigerator. The next day samples were immersed into a PBS (2 x 5 min.). Then the samples were again placed in a moist chamber and secondary antibody was applied on the cuts for 30 min. at a room temperature. This was followed by washing in PBS (2 x 5

min.) and by application of fluorochrome. Texas Red was used as a fluorochrome for all methods. Then slices were assembled and examined using a fluorescence microscope Leica type-11307072057/BZ:09 and further processed with software Leica IM 50.

Results and Discussion

Materials under investigation were model meat products with the addition of 2.5% soy protein. Fluorescent immunohistochemistry was selected as a testing method. For each approach were investigated nine slices, which were placed on three slides, the procedure was repeated twice with 10 days between them. Soy protein has been detected based on its specific structure and further with the help of fluorescence, which was achieved by using fluorochrome - Texas Red. The results are shown in Table 1. Immunohistochemical methods are generally based on the reaction between the allergen and the corresponding labeled antibody. Establishing of the labeled antibody was evaluated by fluorescence microscope with the appropriate filter. The examination was based on creation of fluorescent marking, which indicates a positive reaction of antigen with antibody. Detections of soy protein in preparations can be based on its specific morphological structure in which soy protein has a characteristic ring shape, respectively sickle to circular particles (Horn, 1987), see Figure 1.

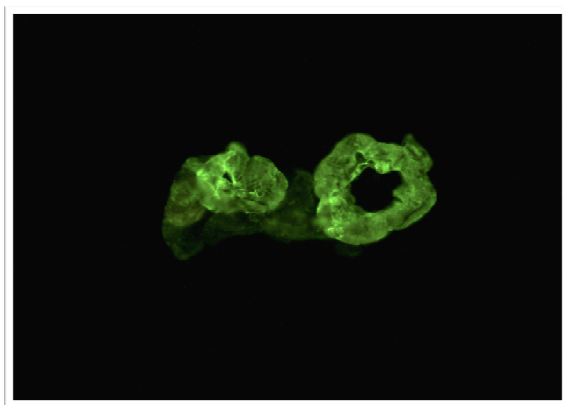


Figure 1: Soy protein (magnification 200x).

Table 1: Fluorescence intensity at three different fixation.

	Paraffin slices	Cryo slices – methanol	Cryo slices – acetone
Attempt n. 1	+	++	++
Attempt n. 2	+	++	+++

Legend: +; ++; +++ = intensity

Acknowledgements:

Work was supported by the project IGA 2/2012/FVHE.

References

BELLOQUE, J., GARCIA, M. C., TORRE, M., MARINA, M. L. Analysis of soybean proteins in meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 2002, vol. 42, p. 507–532.

CRIADO, M., CASTRO-RUBIO, F., GARCIA-RUIZ, C., GARCIA, M. C., MARINA, M. L. Detection and quantitation of additions of soybean proteins in cured–meat products by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science.*, 2005, vol. 28, p., 987–995.

HORN, D. Zum Nachweis pflanzlicher Eiweisszubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. *Fleischwirtschaft.* 1987, vol. 67 no. 5, p. 616 – 618.

MILLS, E., N., C, JENKINS J., A., ALCOCER, M., J., C, SHEWRY, P., R. Structural, biological and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, vol. 44, p. 379–407.

SAMPSON, H., A. Peanut allergy. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 346, p. 1294–9.

SINGH, P., KUMAR, R., SABAPATHY S., N., BAWA, A., S.. Functional and edible uses of soy protein products. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.*, 2008, vol. 7, p. 14–28.

Contact address: Michaela Talandová, Mgr., Ústav vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, talandovam@vfu.cz

The effect of feeding soybean extract to lactating dairy cows on yield and composition of milk and fatty acid profile of milk fat

¹Ryšavý Jan, ²Křížová Ludmila, ¹Janštová Bohumíra

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

²Agrovýzkum Rapotín, s.r.o. - Pracoviště Pohořelice

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of diet supplemented with soybean extract on yield and composition of milk and milk fatty acid profile. The experiment was carried out on 12 lactating dairy cows (lactation 1 to 5, 26 weeks of lactation) that were divided into 2 groups. During the experiment cows were fed on a basal diet based on maize silage (30 kg/d), lucerne hay (3 kg/d) and supplemental mixture (8 kg/d, all as fed basis). Control cows (C) received the basal diet while experimental animals (S) received the basal diet supplemented daily with 7.5 g/head of 40% soybean extract. The experiment was carried out in the form of cross-over design and was divided into 2 periods of 10 days (7 days of preliminary period followed by a 3-day collecting period). DM intake and milk yield did not differ significantly between groups ($P > 0.05$). Concentration of milk compounds was not affected by the treatment, however daily yield of lactose was higher in C than in S ($P < 0.05$). Yield of protein and casein tended to be higher in C compared to S ($P = 0.0782$ and $P = 0.0777$, respectively). Content of individual FA did not differ significantly between groups ($P > 0.05$). Total content of short-, medium- and long-chain FA was not affected by the treatment ($P > 0.05$) and no differences were observed between groups in sums of SFA, MUFA, UFA or PUFA ($P > 0.05$).

Keywords: fatty acids; milk; soybean extract; dairy cows

Introduction

Soybean-derived isoflavones have attracted a lot of attention due to their diverse pharmacological and antioxidant properties (e.g. Hirano *et al.*, 1989, Wong *et al.*, 1998, Chiechi, 1999). Although the most important sources of isoflavones in human diet are soy and soy-based foods (Wang and Murphy, 1994), recent studies suggest (e.g. Mustonen *et al.*, 2009; Steinshamn *et al.*, 2008) that bovine milk can be considered as a potential dietary source of isoflavones for human as well. There are two major sources of phytoestrogens commonly used in the nutrition of lactating dairy cows, red clover and soy. After feeding clover based feedstuffs (silages, pasture, i.e. roughage) marked levels of isoflavones are reported in bovine milk (e.g. Mustonen *et al.*, 2009) in comparison to soybean based products (soybean meal, extruded full-fat soya, i.e. compound feedstuffs) where concentrations of isoflavones in milk are relatively low (e.g. Křížová *et al.*, 2011). However, there are other products, such as soybean extracts with 40 or 90 % of isoflavones that could be used as a supplement to diets of lactating dairy cows with the aim to enhance concentrations of isoflavones in milk without negative effect on animal performance. Thus the objective of the study was to evaluate the effect of diets supplemented with soybean extract on yield and composition of milk and milk fatty acid profile.

Material and Methods

The experiment was carried out on 12 lactating dairy cows (lactation 1 to 5, 26 weeks of lactation) that were divided into 2 groups. During the experiment cows were fed on a basal diet based on maize silage (30 kg/d), lucerne hay (3 kg/d) and supplemental

mixture (8 kg/d, all as fed basis). Control cows (C) received the basal diets while experimental animals (S) received the basal diet supplemented daily with 7.5 g/head of 40% soybean extract. The experiment was carried out in the form of cross-over design and was divided into 2 periods of 10 days (7 days of preliminary period followed by a 3-day collecting period).

Feed intake was monitored daily. In each period samples of individual feedstuffs were taken for the determination of chemical composition. Content of dry matter (DM), crude protein (CP), crude fiber (CF), ash and fat were estimated according to AOAC (1984). Neutral detergent fiber (NDF, with α -amylase) was estimated according to Van Soest et al. (1991), ash-free acid detergent fiber (ADF) was estimated according to Goering and Van Soest (1970).

Cows were milked twice a day (5.00 and 16.00 h). Milk yield was recorded at each milking. During the collecting period, samples of milk were taken from each milking. Samples for determination of basic constituents were conserved by 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol; D&F Control Systems, Inc. USA), cooled to the 6 °C and analysed by infrared analyser (Bentley Instruments 2000, Bentley Instruments Inc., USA). FA profile was determined using a gas chromatograph HP 4890D (Hewlett-Packard, USA) with capillary column DB-23 (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m). The column was held at 100 °C for 3 min after injection, the temperature was programmed at 10 °C/min to 170 °C, then the temperature was programmed at 4 °C/min to 230 °C and held at 250 °C for 15 min, then the temperature was programmed at 5 °C/min to 250 °C. The injector and detector temperature was 270 °C and 280 °C, respectively. Nitrogen was used as a carrier gas. FAMES were detected with the flame ionisation detector (FID) using external standards of FA Supelco 37 component FAME Mix (Supelco, USA) and linoleic acid conjugated methyl ester (Sigma-Aldrich, Germany).

Data presented in this study are preliminary, calculated for 7 animals in each period and as a mean from 3 days of sampling. Data obtained in the experiment were analysed using the GLM procedure of the Statgraphics 7.0 package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, USA) using multi-factorial analysis of variance.

Results and Discussion

Results presented herein are a part of study focused on the effect of various sources of soybean-derived isoflavones on lactating performance of dairy cows.

The DM intake and yield and composition of milk are shown in Table 1. DM intake did not differ significantly between groups ($P > 0.05$). Milk yield tended to be higher in C in comparison to S ($P = 0.0575$). Concentration of milk compounds was not affected by the treatment, however daily yield of lactose was higher in C than in S ($P < 0.05$). Yield of protein and casein tended to be higher in C compared to S ($P = 0.0782$ and $P = 0.0777$, respectively).

The FA profile of milk fat is shown in Table 2. Content of individual FA did not differ significantly between groups ($P > 0.05$). Total content of short-, medium- and long-chain FA was not affected by the treatment ($P > 0.05$). No differences were observed between groups in sums of SFA, MUFA, UFA or PUFA ($P > 0.05$). There are no similar studies like ours, because our dairy cows were fed only with soybean extract. However, studies with various soybean feeding compounds (recently e.g. Třináci,

2009, Křížová, 2011a,b) reported higher milk yield and changes in milk composition contrary to our study.

Table 1: Dry matter intake and yield and composition of milk of cows fed either control (C) or experimental diet supplemented with soybean extract (S).

	Units	C	S	SEM
Dry matter intake	kg/d	18.5	18.5	0.01
Milk yield	kg/d	23.90	23.08	0.236
Fat	g/100 g	3.64	3.60	0.181
Protein	g/100 g	3.26	3.18	0.038
Casein	g/100 g	2.57	2.49	0.043
Lactose	g/100 g	4.72	4.72	0.019
Daily yield of milk components				
Fat	kg/d	0.88	0.83	0.046
Protein	kg/d	0.79	0.73	0.015
Casein	kg/d	0.61	0.57	0.013
Lactose	kg/d	1.13*	1.09*	0.099

* P < 0.05

Table 2: Profile of selected FA (%) of milk fat of cows fed either control (C) or experimental diet supplemented with soybean extract (S).

	C	S	SEM
C 4:0	1.14	1.20	0.078
C 6:0	0.88	1.08	0.103
C 8:0	0.57	0.73	0.072
C 10:0	1.60	2.01	0.186
C 12:0	2.37	2.91	0.240
C 16:0	34.81	34.86	1.325
C 18:0	14.72	12.91	0.810
C 18:1 n9	24.45	23.59	1.120
C 18:2 n6t	2.87	1.90	0.697
C 18:2 n6c	1.22	2.08	0.528
Sum of: ¹			
saturated FA	68.32	68.89	0.864
monounsaturated FA	27.22	26.54	0.994
polyunsaturated FA	4.47	4.47	0.214
unsaturated FA	31.69	31.01	0.855
short-chain (C4 – C12)	6.57	7.94	0.615
medium-chain (C14-C16)	49.56	50.80	1.790
long-chain (C18 and more)	43.88	41.16	1.468

¹Sums of FA include also minor fatty acids not given in the table (C11:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:3 n3, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3 n6, C20:3 n3, C20:4n6, C20:5 n3, C21:0, C22:0, C22:1 n9, C22:2, C23:0, C24:0 and C24:1)

Conclusion

Using 40% soybean isoflavones extract as a supplement in the diet did not affect lactational performance of dairy cows. As expected, there were no changes in the fatty acids profile of milk fat.

Acknowledgments

This work was supported by the project No. MSM 6215712402 and by the institutional support by decision RO0311 from February 28th 2011.

References

References available at author: h10021@vfu.cz.

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

SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat
a hygiena vegetabilí*

Porovnanie vplyvu parenterálnej aplikácie Selénu u dojnic a jalovic počas peripartálneho obdobia

Comparison of effect the parenteral application of Selenium near dairy and primipary cows during periparturition period

¹Zigo František, ¹Vasil' Milan, ¹Elečko Juraj, ¹Farkašová Zuzana,
²Chripková Martina

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

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Ústav farmakológie, Košice

Summary

This study focuses about effect of parenteral administration of Selenium (Se) on the concentration Se and the activity of glutathione peroxidase (GPx) in blood of dairy and primipary cows before and after parturition. From 120 holstein cows in a two – four lactation-gestation cycle and from 40 holstein primipary cows were randomly selected control group and experimental group (in every group were 10 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 days before calving (control sampling), 3 days after calving, approx. 12 days and approx. 22 days after calving. The same day after control sampling were injected subcutaneous in experimental group Selevit inj. a. u. v. at the doses of Se 44 mg/cow. The changes on the concentration of Se and in blood of dairy cow's group were observed on to 3 and 12 days after calving in comparing with control group. The changes on activity of GPx in blood primipary cows were on 3 day in comparing with control group.

Keywords: Selenium; glutathione peroxidase; dairy cows; primipary cows

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 najúčinnšie antioxidantné nutrienty, ktoré sú často deficientné v kŕmnych zmesiach, patria zlúčeniny selénu (Se) a vitamínu E (vit.E). Avšak aj dostatočná, prípadne zvýšená suplementácia Se a vit. E, v kŕmnej dávke len pomaly ovplyvňuje zvyšovanie ich plazmatických koncentrácií. Injekčná aplikácia Se a vitamínu E je považovaná za najvhodnejšie riešenie v prípadoch, keď sa perorálnou suplementáciou nedarí eliminovať zníženú koncentráciu Se a α -tokoferolu v krvnej plazme počas peripartálneho obdobia (Pavlata a i, 2001).

Cieľom práce bolo sledovať vplyv jednorázovej parenterálnej aplikácie Selevitu a. u. v. dojniciam a jaloviciam v období 12. dní pred pôrodom na zmeny koncentrácie Se v krvnom sére a aktivity GPx v krvi dojnic počas peripartálneho obdobia.

Materiál a metódy

Zo stáda holštajnských dojnic o priemernom počte 120 kusov a holštajnských jalovic 40 kusov, voľne ustajnených, boli náhodne vybrané tri skupiny dojnic a jalovic (každú skupinu tvorilo 10 kusov), ktoré boli v poslednej fáze gravidity. Na 12. deň pred očakávaným pôrodom bola odobratá krv všetkým vybraným dojniciam a jaloviciam (5ml) z vena jugularis do heparinizovaných skúmaviek, (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. Všetky vzorky boli uskladnené pri $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analýzy. Po vlhkej mineralizácii vzoriek krvného séra v mikrovlnnej rúre (Perkin Elmer, LS 1200, Massachusetts, USA), bola koncentrácia selénu stanovovaná podľa Bax et kol. (1986) atómovým absorpčným spektrometrom (Perkin Elmer, Zeman 4000). Aktivita GPx v krvi bola stanovená pomocou kitov Glutathione peroxidase assay kit (Randox-Ransel, UK) podľa Paglia et Valentine (1967). Následne bol prvej skupine dojníc a jalovic subkutánne jednorázovo podaný Selevit inj. a. u. v. (Biotika a.s., Slovakia) a to v dávke 22 ml/ks. Druhej skupine dojníc a jalovic bol podaný ten istý preparát o polovičnej dávke 11 ml/ks. Tretia kontrolná skupina dojníc a jalovic spolu s ostatnými skupinami dostávala kýmnu dávku s obsahom selénu do 0,1 mg/kg sušiny bez parenterálnej aplikácie injekčných prípravkov. V jednotlivých intervaloch po pôrode (3 dni, 12 dní a 22 dní) bola tým istým spôsobom odobratá krv všetkým skupinám dojníc a jalovic ako počas prvého odberu pred pôrodom a boli stanovené jednotlivé analýzy. Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené podľa ANOVA testu. Jednocestnou Anovou (one-way Anova) použitím Dunettovho post testu boli porovnávané priemerné hodnoty obsahu Se a aktivity GPx v krvi prvej a druhej skupiny oproti kontrolnej skupine dojníc a jalovic. Pomocou Tukey post testu boli porovnávané jednotlivé skupiny dojníc a jalovic navzájom. Signifikantné zmeny boli vyhodnotené ako $P < 0,05$. Výsledky v tabuľkách sú udávané v priemerných hodnotách spolu s vyjadrením smerodajných odchýlok.

Výsledky

V porovnaní s kontrolnou skupinou, po parenterálnom podaní Selevitu a. u. v. na 12. deň pred pôrodom bola zaznamenaná vyššia koncentrácia Se v krvnom sére dojníc v S1 skupine a to na 3. a 12. deň po pôrode. U jalovic bola zvýšená koncentrácia Se v krvnom sére na 3. deň po pôrode v porovnaní s kontrolnou skupinou. Porovnávaním skupín dojníc a jalovic boli zaznamenané vyššie koncentrácie Se v krvnom sére v skupine dojníc S1 na 12 deň oproti skupine jalovic S1.

Tabuľka 1: Vplyv parenterálnej aplikácie Selevitu a. u. v. dojniciam a jaloviciam na koncentrácie Se ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) v krvnom sére počas peripartálneho obdobia.

Obdobie	Kontrolná sk.		Skupina s dávkou 11 ml/ks		Skupina s dávkou 22 ml/ks	
	C doj.	C jal.	S2 doj.	S2 jal.	S1 doj.	S1 jal.
12 deň pr. p.	0.78 ± 0.099	0.82 ± 0.064	0.77 ± 0.071	0.80 ± 0.151	0.82 ± 0.094	0.83 ± 0.079
3 deň po p.	0.77^a ± 0.077	0.88^a ± 0.071	0.89 ± 0.110	0.90 ± 0.152	1.02^b ± 0.123	1.04^b ± 0.09
12 deň po p.	0.79^a 0.079	0.84 ± 0.062	0.86 ± 0.051	0.84 ± 0.120	1.01^{b,e} ± 0.136	0.85^f ± 0.099
22 deň po p.	0.82 ± 0.057	0.79 ± 0.05	0.78 ± 0.091	0.80 ± 0.041	0.85 ± 0.165	0.85 ± 0.085

S1, S2 doj. – dojnice, J1, J2 jal. - jalovice, C doj. – kontrolná skupina dojníc bez parenterálnej aplikácie, C jal. - kontrolná skupina jalovic bez parenterálnej aplikácie, pr. p. – pred pôrodom, po p. – po pôrode.
a,b,e,f - $P < 0,05$.

Aktivita GPx v porovnaní s kontrolnou skupinou, po parenterálnom podaní Selevitu a. u. v. pred pôrodom bola vyššia v krvi dojníc a jalovic (S1 doj. a S1 jal.) na 3 deň po pôrode. Porovnávaním skupín dojníc a jalovic navzájom, nebola zaznamenaná zvýšená

aktivita GPx. V skupinách S2 doj. S2 jal., s polovičnou dávkou Selevitu a.u.v. sme nezaznamenali zvýšenú aktivitu GPx počas celého sledovaného obdobia.

Tabuľka 2: Vplyv parenterálnej aplikácie Selevitu a. u. v. na aktivitu GPx ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) v krvi dojnic a jalovic počas peripartálneho obdobia.

Obdobie	Kontrolná sk.		Skupina s dávkou 11 ml/ks		Skupina s dávkou 22 ml/ks	
	C doj.	C jal.	S2 doj.	S2 jal.	S1 doj.	S1 jal.
12 deň pr. p.	709.3 ±79.95	719.3 ±76.52	736.4 ±70.25	712.9 ±91.8	708.9 ±92.91	764.4 ±66.55
3 deň po p.	681.4^a ±72.13	698.5^a ±58.18	784.0 ±106.9	846.7 ±122.2	879.9^b ±133.4	909.7^b ±90.55
12 deň po p.	697.8 ±66.45	727.4 ±65.4	712.7 ±103.1	722.1 ±77.64	726.4 ±67.66	817.0 ±126.10
22 deň po p.	702.0 ±55.49	711.0 ±51.61	734,6 ±55.93	802.2 ±51.11	692.1 ±48.18	766.7 ±62.68

S1,S2 doj. – dojnice, J1, J2 jal. - jalovice, C doj.– kontrolná skupina dojnic bez parenterálnej aplikácie, C jal. - kontrolná skupina jalovic bez parenterálnej aplikácie, pr. p. – pred pôrodom, po p. – po pôrode. a,b,e,f - $P < 0,05$.

Diskusia a záver

Pavlata *et al.* (2002) doporučuje okrem stanovovania Se v kŕmnej dávke a v krvi dojnic aj diagnostické stanovenie aktivity GPx, ktorá zabezpečuje antioxidantnú ochranu najmä v cytozole buniek. Taktiež určil hraničné limity aktivity GPx, ktoré zodpovedajú deficiencii Se ako jej hlavnej integrálnej zložky. Aktivitu GPx pod $470 \mu\text{kat.l}^{-1}$ vyhodnotili ako nedostatočnú a hodnoty v rozpätí $470 - 600 \mu\text{kat.l}^{-1}$ hodnotili ako hraničné pre úroveň zásobovania organizmu Se. Za dostatočnú úroveň zásobovania organizmu Se pokladá hodnoty aktivity GPx nad $600 \mu\text{kat.l}^{-1}$. Po parenterálnej aplikácii Selevitu sa v oboch skupinách (S1 doj. a S2 jal.) zvýšili nielen koncentrácie Se v krvnom sére ale aj aktivita GPx a to najmä na 3. deň po pôrode.

Môžeme konštatovať, že parenterálna aplikácia syntetických foriem Se dojnicam a jaloviciam počas peripartálneho obdobia je jedným zo spôsobov ako sa vyhnúť ich deficitu z kŕmnej dávky a tým zabezpečiť dostatočnú koncentráciu Se a aktivitu GPx v krvi.

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.

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.

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.

PAVLATA, L., PECHOVÁ, A., ILLEK, J.: Praktická doporučení pro diagnostiku karence selenu u skotu v České republice. 2002. *Veterinářství*, 52:170-173.

Pod'akovanie

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

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

The difference between the FA profile of breast and thigh muscles in chukar partridge

¹Jůzl Radovan, ¹Zapletal David, ¹Humpolcová Petra, ¹Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹Department of animal husbandry and animal hygiene, FVHE VFU Brno

²Department of animal nutrition, FVHE VFU Brno

Summary

The aim of our study was to define the profile of FA in muscles of *Alectoris chukar* and its comparison between the breast and thigh muscles. In the age of 90 days we randomly selected 10 individuals of chukar partridge for further analysis of fatty acids. The concentration of fatty acids was determined by gas chromatograph GC 2010 - Shimadzu Inc. The contents of FA were determined as the ratio of total FA. Our results suggest that fat of partridges in thigh muscle contained generally a higher content of SFA and MUFA as compared to breast muscle. On the other hand a higher content of MUFA was found in the breast muscle, specifically for C20:5n3, C22:6n3 and C22:5n3. The obtained results of our study clarify findings about the quality of partridge meat with respect to human nutrition.

Keywords: fatty acids; breast and thigh muscle; chukar partridge

Introduction

Recently, the content of saturated (SFA) and unsaturated fatty acids (UFA), both in their mutual ratios and specific content of particular fatty acids (FA) is widely observed (Zevenbergen et al., 2009). Saturated fatty acids (SFA) and trans-fatty acids increase the concentration of plasma cholesterol and the risk of coronary heart-disease, while monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) have an opposite effect (Hu et al., 1997).

Fatty acids (FA) of pheasant muscles and of other game have been dealt e.g. by Nuernberg et al. (2011). These authors found that FA content between wild and reared pheasants significantly differed, whereas large differences were mainly found among other wild living species. Moreover, Zapletal et al. (2010) point out a higher proportion of UFA in meat from pheasants. The aim of our study was to define the profile of FA in muscles of *Alectoris chukar* and its comparison between the breast and thigh muscles.

Material and Methods

The experimental birds were 10 chukar partridges (*Alectoris Chukar*). The selected birds were reared in Jinačovice pheasantry of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, while the same housing system and nutrition were used for all birds. In the age of 90 days we randomly selected 10 individuals of chukar partridge for further analysis of fatty acids. The concentration of fatty acids was determined by gas chromatograph GC 2010 - Shimadzu Inc. The contents of particular FA were determined as the ratio of total FA (expressed in %). Within SFA were identified C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, and C22:0. Into the MUFA belong n-9 FA that containing one double bond in its molecule. In intramuscular fat were identified follow n-9 FA: C14:1, C16:1, C17:1, C18:1n9t + C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9, and C24:1. As for n-6 PUFA, we identified C18:2n6c + C18:2n6t, C18:3n6, C20:2n6, C20:3n6, C20:4n6, and C22:4n6. Concerning n-3 PUFA, the 4 follows FA were determined C18:3n3, C20:5n3, C22:6n3 a C22:5n3. For

the statistical evaluation we used statistical software Unistat CZ, version 5.6 (2005). Values for particular determined FA are in tables stated as mean (x) and its standard deviation (sd). Differences were considered significant, if $P \leq 0.05$; whereas $P \leq 0.01$ showing a high statistical difference.

Results and Discussion

The content of SFA in fat of breast and thigh muscles is shown in Table 1. From the mentioned table is clear that there are differences in the composition of fat between the breast and thigh muscles. The fat of thigh meat contained significantly higher contents of C12:0, C14:0 and C17:0 in comparison with breast meat.

Table 1: The differences in content of SFA between breast and thigh muscle ($P \leq 0.05$ Ab).

SFA	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0
breast	0,0088	0,0018	0,0041	0,0141 ^A	0,2821 ^A
thigh	0,0065	0,0012	0,0047	0,0182 ^b	0,3796 ^b
SFA	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0
breast	10,5205	0,1322 ^A	4,2504	0,0435	0,0129
thigh	11,9508	0,1593 ^b	4,6047	0,0476	0,0129

Results for the contents of particular MUFA in the breast and thigh muscle are stated in Table 2. The mentioned table shows a higher content of MUFA in the thigh muscle as compared to the breast muscle. The fat in the thigh meat had a significantly higher content of C17:1 and C20:1n9 than in the breast meat.

Table 2: The differences in content of MUFA in breast and thigh muscle ($P \leq 0.05$ Ab).

MUFA	C14:1	C16:1	C17:1	C18:1n9t	C20:1n9	C22:1n9	C24:1
breast	0,0535	3,1040	0,0311 ^A	13,8682	0,1399 ^A	0,0106	0,0341
thigh	0,0723	1,8240	0,0453 ^b	17,2660	0,1786 ^b	0,0094	0,0241

Results for the contents of n-6 PUFA are shown in Table 3. Most of the n-6 PUFA represented FA was C18:2n6c. Its content was significantly higher in the thigh muscle. A significantly higher content was confirmed also for C18:3n6 in thigh meat. The second most represented FA of this group was C20:4n6, which by contrast was higher in breast meat.

Table 3: The differences in content of PUFA n-6 in fat in breast and thigh muscle ($P \leq 0,01$ AB, $P \leq 0,05$ ab).

PUFA n-6	C18:2n6c	C18:3n6	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C22:4n6
breast	6,1267 ^A	0,0558 ^A	0,0570	0,0623	3,4183 ^A	0,2844
thigh	8,1441 ^B	0,0705 ^B	0,0623	0,0541	1,6765 ^b	0,2092

Values for n-3 PUFA are presented in Table 4. Fat of the breast muscle was characterized by the significantly higher proportion of C22:6n3 and C22:5n3. In contrast, the fat of the thigh muscle contained a significantly higher presence of C18:3n3.

Table 4: Differences in the content of PUFA n-3 in the fat of breast and thigh muscle ($P \leq 0.01$ AB, $P \leq 0.05$ ab).

PUFA n-3	C18:3n3	C20:5n3	C22:6n3	C22:5n3
breast	0,2509	0,0335	1,0060	0,4742
thigh	0,3649	0,0182	0,3925	0,1692

A higher content of the SFA was detected in the fat of thigh muscles, namely C12:0, C14:0, and C17:0. The most represented MUFA in fat of breast and thigh muscles was C18:1n9t, when its content was higher in thigh muscle. The most represented fatty PUFA n-6 was C18:2n6c, whereas its content was higher in thigh muscle as compared to breast muscle. The same results are also reported by Nuernberg et al. (2011). The second most represented PUFA was C20:4n6, which was higher in the breast muscle as compared to the thigh muscle. By contrast, Nuernberg et al. (2011) found its higher content in the thigh muscle than in the breast muscle.

In general, our results are in accordance with findings of Straková et al. (2010), who state that the fat content is low in muscles of alectoris chukar and moreover it contains a high proportion of n-3 PUFA and good ratio of n-6 PUFA.

Conclusion

Our results suggest that fat of partridges in thigh muscle contained generally a higher content of SFA and MUFA as compared to breast muscle. On the other hand a higher content of MUFA was found in the breast muscle, specifically for C20:5n3, C22:6n3 and C22:5n3. The obtained results clarify findings about the quality of partridge meat with respect to human nutrition.

Acknowledgements

This study was funded by the grant IGA 78/2011/FVHE.

References

- ZEVENBERGER, H., DE BREE, A., ZEELLENBERG M., LAITINEN, K., VAN DUIJN, G., FLÖTER, E. Foods with a High Fat Quality Are Essential for Healthy Diets. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2009, vol. 54, p. 15 – 24.
- HU, F.B., STAMPFER, M.J., MANSON, J.E., RIMM, E., COLDITZ, G.A., ROSNER, B.A., HENNEKENS, C.H., WILLETT, W.C. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *New England Journal of Medicine*, 1997, vol. 337, p. 1491 – 1499.
- NUERNBERG, K., SLAMEČKA, J., MOJTO, J., GAŠPARÍK, J., NUERNBERG, G. Musle fat composition of pheasants (*Phasianus colchicus*), wild ducks (*Anas platyrhynchos*) and black coots (*Fulica atra*). *European Journal of Wildlife Research*, 2011, vol. 57, p. 795 – 803.
- ZAPLETAL, D., STRAKOVÁ, E., VITULA, F., KROUPA, L., SUCHÝ, P. Výkrm bažantích kuřat. *Farmář*, 2010, vol. 1, p. 22 – 24.
- STRAKOVÁ, E., ŠERMAN, V., SUCHÝ, P., MAS, N., VITULA, F., VEČEREK, V. Fatty acids in the tissue of feathered game. *Krmiva*, 2010, vol. 52, p. 63 – 69.

Contact address: Radovan Jůzl, Ing., Department of animal husbandry and animal hygiene, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, juzlr@vfu.cz

SEKCE 3

Veterinární ekologie

Oxidative stress in birds: Effects of heavy metals and pharmaceuticals

Osičková Jitka, Král Jiří, Ondráček Karel, Kováčová Veronika, Pikula Jiří

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Free-ranging birds are certainly exposed to multiple stressors with synergistic, additive or independent actions. Pharmaceuticals and heavy metals such as diclofenac and lead, respectively, have been identified as environmental contaminants toxic to birds. Metal toxicity is related to their oxidative state and reactivity. It is suggested that metal-induced oxidative stress is responsible for the toxic effects of heavy metals. We evaluating parameters of oxidative stress caused by lead and veterinary drugs exposure.

Keywords: *oxidative stress; non-steroidal anti-inflammatory drugs; lead; antioxidant defence*

Introduction

Oxidative stress can be defined as an imbalance between antioxidant defence and the production of reactive oxygen species. The defence is overcome by radical formation causing oxidative damage to biomolecules (Halliwell and Gutteridge, 2007). Metals can cause oxidative stress by increasing the formation of reactive oxygen species (ROS). Antioxidants are then incapable of defence against growing amounts of free radicals (Koivula and Eeva, 2010). Free radicals are chemical species with a single unpaired electron, which is highly reactive as it seeks to pair with a new free electron (Bashan et al., 2009). In this review, we studied how metal pollution combined with pharmaceutical pollution is related to oxidative stress in birds.

Materials and Methods

A total of 40 Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) at the age of 2 months and average weight of 180g were on a random basis divided into four experimental groups of 10 specimens (i.e., control, diclofenac, lead, and lead+diclofenac exposures). Six lead shots in the total weight of 1.5 grams were inserted into the crop on day 0 of the experiment, while a total of 5 mg/kg of diclofenac administered intramuscularly were divided into treatments on days 0 and 5. Group responses were compared using haematology and biochemistry after 10 days.

Results and Discussion

We studied hepatic lipid peroxidation measured as an increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In Figure 1. we can see TBARS concentrations in brain. In the group exposed to lead are statistically significant higher hepatic TBARS concentrations. It confirms the lead-induced oxidative stress.

Conclusions

In our experiment we studied toxic effects of heavy metals and pharmaceuticals in birds, primarily we analyzed effects on parameters of oxidative stress. Established data prove that heavy metals, such as lead and pharmaceuticals, such as diclofenac, are important contaminants, which are responsible for oxidative damage in biomolecules.

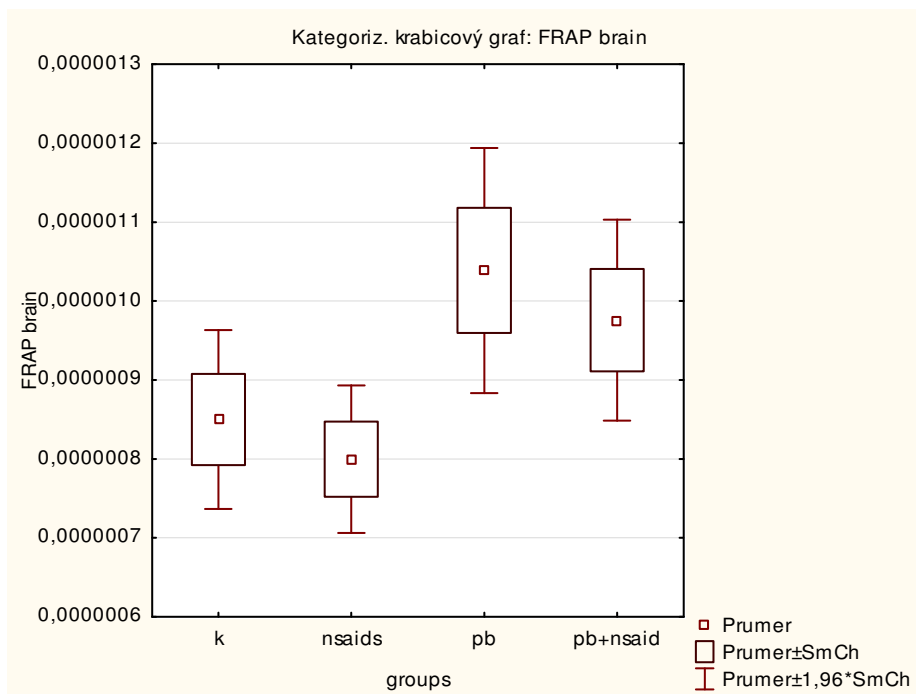


Figure 1: TBARS concentrations in brain.

Aknowledgements

The study was financially supported by the project IGA VFU Brno.

References

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J., Free radicals in Biology and Medicine, 2007, Oxford University Press, fourth ed.
- KOIVULA, M. J., EEVA, T.: Metal-reduced oxidative stress in birds, Environmental Pollution, vol. 158, p. 2359-2370, 2010.
- BASHAN N., KOVSAN, J., KACHKO, H., RUDICH, A.: Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Physiologica Reviews, vol. 89, no. 1, pp. 27-71, 2009.
- OZBEK, E.: Induction of Oxidative Stress in Kidney, International journal of Nephrology, vol. 2012, 9 pages.

Contact address: Jitka Osičková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, osickovaj@vfu.cz

Vliv těžkých kovů na embryonální vývoj u ptáků a líhivost kuřat

Effect of heavy metals on the avian embryonic development and hatchability of chicks

Škochová Hana, Osičková Jitka, Pikula Jiří, Band'ouchová Hana, Král Jiří,
Ondráček Karel, Kováčová Veronika

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

Summary

Birds are an important part of the landscape and therefore, any damage to bird populations caused by an environmental pollutants and pesticides is considered as an indicator of environmental disturbance. Environmental pollution may lead to adverse effects on reproduction of exposed birds and leads to disturbance of physiological processes at many levels. There is a direct effect on both the adult and the embryo. Effects on embryos include mortality or reduced hatchability, as well as cachexia and teratogenic effects. Within adult birds, the negative effects of these pollutants manifested acute mortality, sublethal stress, reduced fertility and ability to produce an egg, egg shell thinning and disrupted incubation.

Keywords: *heavy metals; kadmium; zink; avian embryo; birds*

Úvod

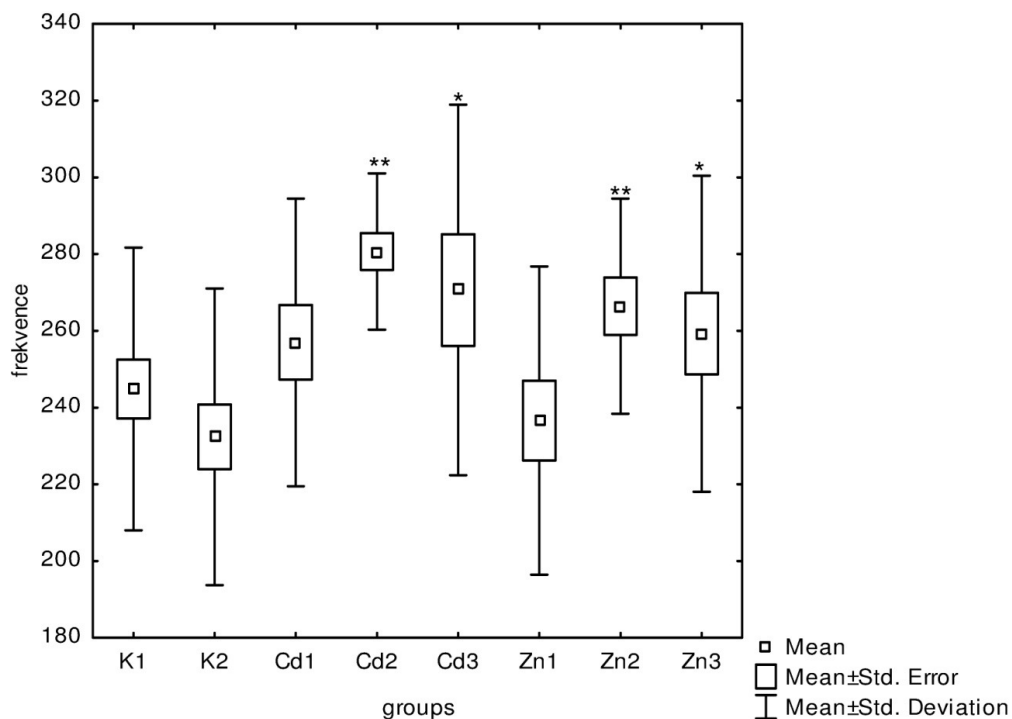
K polutantům, které mají nepříznivý vliv na ptačí populace, patří kromě organochlorových pesticidů a jiných průmyslových znečišťujících látek také těžké kovy (Fry, 1995). Zatímco obě ptačí pohlaví se zbavují těžkých kovů skrze exkreci a depozici do peří, samice jsou navíc schopné oproti samcům eliminovat těžké kovy do obsahu vajec, což může ohrozit ptačí embryo (Burger, 1994; Finkelstein et al., 2010). Mezi zástupce těžkých kovů nalezené ve vaječném obsahu patří olovo, kadmium, rtuť, selen, mangan a chrom (Burger, 1994). Hypotézou tohoto projektu je, že expozice ptačích populací těžkým kovům má za následek jejich eliminaci do ptačích embryí a tím způsobuje vznik embryonálních vývojových vad, dalších anomálií a mortalit.

Materiál a metodika

Do pokusu byla zařazena oplozená slepičí vejce. Pro každý dílčí experiment byly vytvořeny tři experimentální skupiny a dvě skupiny kontrolní. Expozice kadmiumu a zinku byla provedena aplikací tří různých koncentrací zkoumané látky do vajec z každé skupiny. V případě aplikace kadmia se jednalo o dávky: 0,05 mg/kg (2,5 µg/vejce), 0,1 mg/kg (5 µg/vejce), 0,5 mg/kg (25 µg/vejce). U zinku se jednalo o dávky: 5 mg/kg (250 µg/vejce), 10 mg/kg (500 µg/vejce), 50 mg/kg (2,5 mg/vejce). Čtvrtá kontrolní skupina zůstala vždy bez zkoumané látky a pátá kontrolní skupina byla navrtána a proběhla u ní simulace aplikace toxikantu do vajíčka. Po aplikaci látek byla vejce umístěna do inkubátoru. Následně docházelo k jejich prosvěcování, u vyvíjejících se zárodků byla měřena tepová frekvence. U neživotaschopných vajec nebo vajec nevylíhnutých po ukončení inkubace bylo provedeno otevření, posouzení patologických nálezů a fotodokumentace. Vylíhnutá kuřata byla zvážena a následně utracena. Byly od nich odebrány vzorky tkání (mozek, srdce, ledviny, játra a stehenní kost) pro měření parametrů oxidativního stresu a stanovení hladiny těžkých kovů, dále byly odebírány také vzorky na histopatologii.

Výsledky a diskuze

Efekt líhnutí u tří různých koncentrací kadmia (od nejnižší po nejvyšší) byl 50, 80 a 30%. U tří různých koncentrací zinku (od nejnižší po nejvyšší) byl efekt líhnutí 65, 65 a 45%. U kontrol byla líhnivost zjištěna na hodnoty 81% (s aplikací fyziologického roztoku) a 77% (bez aplikace). Následující graf zobrazuje rozdíly v srdeční frekvenci experimentálních a kontrolních skupin 13. den inkubace.



Graf 1: Srdeční frekvence 13. den inkubace.

Závěr

V experimentu jsme sledovali účinky těžkých kovů (kadmia a zinku) na embryonální vývoj u ptáků a líhnivost kuřat. Během našeho pokusu byly získány výsledky týkající se toxicity těžkých kovů pro ptáky. Zjistili jsme, že těžké kovy ve vejci v závislosti na koncentraci/dávce, ovlivnili vývoj ptačího embrya a způsobily snížení líhnivosti.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem č. 28/2012/FVHE.

Literatura

BURGER J. Heavy metals in avian eggshells: Another excretion method. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1994, 41: 207-220.

FINKELSTEIN ME, GEORGE D, SCHERBINSKI S, GWIAZDA R, JOHNSON M, BURNETT J, BRANDT J, LAWREY S, PESSIER AP, CLARK M, WYNNE J, GRANTHAM J, SMITH DR. Feather lead concentrations and $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ ratios reveal lead exposure history of California Condors (*Gymnogyps californianus*). *Environmental Science & Technology*, 2010, 44: 2639–2647.

FRY DM. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103: 165–171.

Kontaktní adresa: Hana Škočková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11005@vfu.cz

Influence of selected platinum metals on content of phytochelatins in pea plants (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.)

Mikulášková Hana, Němcová Barbora, Beklová Miroslava

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

Summary

*The aim of present study is monitoring of the impact of platinum (Pt) on the amount of phytochelatins in pea plants (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.), which are an important part of the food chain. In the experiment, seeds of plants were exposed to different concentrations of platinum ions (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/l}$) for 8 and 12 days. Phytochelatins were determined using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). Measured values shows difference of phytochelatins content not only in individual plants, but also in aerial and root parts of plants.*

Keywords: *platinum group metals; *Zea mays* L.; *Pisum sativum* L.; phytochelatins*

Introduction

Platinum group metals (Pt, Pd, Rh) are currently one of the frequently discussed environmental pollutants that are getting in to the environment mostly from automotive catalysts, in which the substance as an active catalyst uses a mixture of platinum metals, especially Pt, Pd, Rh. The combination of oxidation-reduction reactions and high temperatures causes emission of these metals into the environment (Sikorova et al., 2011). Platinum group metals are release into the environment to some extent also from hospital and industrial waste (Ravindra et al., 2004; Kummerer et al., 1997). Due to the good solubility of the platinum metals in water, certain compounds of these metals may get into the food chain and the human body (Dubielła-Jackowska et al., 2009).

To assess levels of environmental pollution by dangerous substances ecotoxicological tests should be extended to include chemical analyzes.

Material and Methods

Seeds of pea (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.) were used to determine the effects of platinum (Pt). The seeds were exposed to PtCl_4 at concentrations of 0, 5, 10, 25, 50 and 100 μM . For each variant were selected 100 seeds, which were placed on plates, covered with cellulose and left to germinate. The ends of cellulose were dipped in vessels with solution with different metal concentrations in volume 300 ml. Subsequently, the seeds sprouted in the culture box for 8 and 12 days in the dark at 25 ° C and humidity of 60%. In the 8 and 12 day of the experiment the harvested germs were carried out and metrics parameters (length, weight, dry weight) and electrochemical markers (GSH, GSSH) of aboveground and root parts were observed.

Chromatographic analysis was determined using „High performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). HPLC-ED system consisted of two solvent delivery pumps operating in the range of 0.001-9.999 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Model 582 ESA Inc., Chelmsford, MA), Zorbax eclipse AAA C18 (150 \times 4.6; 3.5 nm particles, Agilent Technologies, USA) and a CoulArray electrochemical detector (Model 5600A, ESA, USA).

Results and Discussion

Due to the large quantity of heavy metals in the plant, changes may occur in its structure and composition, not only at the cellular level, but also in metabolic processes. Therefore, plants have developed protective metabolic degradation of the pollutants, which causes creation of phytochelatins (PCs). These are peptides which bind to heavy metals and create complexes of them, which are, with usage of a transporters, transported to vacuoles, where they are accumulated (Kadalová, 2012).

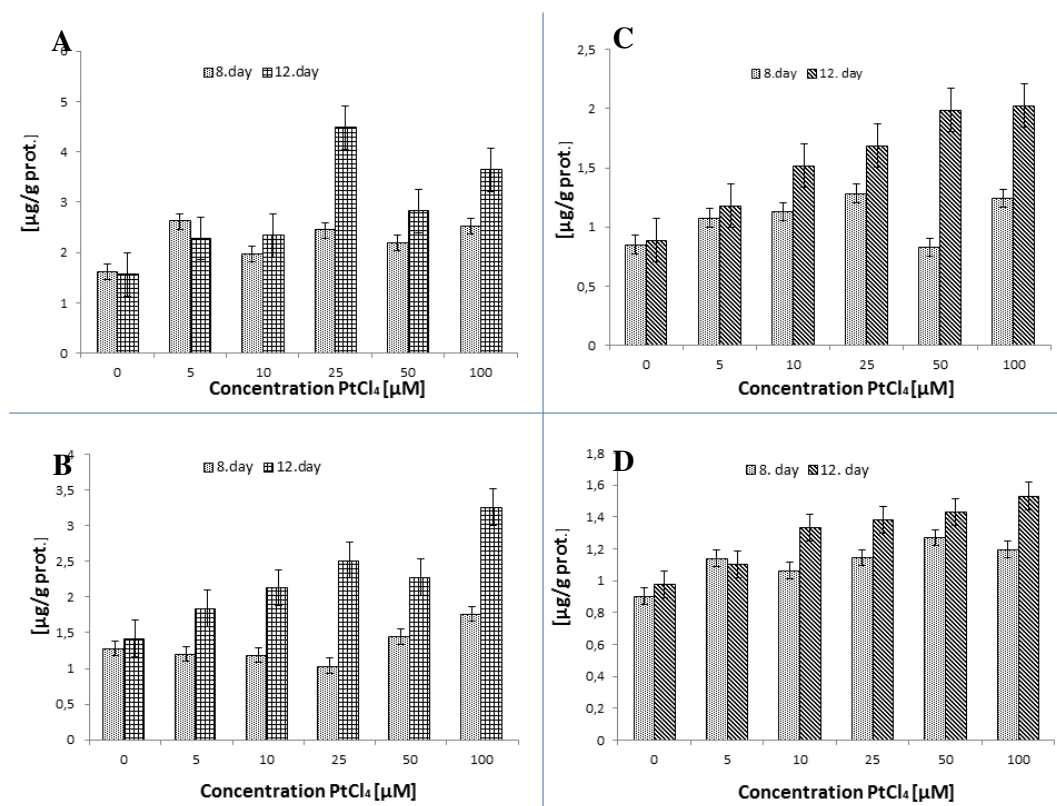


Figure 1: Influence of PtCl₄ on GSH/GSSH of pea in aboveground (A) and root (B) parts of plant and influence of PtCl₄ on GSH/GSSH of maize in aboveground (C) and root (D) parts of plant.

Using HPLC-ED content of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSH) and their determined ratio (Fig. 1 A, B, C, D). The ratio of these two measured parameters indicates increase of determined markers in all parts of the pea plants. The pea shoots were measured in the elevated concentration of 25 μM in the 8th collection day. In the root sections were observed elevations at 12 sampling days compared with the 8th collection day (Fig. 1 A, B). In the corn plants (Fig. 1 C, D) growth of determined markers were observed with increasing concentrations in both plant parts. Comparing these two plant types, higher values were measured in pea plants.

Pearson correlation coefficient of GSH and GSSH in pea was $r_p = 0.774$ and in maize $r_p = 0.657$.

Conclusion

Toxic effect of applied platinum, determined based on the inhibition of plant growth and chemical markers confirmed their bioavailability to plants. The presence of these metals is likely activator of defense mechanisms in plants. In the present experiment were compared two types of plants, such as pea representative dicotyledonous plants and corn as a representative monocot plants. From the measured values is clear that in the pea plants incensement of formation of phytochelatin was higher than in maize plants. These plants can be included in the group of hyperakumulators, which are especially suitable for phytoremediation (Mackova et al., 2005).

Acknowledgements

The work has been supported by IGA 25/2012/FVHE, IGA 83/2011/FVHE.

References

- RAVINDRA, K., BENCS, L., GRIEKEN V. R., Platinum group elements in the environment and their health risk. *Science of the Total Environment*. 2004, **318**(1-3): p.1-43.
- KUMMERER, K., HELMERS, E., Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Science of the Total Environment*. 1997, **193**(3): p. 179-184.
- DUBIELLA-JACKOWSKA, A., et al., Environmental Fate of Traffic-Derived Platinum Group Metals. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2009, **39**(4): p. 251-271.
- SIKOROVA, L., R. LICBINSKY, V. ADAMEC. Platinové kovy z automobilových katalyzátorů v životním prostředí. *Chemické Listy*. 2011, **105**: p. 361-366.
- MACKOVA, M., et al., Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*. [online], 2005 [cit. 2013-3-3] Dostupné z: www.phytosanitary.cz.
- KADALOVA, M., Charakterizace fytochelatinů a jejich komplexů s těžkými kovy v rostlinách s využitím LC/ESI-MS. *Diplomová práce*. 2012.

Contact address: Hana Mikulášková, Mgr., Veterinary Ecology and Environment Protection, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, MIKULASKOVAH@VFU.CZ

Hodnocení účinků platinových kovů na zástupce půdních bezobratlých (*Folsomia candida*)

Study of the impact of selected platinum group metals on representatives of soil fauna (*Folsomia candida*)

Němcová Barbora, Mikulášková Hana, Beklová Miroslava

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

Summary

Platinum group metals PGM 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. Our study is based on a collembolan laboratory breed, test optimization and validation according to the OECD 232 standards (CSN ISO 11267). The concentrations of PGM tested were as follows: 5, 10, 25, 50 and 100 μM . The results were evaluated using the inhibition of reproduction compared with controls. The EC_{50} (effective concentration) was determined after the 28-day test. The value of $28dEC_{50}$ of PtCl_4 was estimated on 200.4 μM and the measured $28dEC_{50}$ of PdCl_2 was 21.0 μM .

Keywords: *Folsomia candida*; platinum group elements; platinum; ecotoxicology; Collembola

Úvod

V současné době se v souvislosti s zátěží životního prostředí dopravou soustřeďuje pozornost na platinové kovy (PGM) (Wiseman and Zereini, 2009). Hlavním zdrojem emisí PGM jsou automobilové katalyzátory a dále průmyslový a nemocniční odpad (Sikorova et al., 2011). Chování a účinky platinových kovů zatím nejsou blíže prostudovány, zejména jejich distribuce v rámci potravního řetězce a schopnost bioakumulace (Ravindra et al., 2004). Pro získání objektivních informací o míře poškození jednotlivých složek životního prostředí je tedy nezbytná ekotoxikologická analýza (Beklová, 2003).

Cílem předkládané práce bylo rozšíření informací a zhodnocení vlivu platinových kovů platiny a paladia na zástupce půdních bezobratlých a to konkrétně na chvostoskoky. Byl proveden test inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*), dle metodiky OECD 232 [ČSN ISO 11267 - Kvalita půdy - Inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) látkami znečišťujícími půdu]. Účinek Pt, Pd byl hodnocen po 28 dnech od začátku testu na základě vyhodnocení mortality dospělců a nepřímo reprodukce prostřednictvím počtu nově vylíhnutých jedinců (juvenilů).

Materiál a metody

Podstatou zkoušky je vystavení deseti zdravých nedospělých jedinců *F. candida* působení směsi zkoušeného vzorku s umělou půdou. Po 28 dnech byl zjištěn celkový počet chvostoskoků. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou pro zkoušenou směs a pro kontrolu (obojí v 5 opakováních) se vyjádřil jako procento inhibice reprodukce chvostoskoků.

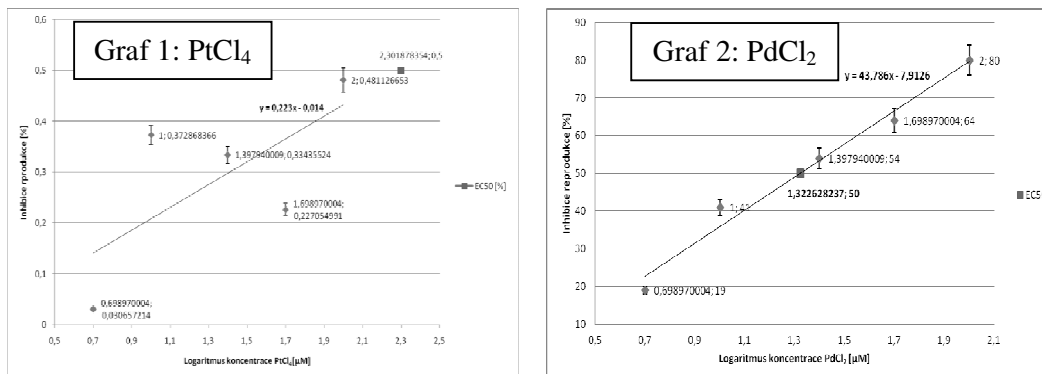
Koncentrační řada použitá v experimentu byla stanovena na 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$ PtCl_4 ; PdCl_2 . Na počátku testu bylo nasazeno celkem 10 chvostoskoků starých 10 - 12 dnů pro každou 100 ml skleněnou láhev. Umělá půda jako testovací substrát byla

připravena tak, jak je předepsáno v OECD 232 (2009). Do takto připraveného substrátu byl aplikován PtCl_4 ; PdCl_2 v příslušné koncentraci. Zkušební láhve byly uzavřeny a inkubovány v kultivačním boxu při 20 °C s fotoperiodou světlo/tma 16h/8h a intenzitou osvětlení 400 lx - 800 lx. Po ukončení zkoušky se nádoba se zkoušenou směsí zalila vodou. Vzniklý roztok se přelil na Petriho misku a obarvil černým inkoustem. Povrch hladiny byl vyfotografován a následně vyhodnocen v programu ImageJ.

Vliv platiny a paladia na reprodukci chvostoskoků byl hodnocen na základě efektivní koncentrace (EC) PtCl_4 a PdCl_2 , která způsobí 50% inhibici reprodukce ve srovnání s kontrolou za 28 dní.

Výsledky a diskuse

Zkouška s *F. candida* splnila kritéria normy ČSN ISO 11267. Výsledky testu toxicity s PtCl_4 a PdCl_2 jsou uvedeny v grafů 1-2. Reprodukce obvykle ukázala vyšší variabilitu na replikaci než mortalita. Efektivní koncentrace (28dEC50) PtCl_4 byla stanovena na 200,4 $\mu\text{M.l}^{-1}$ a pro PdCl_2 21,0 $\mu\text{M.l}^{-1}$. U koncentrací 25; 50 a 100 $\mu\text{M.l}^{-1}$ došlo k výskytu morfologických změn a to k výraznému zmenšení tělesného růstu vlivem paladia. V tabulkách 1-2 je shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu PtCl_4 a PdCl_2 na *F. candida*. Bylo prokázáno snížení reprodukce juvenilů s rostoucí koncentrací PtCl_4 a PdCl_2 , vliv na mortalitu dospělců se neprojevil.



Graf 1-2: Inhibice reprodukce *F. candida* působením PtCl_4 / PdCl_2 po 28 dnech.

Tabulka 1: Shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu PtCl_4 na *F. candida*.

Koncentrace PdCl_2 [$\mu\text{M.l}^{-1}$]	Počet dospělých		Mortalita [%]	Počet juvenilů	CV [%]	SD	Inhibice reprodukce [%]
	Na začátku testu	Na konci testu					
5	10	9,6	4	1042,4	5	48,5	19
10	10	9,6	4	761,6	4	32,6	41
25	10	9,6	4	589,4	6	36,5	54
50	10	10	0	463	7	34,5	64
100	10	10	0	262,4	13	34,6	80

Tabulka 2: Shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu PdCl₂ na *F. candida*.

Koncentrace PtCl ₄ [μM.l ⁻¹]	Počet dospělých		Mortalita [%]	Počet juvenilů	CV [%]	SD	Inhibice reprodukce [%]
	Na začátku testu	Na konci testu					
5	10	9,4	6	1011,8	6	63	3
10	10	9,6	4	654,6	7	46	37
25	10	10	0	694,8	11	76	33
50	10	10	0	806,8	3	23	23
100	10	9	10	541,6	8	41	48

Závěr

Z výsledků řešeného projektu je patrné, že inhibice reprodukce *F. candida* je vhodným ukazatelem působení platinových kovů. Hodnota 28dEC50 pro PtCl₄ byla 200,4 μM.l⁻¹ a pro PdCl₂ 21,0 μM.l⁻¹. Subjektivně byly zaznamenány výrazné změny tělesného růstu a to především u paladia s rostoucí koncentrací kovu. Je možné konstatovat, že paladium má výraznější vliv na reprodukci než platina a tím se nám podařilo potvrdit trend toxického působení udávaný literaturou (Rh(III) <<Pt(IV) <Pd(II)) (Fargo and Parsons, 1994). Výsledky lze považovat za aktuální z hlediska rozvoje vědy i pro praktické posuzování možného vlivu platiny na půdní prostředí.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 21/2012/FVHE.

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.

FARGO, 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.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 232: Collembolan Reproduction Test in Soil. 2009.

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.

SIKOROVA L., LICBINSKY R., ADAMEC V. Platinové kovy z automobilových katalyzátorů v životním prostředí. *Chemické listy*. 2011, vol. 105, s. 361-366.

WISEMAN, C.L.S.; ZEREINI, F. Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: a review of recent evidence. *Science of the Total Environment*. 2009, vol. 407, s.493-500.

Kontaktní adresa: Barbora Němcová, Mgr., Ústav veterinární ekologie a životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, nemcovab@vfu.cz

Interaction of arsenic and cyanobacteria on haematological parameters of *Oncorhynchus mykiss*

Navrátil Lukáš, Palíková Miloslava, Navrátil Stanislav

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Veterinary and Pharmaceutical Sciences, 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: *blue-green algae; arsenik; erythrocytes; recirculation*

Introduction

Arsene

In many developing countries are high concentrations of arsenik in groundwater. Today use of arsenic and arsenic compounds mostly in the industry for the manufacture of glass, different enamels, pigments and metallurgy (Szkoda et al., 2009). Toxicity of arsenic depends, on the chemical form, its toxic inorganic form. Chronic effects of arsenic may cause leukopenia, anemia, skin cancer and lung. Arsenic in the environment enters due to pollution of the aquatic environment, anthropogenic activities, especially. Arsenic can accumulate into each fish and shellfish, and if they are consumed by humans, so arsene gets further into the food chain (Martin et al., 2012). Arsenic in the aquatic environment may affect the water biont and thus poses a risk to fish (Kumar et al., 2011). Arsenic in fish causes reduction in the number of erythrocytes and reducing the number of leukocytes (Abernathy et al., 2003).

Cyanobacteria

A number of species of cyanobacteria produces several variants of microcystins, in the strain usually predominates one to three variants. The most common form is microcystins –LR, -YR a –RR, these are abbreviations of amino acids in position 2 and 4 and their derivatives desmethyled (Sivonen and Jones, 1999). Microcystins are globally distributed in freshwater in the form of water-bloom. This flower disrupts aquatic ecosystems around the world, especially eutrophic (Yang et al. 2010). Microcystins can cause oxidative stress in crustaceans (Vinagre, 2003) and it is associated with immunosuppression in fish (Rymuszka, 2008).

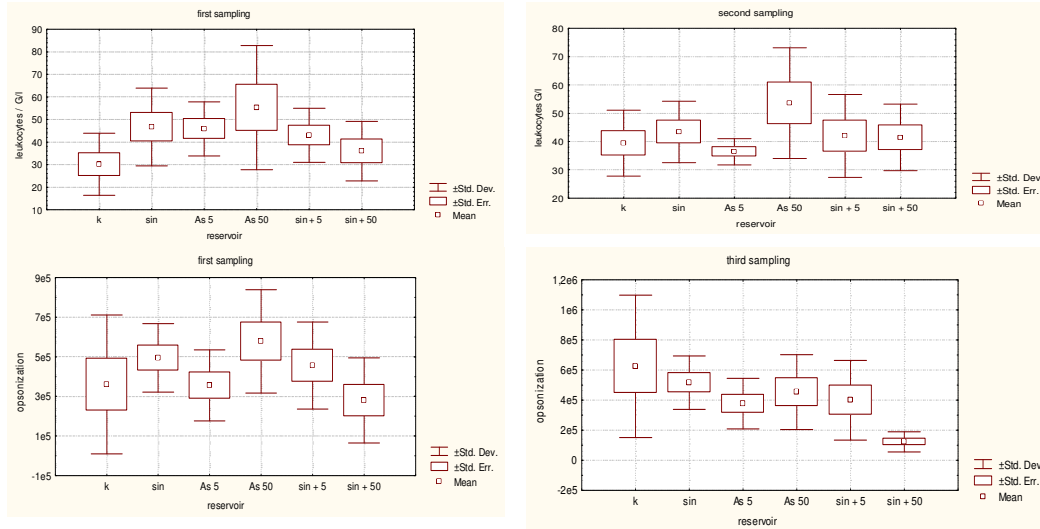
Changes in hematology parameters have been found in some studies, in which the fish were exposed to natural effects of cyanotoxins (Kopp et al, 2005; Kopp et al.2009; Kopp et al 2010). These effects are more natural, but the observed changes may be resulted not only toxic cyanotoxins, but also other side effects such as hypoxia, higher pH, high concentrations of ammonia and possible further, which are in the water (Sieroslawska et al., 2011).

Materials and Methods

The initial average body weight and total length of rainbow trouts was $292,5 \pm 40,7$ g and $285,8 \pm 10,0$ mm, respectively. The concentration of microcystins was 27mg / 1 kg

of food, i.e. 0.4 mg /1kg of fish weight and day. Recirculating tanks were divided as follows: 1) control, 2) Cyanobacterial, 3) 5 ppm As, 4) 50 ppm As, 5) Cyanobacterial and 5 ppm As, 6) Cyanobacterial and 50 ppm As. Sampling was carried out three times at intervals of 10 days. For each tank during one sampling removed 7 fish. During an attempt to monitor chemical parameters of the water. After killing humanity took the fish blood. To determine the number of leukocytes method was used mining with subsequent counting in Bürker chamber. Oponization was also determined.

Results



k- control, sin- cyanobacteria, As5- arsene 5 ppm, As50- arsene 50 ppm, sin+5- cyanobacteria and arsene 5 ppm, sin+50- cyanobacteria and arsene 50 ppm

Discussion

The rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were monitored leukocyte after exposure to cyanobacteria and arsenic. Furthermore, opsonization followed parameter. Physiological range is from leukocytes 10 – 60 G.l⁻¹. Statistical evaluation of were conducted using one-way Anova. With the subsequent evaluation with Schiff's test. The leukocytes were recorded statistical differences the first sampling $F(5,35)=1,86$; $p<0,1269$, at control {0,008696}, further at Arsene 50 ppm {0,008696; 0,04807}. Also reported were statistical differences at the second sampling $F(5,36)=1,42$; $p<0,2407$ and in control {0,048926}, then for arsenic 5 ppm {0,01836} and the arsenic 50 ppm {0,048926; 0,01836}. Were also recorded statistically significant differences for opsonization and both the first sampling $F(5,36)=1,43$; $p<0,2375$, the tank with arsenic 50 ppm {0,026076} and the tank with a combination of cyanobacteria and arsenic 50 ppm {0,026076}. Statistical difference was also observed in the third sampling $F(5,36)=2,86$; $p<0,0284$ at control {0,0011}, furthermore the tank cyanobacterial {0,008496}. Statistical differences were recorded in a tank with arsenic 50 ppm {0,02493} and the tank cyanobacterial and arsenic 50 ppm {0,0011; 0,008496; 0,02493}. These data point to effect of arsenic and cyanobacteria the leukocyte counts and opsonic capacity rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*).

Conclusion

The collected data some influence is evident Arsenic on leukocytes rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Some influence arsenic, cyanobacteria and a combination of both, is evident in the opsonic capacity. The data are part of a wider research.

References

- 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, MAREŠ J, KUBÍČEK 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, MAREŠ J, PALÍKOVÁ M, NAVRÁTIL S, KUBÍČEK Z, ZIKOVÁ A, HLÁVKOVÁ J, BLÁHA 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., PALÍKOVÁ M., NAVRÁTIL S., KUBÍČEK Z., ZIKOVÁ A., MAREŠ 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.

Contact address: Navratil Lukas, Mgr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, FVHE VFU Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, H10011@vfu.cz

Optimalizace metody SPME pro stanovení methylrtuti ve vodě Optimization of the SPME method for the determination of methylmercury in water

Králová Zuzana, Vávrová Milada, Šucman Emanuel, Večerek Vladimír

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

Summary

The aim of this study was to optimization the SPME extraction method and optimization GC/ECD method. Methylmercury is one of the most toxic substances present in the environment and biota, and thanks to its accumulate and persistent character. Solid-phase microextraction (SPME) is preanalytical method, which is described for the determination of methylmercury in water matrices. The analytical procedure involves derivatization of ionic mercury with sodium tetraethylborate in a sample vial and following extraction with a silica fiber coated with polydimethylsiloxane (PDMS). Standard of methylmercury for the optimization SPME method was used. The fibre, time, temperature and pH, was optimized for the extraction method by SPME. Methylmercury was determined by gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD).

Keywords: methylmercury; SPME; optimization; GC/ECD

Úvod

Přítomnost rtuti v životním prostředí je stále aktuální téma. Tento prvek je nejvíce nebezpečný ve své organické formě, zejména jako methylrtuť (Wright, Welbourne, 2002). Ve vodě je methylrtuť v nízké koncentraci, nebezpečí spočívá především ve schopnosti bioakumulace. Z vody se dostává činností bakterií žijících v sedimentu do fytoplanktonu, zooplanktonu, dalších vodních živočichů a dále do potravního řetězce, na jehož konci je člověk. V koncových člancích potravního řetězce může být až o několik řádů více methylrtuti než ve vodě (Houserová et al., 2006). Proto je zapotřebí ve vodě methylrtuť stanovovat a takto sledovat znečištění vodního ekosystému tímto analytem. Důraz je v dnešní době kladen na vysoce citlivé metody, díky nimž se dají stanovit i velice nízké koncentrace. K těmto metodám patří i izolační metoda SPME.

Princip SPME: analyty se sorbují na křemenné vlákno potažené tenkou vrstvičkou stacionární fáze, tvořenou různými kombinacemi polymeru, nejčastěji polydimethylsiloxanem (PDMS), polydivinylbenzenem (DVB) a Carbovaxem (CAR). Vlákno je uloženo v duté jehle, která ho chrání před poškozením. Vlákno se pak umístí do uzavřené SPME lahvičky a analyt se sorbuje za určitých podmínek (čas, teplota, pH, atd.); potom se vlákno zasune zpět do jehly a umístí se do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde je vysoká teplota a látky naadsorbované na vlákno se ihned desorbují a jsou dávkovány do kolony, kde dochází k separaci a identifikaci (Sporgert, Pragst 2000). „Head-space“ (HS-SPME) je používána pro extrakci těkavých látek ze vzorku, v našem případě vody. Její výhodou je vysoká čistota extraktu (Barra et al. 2007; Sporgert, Pragst, 2000).

Materiál a metody

V této práci jsme se věnovali optimalizaci metody HS-SPME pro stanovení methylrtuti ve vodě. Pro práci byla použita voda o čistotě suprapur. Do skleněné vialky o objemu

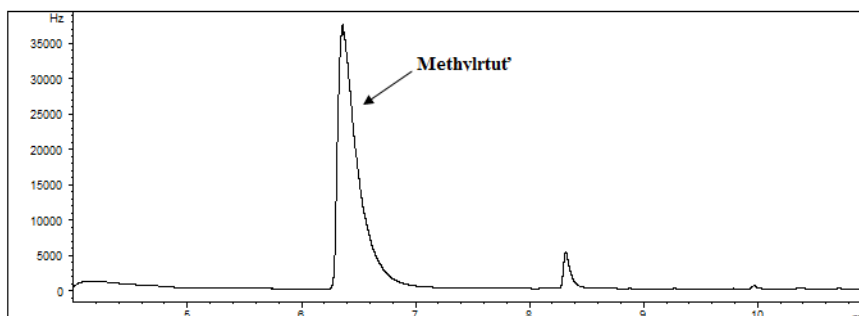
22 ml se napipetovalo 15 ml této vody, přidal se standard methylrtuti o určité koncentraci, kterým se voda kontaminovala, dále derivatizační činidlo tetraethylboritan sodný a pufr o určitém pH. Do lahvičky se přidal míchadélko, vialka se uzavřela a vložila se do vodní lázně umístěné na elektromagnetické míchačce. Doba určená pro předmíchání, inkubaci a derivatizaci byla 30 minut. Poté bylo septum vialky propíchnuto jehlou a z jehly vysunuto vlákno do „head-space“ prostoru pod víčkem. Extrakce proběhla sorpcí methylrtuti na stacionární fázi na vláknech. Vlákno se zasunulo zpět do jehly a znovu se vysunulo v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, kde pod vlivem vysoké teploty proběhla desorpce z vlákna. Následně proběhla chromatografická analýza.

Tabulka 1: Optimalizované podmínky GC/ECD pro stanovení methylrtuti.

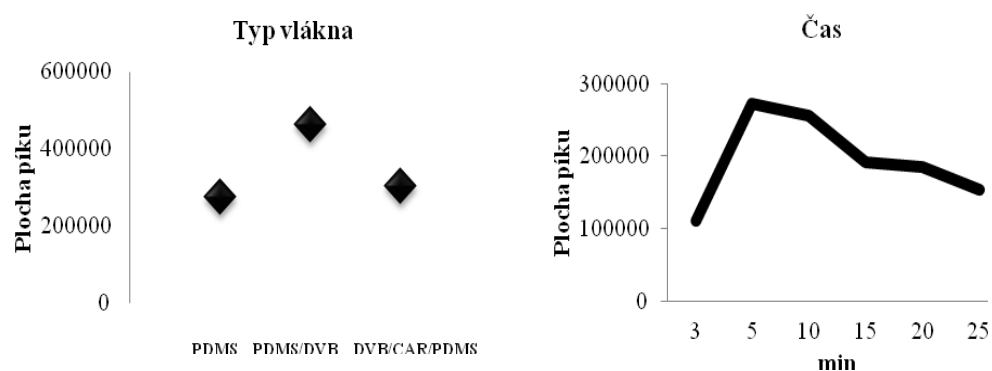
Kolona	Rxi-17 capillary 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m film Restek, Chromservis, CZE
Program	35 °C - 3 min zadrž 15 °C/1 min do 180 °C 20 °C/1 min do 250 °C
Detektor	280 °C

Výsledky a diskuze

Výsledky byly zpracovány graficky. Na Obrázku 1 je zobrazen chromatogram methylrtuti při optimalizovaných podmínkách GC/ECD.

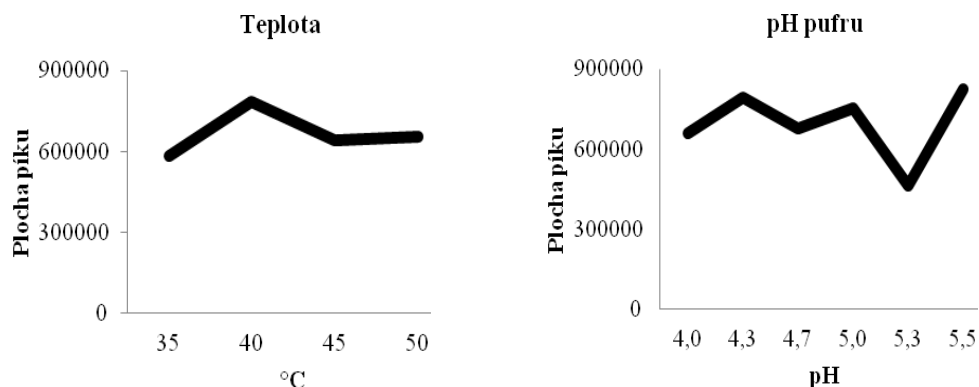


Obrázek 1: Chromatogram optimalizované metody GC/ECD.



Graf 1 a 2: Optimalizace metody SPME – typ vlákna a doba extrakce.

Z Grafu 1 vyplývá, že nejlepší výsledky byly dosaženy s modrým vláknem (65 μm PDMS/DVB); ostatní dvě vlákna (100 μm PDMS a 50/30 μm DVB/CAR/PDMS) jsou pro toto stanovení také vhodná, avšak 65 μm PDMS/DVB poskytuje nejvyšší odezvu. Z Grafu 2 je zřejmé, že optimální doba extrakce je 5-10 minut, při delší expozici vlákna nedochází k větší adsorpci methylrtuti na vlákno, naopak se postupně snižuje.



Graf 3 a 4: Optimalizace metody SPME – teplota a pH pufru.

Prostřednictvím Grafu 3 je znázorněn průběh optimalizace teploty. Na základě této křivky můžeme říci, že optimální teplota pro derivatizaci a extrakci je 40 °C. Na Grafu 4 jsou prezentovány výsledky optimalizace při použití pufrů o různém pH. Ideální pro extrakci je mírně kyselé pH, optimální je pH 5,0.

Závěr

V této práci byla řešena optimalizace stanovení methylrtuti ve vodě, založená na extrakci metodou SPME, která je rychlá, účinná a vysoce citlivá a na vlastním stanovení plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchytu. Experimentálně zjištěné optimální podmínky extrakce byly následující: pro extrakci bylo použito modré vlákno (65 μm PDMS/DVB), vzorek vody byl upraven přidáním pufru o pH 5,0; teplota při derivatizaci a extrakci byla 40 °C a doba extrakce byla optimalizována na 5 minut. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyšší odezvy na GC/ECD.

Poděkování

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

Literatura

Seznam použité literatury je dostupný u autora.

Kontaktní adresa: Zuzana Králová, Mgr., Ústav ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, zuzanakralova@centrum.cz

Výskyt bisfenolu A v balených vodách

Occurrence of bisphenol A in bottled waters in polyethylene terephthalate

Tesařová Simona, Hobza Ondřej, Vávrová Milada, Charvátová Michaela

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

Summary

Bisphenols form a group of chemical substances containing two hydroxyphenyl functionality groups in their molecule. Bisphenol A (BPA) with the simplest structure is also the most famous and the most monitored and determined bisphenol. Bisphenols inclusive bisphenol A are used as monomer for polymerisation or as additives to various types of plastics, including polyethylene terephthalate (PET). I focused on determination of bisphenol A in extended samples of bottled waters into PET in my present work. Optimised method from my last work, solid phase microextraction (SPME) for isolation with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) for actual determination, was used. Found quantity of determined analyte in 20 samples of PET-bottled waters was in range from not detected to 189, 0 µg/ml.

Keywords: *bisphenol A; polyethylene terephthalate; solid phase microextraction; gas chromatography; mass spectrometry*

Úvod

Bisfenol A neboli 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan patří mezi nejčastěji diskutovaná rezidua obalových materiálů dnešní doby. Díky pozitivním užitným a technologickým vlastnostem (antioxidant, retardér hoření) nachází největší uplatnění jako monomer při výrobě polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic. Celosvětová produkce BPA stále roste, a to i přes jeho významné negativní vlivy na živé organismy. Mezi nejzávažnější toxické účinky patří endokrinní aktivita (především estrogenní) a karcinogenita. Do popředí zájmu se dostal především díky výskytu v polykarbonátových plastových lahvích pro kojence (Ballesteros-Gomez et al., 2009, Fernandez et al., 2007, Zafra et al., 2003, Xiangli et al., 2006).

Používání bisfenolu A v materiálech určených pro styk s potravinami, a to pro děti ve věku do 3 let, je omezeno v zemích Evropské unie Směrnicí Komise 2011/8/EU. Tato směrnice uložila zákaz výroby kojeneckých lahví obsahujících BPA od března 2011 a od června 2011 platí i zákaz dovozu a prodeje těchto lahví. V národní legislativě ČR byla tato směrnice zapracována do Vyhlášky č. 111/2011 Sb (Směrnice Komise 2011/8/EU, 2011, Kapoun, 2011).

Přestože se neuvádí přímé používání BPA při výrobě polyethylen tereftalátu (PET), cílem této práce bylo stanovit koncentrace bisfenolu A ve 20 vzorcích balených vod v PET, neboť balené vody představují významnou potravinářskou komoditu.

Materiál a metody

Práce navazuje na předchozí studii zaměřenou na stanovení bisfenolů ve vzorcích vod. Prozatím se na našem pracovišti stanovoval bisfenol A ve 20 náhodně vybraných vzorcích balených vod. Z předchozího experimentu vyplynul patrný vliv syčení vody oxidem uhličitým a také vliv objemu lahve. Zakoupené vzorky byly proto rozděleny podle objemu a syčení oxidem uhličitým do pěti skupin po 4 vzorcích. První skupina

vzorků představovala balené vody o objemu 0,5 l neperlivé (BVMN), dalšími skupinami byly balené vody o objemu 0,5 l perlivé (BVMP), balené vody o objemu 0,75 l neperlivé (BVSN), balené vody o objemu 1,5 l perlivé (BVVP) a balené vody o objemu 1,5 l neperlivé (BVVN).

Pro vlastní experiment byly připraveny tři standardní roztoky o koncentracích 1000 µg/ml, 100 µg/ml a 10 µg/ml. Ze těchto standardních roztoků bylo připraveno 5 kalibračních roztoků o následujících koncentracích: 104 µg/ml, 260 µg/ml, 520 µg/ml, 780 µg/ml a 1040 µg/ml.

K izolaci analytu byla použita optimalizovaná metoda přímé mikroextrakce tuhou fází (SPME) pro stanovení bisfenolů ve vodách (Tesařová, 2011), která probíhala za následujících podmínek: do SPME vialky bylo nadávkováno 7,5 ml vody ze vzorku a 100 µl acetonitrilu, vložilo se míchadlo a vialka se uzavřela; 10 minut probíhalo předmíchání a za stálého míchání vzorku na elektromagnetickém míchadle, rovněž po dobu 10 minut, probíhala sorpce na 50/30 µm vlákno DVB/CAR/PDMS (divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan).

Stanovení metodou GC-MS bylo prováděno na plynovém chromatografu 6890N (Agilent Technologies, USA), na koloně DB-5MS (20 m x 0,180 mm x 0,18 m), s využitím hmotnostně spektrometrického detektoru 5973N (Agilent Technologies, USA). Podmínky chromatografické analýzy byly nastaveny stejně, jako v předchozím experimentu: 150 °C po dobu 2 minut, 30 °C/min do 270 °C, zadrž 6 minut, celková doba analýzy byla 16 minut. Průtok nosného plynu, helia, byl nastaven na 1,1 ml/min. Technika nástřiku bylo splitless, vlákno se vkládalo do nástřikového prostoru vytemperovaného na 260 °C. Teplota iontového zdroje a Transfer Line byla 230 °C. Režim stanovení byl SIM - snímané ionty pro BPA 228 m/z.

Výsledky a diskuse

Koncentrace analytu BPA v analyzovaných vzorcích byly vyhodnocovány metodou 5 bodové kalibrační křivky (koncentrace kalibračních roztoků byly 104 µg/ml, 260 µg/ml, 520 µg/ml, 780 µg/ml a 1040 µg/ml).

Výsledky analýzy 20 balených vod, při kterých byla pro izolaci analytu z matrice použita metoda SPME a jako rozhodčí metoda GC-MS, jsou shrnuty do tabulky 1. Relativní směrodatná odchylka RSD byla 6,52 %, mez detekce LOD 0,202 µg/ml a mez stanovitelnosti LOQ 0,672 µg/ml.

Stejně jako v předchozím experimentu, projevil se i v tomto případě na výsledcích vliv velikosti obalu balených vod. Vody balené do lahví o objemech 0,5 l obsahovaly vyšší hodnoty analytu, než vody balené do lahví o objemech 0,75 l a 1,5 l. Vliv syčení vody oxidem uhličitým nebyl signifikantní. Na základě celkového zhodnocení lze konstatovat, že vody balené do PET lahví neobsahují významné koncentrace BPA, a proto lze konstatovat, že riziko kontaminace tímto analytem, pocházejícím z balených vod, je zanedbatelné.

Protože však dosud nebyla použita metoda SPME optimalizována pro jednotlivé zástupce bisfenolů, lze předpokládat, že pokud bude pro jejich stanovení použita optimalizovaná metoda, mohou se výsledky lišit. Na základě tohoto závěru lze říci, že ve svých dalších experimentálních studiích se budu nejprve věnovat optimalizaci této metody, a to pro stanovení jednotlivých bisfenolů.

Tabulka 1: Koncentrace BPA zjištěné v balených vodách.

Vzorek	Koncentrace [µg/ml]	Vzorek	Koncentrace [µg/ml]
BVMP Saguaro	189,0	BVVP Saguaro	83,31
BVMP Bonaqua	< LOD	BVVP San Terra	8,602
BVMP Aquila	7,254	BVVP Dobrá voda	50,05
BVMP Mattoni	< LOD	BVVP Rajec	< LOD
BVMN Saguaro	66,12	BVVN Toma natura	37,48
BVMN Bonaqua	131,7	BVVN Albert aqua	42,26
BVMN Anna	< LOD	BVVN Lucka	< LOD
BVMN Vittel	< LOD	BVVN Rajec	5,732
BVSN Rajec	61,41	BVSN Aquila	71,42
BVSN Mattoni	0,740	BVSN Vittel	66,33

Závěr

Pro izolaci bisfenolu A z balených vod byla použita již optimalizovaná metoda SPME pro stanovení bisfenolů (bisfenol A, bisfenol F, bisfenol A diglycidyl ether a bisfenol F diglycidyl ether) ve vodách. Cílem této studie bylo prokázat možný výskyt BPA v balených vodách. Zjištěné výsledky byly variabilní, a proto by bylo vhodné měření opakovat po optimalizaci metody SPME přímo pro každý jednotlivý analyt. Ve srovnání s výsledky získanými v roce 2011 byly zjištěné koncentrace bisfenolu A v některých případech mnohem vyšší, nejvyšší hodnota 189,0 µg/ml byla prokázána ve vzorku perlivé vody Saguaro o objemu 0,5 l; naopak nejnižší stanovitelná koncentrace BPA (0,740 µg/ml) obsahovala neperlivá voda Mattoni o objemu 0,75 l.

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, H12027@vfu.cz

Burden of the Svatka river ecosystem with selected organohalogenic pollutants

¹Jírová Alice, ¹Králová Zuzana, ²Vávrová Milada, ¹Charvátová Michaela

¹ Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences
Brno

² Faculty of Chemistry, University of Technology Brno

Summary

The aim of this study was to assess the level of contamination by organohalogenic pollutants in the Svatka river in the South Moravian region. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) were selected as monitored contaminants. These analytes were monitored in water and aquatic plants matrices. A method of solid-phase extraction (SPE) was used for isolation of PCBs and PBDEs from water samples and a method of ultrasonic extraction was used for isolation above mentioned analytes from aquatic plants samples. Analysis also included pre-analytical sample treatment consisting of extract purification and concentration, followed by an identification and quantification by gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD). The results obtained from the presented paper were used to assess the level of contamination by organohalogenic pollutants in the Svatka River, South Moravian region.

Keywords: PCBs; PBDEs; GC/ECD; monitoring; water; aquatic plants

Introduction

Surface water pollution by persistent organic pollutants (POPs) is a permanent problem not only in the Czech Republic. PCBs and PBDEs are frequently and commonly detected organohalogen pollutants. PCBs occur in the surface water either adsorbed to suspended and bottom sediment or on the phytoplankton. A higher occurrence of PCBs in surface water can be connected with ecological accidents. Another source of contamination is atmospheric deposition (Rutilio et al., 2010). PBDEs are used as flame retardants and their monitoring has recently been extended because many everyday products include commercial mixtures that contain these organic pollutants. Their concentration in the aquatic ecosystem is substantially lower than the concentration of PCBs (Kelly et al., 2008; Oros et al., 2005).

Because of PCBs and PBDEs very slow degradability, these compounds persist in the environment for many years after the application. The most negative impact of these substances on the environment is their lipophilicity which causes a high level of accumulation in biological systems. Due to their high toxicity they can be dangerous for human and animals (Jeong et al., 2001; Kelly et al., 2008). Under the monitoring is necessary to pay attention to observe the contamination of the aquatic ecosystem, because it is a very sensitive part of the environment that reliably reflects any negative changes.

Materials and Methods

Samples and investigated analytes:

Water and aquatic plants were taken from six sampling sites of the Svatka river in the city of Brno and the surrounding area. Polybrominated diphenyl ether congeners

BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183 were examined and polychlorinated biphenyl congeners CB 28, 52, 101, 118, 153, 138 and 180 were examined.

Extraction of water samples using SPE (solid phase extraction):

A sample treatment included the water filtering through glass fibre filters and the adding 30 mL of isopropanol. C18 (500 mg/6 mL) cartridges were used. The SPE procedure is shown in the Table 1.

Table 1: SPE procedure of the water extraction.

Cartridge conditioning	2x5 mL of methanol
	5 mL of the mixture of distilled water : isopropanol (85:15)
	the cartridge do not dry after the conditioning
	»waste container«
Sample addition and extraction	5 mL of the sample put on by the pipette
	the rest of the sample put on by the tube
	adjust the speed aspiration of 5-8 mL/min
	»waste container«
Cartridge wash	1 mL of the mixture of distilled water : isopropanol (85:15)
	»waste container«
Analytes elution	2 mL of dichloromethane
	30 s drying under the gentle nitrogen flow
	»collecting container«

Extraction of aquatic plants samples using the ultrasonic extraction:

Aquatic plants were dried out and homogenized. 10 g of the sample was transferred into the round-bottom flask and 60 mL of the mixture n-hexane : acetone (3:2) was added. Ultrasonic extraction was applied three times for 20 minutes. The final extract was filtered through Na₂SO₄ anhydrous and reduced to 2 mL volume under the vacuum rotator. This 2 mL volume of extract was cleaned-up by a column chromatography. It was used mixed column (florisil : Al₂O₃,1:1, 1 cm Na₂SO₄ anhydrous on the top and on the bottom). The column was filled with n-hexane. Target analytes were eluted by 90 mL mixture of n-hexane : diethyl ether (94:6).

Both types of extracts were filtered via nylon syringe filters (0.45 µm) and so prepared vials were transferred into an auto-sampler for subsequent analysis by GC/ECD.

Determination and quantification of target analytes:

Analysis was performed by gas chromatograph HRGC HP 6890N equipped with two µECD detectors. H₂ as a carrier gas, N₂ as a make-up gas, two columns in parallel (HT-8 and DB-17MS) were used. Oven temperature program of PBDEs analysis was set up from 200 °C to 300 °C. Oven temperature program of PCBs analysis was set up from 50 °C to 300 °C.

Results and Discussion

Table 2: Concentrations of PCBs in water samples [ng.L⁻¹].

Sampling site	CB 28	CB 52	CB 101	CB 118	CB 153	CB 138	CB 180	Σ PCBs
1	7.311	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4.419	1.591	13.32
2	5.389	< LOD	26.40	< LOD	19.19	4.172	< LOD	55.15
3	3.197	< LOD	22.35	< LOD	11.59	3.926	< LOD	41.06
4	3.383	< LOD	21.22	< LOD	3.009	4.851	4.200	36.66
5	2.689	< LOD	18.83	< LOD	3.537	5.495	< LOD	30.55
6	3.456	< LOD	18.65	< LOD	< LOD	5.910	5.093	33.11

LOD - Limit of Detection, < LOD - Not Detected, CB - Chlorinated Biphenyl, Σ PCBs - Sum of PCBs

Table 2 shows that the concentrations of PCBs are very low in the water, in the order of nanograms per litre of water. Congeners CB 52 and CB 118 were not detected in any of sampling sites. The most represented congener was CB 101. This congener is mostly detected in the air; it is supposable, that it is going about secondary contamination through the atmospheric transport.

Table 3: Concentrations of PCBs in aquatic plants samples [µg.kg⁻¹ of dry basis].

Sampling site	CB 28	CB 52	CB 101	CB 118	CB 153	CB 138	CB 180	Σ PCBs
1	12.49	4.117	4.893	0.275	0.779	0.492	1.049	24.10
2	12.94	3.064	5.260	0.034	1.136	0.633	2.082	25.15
3	17.47	6.579	0.887	0.499	4.540	2.391	3.169	35.53
4	23.12	1.967	1.613	1.623	8.458	6.103	9.017	51.90
5	22.13	1.775	1.378	1.340	6.860	4.930	7.739	46.15
6	< LOD	< LOD	1.562	1.869	9.507	6.635	10.52	30.09

LOD - Limit of Detection, < LOD - Not Detected, CB - Chlorinated Biphenyl, Σ PCBs - Sum of PCBs

Table 3 shows that the concentrations of PCBs in aquatic plants samples are higher than in water samples, in the order of micrograms per kilogram of dry matter. Only congeners CB 28 and CB 52 were not detected in the sampling site no. 6. The most represented congener was CB 28, which also suggests secondary contamination from the atmosphere.

All PBDE congeners were under the limit of detection (LOD) in all samples.

Conclusion

The results of analysis indicate relatively low concentrations of monitored analytes. The highest values of PCBs were measured in aquatic plants samples. Values of PCBs in water samples were very low. Polybrominated diphenyl ether levels were all under the limit of the detection. Due to of very low concentration of both investigated analytes, the contamination of the selected water source is not considered for significant.

Acknowledgements

This work was supported by the research project no. FR222191.

References available upon a request.

Contact address: Alice Jírová, Mgr., Department of Veterinary Ecology and Environment Protection, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, alice.jirova@seznam.cz

Posouzení kontaminace odpadních vod vybranými musk sloučeninami Assessment of wastewater contamination by selected musk compounds

Komárková Petra, Valsová Šárka, Vávrová Milada

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

Summary

Musk compounds are artificially synthesised organic compounds which are used as fragrant substances in various personal care products, perfumes, cosmetics, soaps, detergents, cleansing articles, air fresheners etc. The aim of this study was determination of selected linear musk compounds (dihydromyrcenol, cyclohexylethylacetat, arofir, cyclacet/jasmocyclen) in real samples of waste water in the influent and effluent from the wastewater treatment plant VFU Brno. Analytes were extracted by solid phase microextraction (SPME) from sample. Method of gas chromatography with mass spectrometry was used for own analysis. The results were used for evaluation of efficiency of removing linear musk compounds from waste water.

Keywords: musk compounds; waste water; SPME; GC/MS

Úvod

Syntetické analogy pižma (tzv. musk sloučeniny) jsou uměle vyráběné látky, které jsou produkovány ve velkých množstvích a jsou ve značné míře používány v parfémovaných výrobcích zahrnujících detergenty, čisticí prostředky, osvěžovače vzduchu, parfémy, kosmetiku a produkty osobní péče. Jsou vyráběny jako náhrada za vzácná a drahá přírodní pižma získávaná z kabarů pižmových (Shek et al., 2008).

Musk sloučeniny jsou lipofilní, perzistentní chemické látky se schopností bioakumulace ve vodním prostředí (Hutter et al., 2009). Na základě struktury a fyzikálně-chemických vlastností se rozdělují do čtyř skupin: nitro, polycyklické, makrocyclické a alicyklické musk sloučeniny (Arbulu et al., 2011).

Vzhledem ke svému rozsáhlému používání se syntetické musk sloučeniny vyskytují v životním prostředí ubikvitárně (Shek et al., 2008). Většina z nich po použití směřuje do kanalizace, a proto jsou přítomny zejména v odpadních vodách, které představují konstantní expoziční zdroj těchto látek a jsou rovněž považovány za primární zdroj informací o možném znečištění vodních ekosystémů (Difrancesco et al., 2004; Zhang et al., 2008). Významný je jejich výskyt v povrchových vodách, kalech z čistíren odpadních vod, suspendovaných sedimentech a dnových sedimentech (Zouhar et al., 2012). Prokázány byly také v biotě žijící v kontaminovaném vodním prostředí (Shek et al., 2008).

Materiál a metody

Tato studie byla zaměřena na sledování vybraných zástupců lineárních musk sloučenin (dihydromyrcenol, cyclohexylethylacetat, arofir, cyclacet/jasmocyclen) v odpadní vodě. Vzorky odpadní vody byly odebírány po dobu deseti dnů na čistírně odpadních vod VFU Brno, jednalo se vždy o přítok a srovnatelný odtok.

Izolace sledovaných analytů byla provedena metodou mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), která musela být nejprve optimalizována. Parametry optimalizované metody SPME jsou uvedeny v tabulce 1. K následné identifikaci a kvantifikaci analytů byla

použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS), která pracovala v režimu SIM. Tento režim má vyšší citlivost než režim SCAN, což je výhodné zejména při stanovování analytů, které se ve vzorku nacházejí ve stopových množstvích. Podmínky GC/MS analýzy s optimalizovanou teplotní rampou jsou uvedeny v tabulce 2.

Identifikace analytů byla prováděna podle retenčních časů. Při vyhodnocování získaného chromatogramu byla extrahována hodnota m/z charakterizující kvantifikační iont daného analytu a pík byl integrován, čímž byla získána jeho plocha. Kvantifikace analytů byla provedena metodou standardního přídávku, která je založena na porovnání analytického signálu vzorku se signálem, který byl získán po přidání známého přídávku standardu ke vzorku. Pro jednotlivé musk sloučeniny byly dále vytvořeny kalibrační přímky a vypočteny hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.

Tabulka 1: Podmínky SPME.

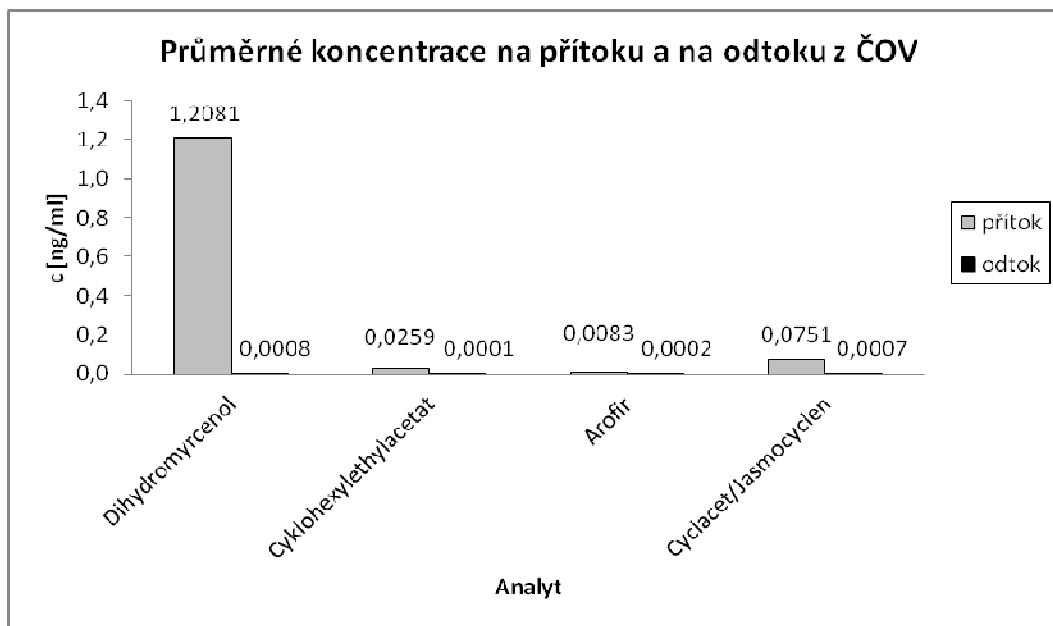
Typ vlákna	65 μ m PDMS/DVB
Provedení	head-space
Vliv vysolování	přídavek 3 g NaCl
Teplota	50 °C
Doba ustálení rovnováhy	5 min
Doba expozice vlákna	30 min
Rychlost míchání	900 ot./min
Objem vialky	22 ml
Objem vzorku	14 ml

Tabulka 2: Podmínky GC/MS analýzy.

Kolona	DB-5MS (20 m x 180 μ m x 0,18 μ m)
Průtok nosného plynu kolonou	0,8 ml/min
Lineární rychlost nosného plynu	40 cm/sec
Teplota transferline	285 °C
Teplota iontového zdroje	230 °C
Teplota kvadrupolu	150 °C
Teplotní program	50 °C (3 min) 15 °C/min do 80 °C 5 °C/min do 120 °C (5 min) 20 °C do 280 °C (1 min)

Výsledky a diskuse

Vyhodnocením analýz reálných vzorků bylo zjištěno, že během desetidenního vzorkování byly detekovány a kvantifikovány všechny lineární musk sloučeniny na přítoku na ČOV, zatímco na odtoku z ČOV už nebyly prokázány všechny analyty. Nejvyšších koncentrací na přítoku dosahoval po celou dobu vzorkování dihydromyrcenol, maximální hodnota byla 3,008 ng/ml. U ostatních analytů byly hodnoty výrazně nižší, pohybovaly se v rozmezí desetin až tisícín ng/ml. Na odtoku byl ze všech vzorků odpadní vody kvantifikován pouze cyclacet/jasmocyclen, ostatní analyty nebyly kvantifikovány. Cyklohexylethylacetat nebyl detekován v žádném vzorku na odtoku. Průměrné koncentrace jednotlivých analytů na přítoku a na odtoku jsou uvedeny v grafu 1.



Graf 1: Průměrné koncentrace sledovaných analytů na přítoku a na odtoku z ČOV.

Na podkladě získaných dat byla vyhodnocena účinnost čistícího procesu. U všech analytů, s výjimkou cyclacet/jasmocyclenu, bylo dosahováno účinností odstranění nad 99,00 %. U cyclacet/jasmocyclenu se účinnost odstranění pohybovala v rozmezí 49,20 – 99,50 %. Opakovatelnost použité analytické metody byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka. Její hodnoty, stejně jako hodnoty LOD a LOQ, jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Charakteristiky metody SPME ve spojení s GC/MS.

Analyt	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	RSD [%]
Dihydromyrcenol	0,0005	0,0016	5,64
Cyklohexylethylacetat	0,0003	0,0009	5,70
Arofir	0,0003	0,0010	7,26
Cyclacet/Jasmocyclen	0,0004	0,0013	6,28

Závěr

Musk sloučeniny reprezentují relativně novou skupinu environmentálních kontaminantů. Hlavními zdroji jejich průniku do vodního ekosystému jsou městské odpadní vody. Je proto nutné jejich výskyt v těchto vodách neustále monitorovat, což bylo i cílem této práce. U sledovaných zástupců lineárních musk sloučenin byla prokázána vysoká účinnost odstranění, čímž se potvrdila předpokládaná velká míra biodegradability této skupiny musk sloučenin.

Literatura

K dispozici u autora.

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

Aspergilomykóza vo výkrme brojlerových kurčiat a spôsob jej eliminácie

Aspergylomycosis in the farm buildings for broiler chickens fattening and the metod of its elimination

Kachnič Ján, Ondrašovič Miloslav, Koščo Ján, Ondrašovičová Oľga, Hromada Rudolf

Katedra životného prostredia veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF Košice

Summary

The aim of our study was to eliminate the aspergilomycosis pathogen in farm buildings where the broiler chicken are fatten and to monitor the effectiveness of disinfection. We reviewed the overall sanitation and route of spread of pathogens in operation. Sanitation has been in terms of quantitative aspect exercised regularly. Disinfection were focused on devitalization aspergillosis, which was diagnosed in the previous period. In the farm buildings our aspergilomycosis findings were positive. We used to disinfect Pedox-PAA/50 producer whose producer is Polychem s.r.o. This is a product containing 30% peracetic acid and 20% hydrogen peroxide. Microbiological monitoring of the effectiveness of disinfection was carried out by taking 40 swabs of object technology. We found a decrease of aspergillosis, which was also recorded in the airborne microorganisms by taking 20 samples.

Keywords: *aspegillosis; disinfection; pathogen; poultry*

Úvod

Základnou požiadavkou chovu všetkých druhov zvierat je poriadok a čistota. Chovateľ, resp. prevádzkovateľ musí vychádzať zo zásady, že prevencia je súčasťou ochrany zdravia zvierat a ľudí. Pravidelným čistením kliebok, výbehov a iných chovných priestorov ich dezinfekciou chránime zvieratá proti nákazlivým ochoreniam. Orgány ochrany životného prostredia a orgány veterinárnej starostlivosti riešia problémy aj v prípadoch nedostatočnej starostlivosti hygieny chovu, z hľadiska šírenia nákaz a asanácie (Novák a kol., 2002).

Asanačné opatrenia patria medzi základné opatrenia, ktoré musia byť uplatňované v chove. Základnými zložkami asanácie sú dezinfekcia (ničenie škodlivých mikroorganizmov), dezinfekcia a deratizácia (ničenie prenášačov resp. rezervoárov infekčného agens). Do asanačných opatrení patrí i neškodné odstraňovanie zvieracích exkrementov, zneškodňovanie tiel uhynutých zvierat, ale aj dodržiavanie hygieny prostredia, výbehov a vytváranie optimálnych podmienok prostredia z hľadiska požiadaviek zvierat. Preventívna asanácia je zameraná na ničenie potenciálnych pôvodcov nákaz, potlačenie nevhodnej agresívnej mikroflóry ustajňovacích priestorov a na zlepšenie hygieny vôbec. Ohnisková asanácia je zameraná na likvidáciu nákazy v chove (Ondrašovič a kol., 1999).

Dezinfekcia je základné opatrenie pri odstraňovaní choroboplodných a škodlivých mikroorganizmov vo vonkajšom prostredí. Preventívna (ochranná) dezinfekcia sa vykonáva za účelom znižovania kontaminácie prostredia. Má byť neoddeliteľnou súčasťou všetkých technologických postupov v chove zvierat. Ohnisková resp. represívna dezinfekcia je zameraná na likvidáciu určitého pôvodcu nákazy v chove. Účinnosť dezinfekcie ovplyvňuje odolnosť mikroorganizmov, výber a spôsob použitia

dezinfekčného prostriedku a vonkajšie prostredie v ktorom dezinfekčný proces prebieha. Pri hodnotení dezinfekčných prác sa najčastejšie stretávame s nedostatkami spojenými s prípravou prostredia (mechanická očista) na dezinfekciu a množstvom aplikovaného roztoku. Pri mechanickej očiste objektu pred preventívnou dezinfekciou musia byť odstránené exkrementy, prípadne ak je to možné aj technologické linky a iné súčasti objektu. Pre očistu sa využívajú vysokotlakové zariadenia, s možnosťou zahrievania vody a prídavkom saponátov.

Aspergilózu zaraďujeme medzi najčastejšie sa vyskytujúce systémové mykózy. Na jej vzniku sa podieľajú: *Aspergillus (A.) fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. amstelodami*. Ochorenie môže mať akútny alebo chronický priebeh. Akútna forma dominuje u novovyliahnutej a mladej hydiny exponovanej veľkou dávkou spór z kontaminovaných škrupín vajec a ventilátorov liahne. Typickými príznakmi ochorenia sú depresia, inapetencia, anorexia, dyspnoické dýchanie spojené so šelestami, rýchly pulz, zvýšená teplota, zježené perie, lokomočné poruchy, kŕče, ochrnutie a smrť. Chronický priebeh ochorenia je charakteristický v chovoch so zlými zoohygienickými pomermi (zvýšená koncentrácia amoniaku, kontaminovaná podstielka). Trvá niekoľko mesiacov za príznakov chudnutia, hnačiek, rýchlej únavy a dýchacích ťažkostí. Prídavnými symptómami sú často anémia, exsudatívna rinitída, spomalenie rastu, otvorený zobák, pípanie, tmavý hrebenok a cyanotické laloky v dôsledku kardiálnej insuficiencie. Napriek tomu, že predilekčným miestom patogénu je respiračný aparát (pľúca a vzdušné vaky), v literatúre sú opísané aj prípady okulárnej a nervovej formy ochorenia. Aspergilóza respiračného systému sa zvyčajne definuje ako nekrogranulomatózna pneumónia a aerosakulitída. U postihnutých vtákov sú pozorované granulomatózne inflamačné lézie v pľúcach a vzdušných vakoch. Žlté kazeózne noduly alebo disky sú nachádzané nielen v pľúcach a príľahlých vzdušných vakoch, ale aj v priedušnici a bronchoch, kde následne vyvolávajú obštrukciu prívodu vzduchu do pľúc. U starších vtákov, pri chronickom priebehu ochorenia, bolí zistené modro-zelené až šedé „chumáče“ plesní. Pre mykotickú tracheitídu sú charakteristické nálezy difteroidných ložiskových nálepor na sliznici priedušnice, spojené s nekrotickým zápalom a s následnou deštrukciou sliznice. Nekrotizovaná mukóza je infiltrovaná makrofágmi. Evidentná je fibroplázia príľahlej tracheálnej steny. V mnohých prípadoch je lumen trachey úplne uzavretý a vyplnený fungálnym mycéliom a pyogranulomatóznym exsudátom. Intraokulárna invázia *Aspergillus fumigatus* sa prezentuje následnou keratitídou. V konjunktiválnom vaku, v očnom kútiku, alebo pod mihalnicou sa vyskytujú kazeózne noduly (Leeson a kol., 1995).

Materiál a metodika

Na základe požiadania bola vykonaná dezinfekcia na farme v objektoch výkrmu brojlerových kurčiat. Zameraná bola na devitalizáciu aspergilózy, ktorá bola diagnostikovaná v predchádzajúcom období. Na dezinfekciu bol použitý Padox-PAA/50 výrobcom ktorého je firma Polychem s.r.o. Jedná sa o prípravok s obsahom 30% kyseliny peroctovej a 20% peroxidu vodíka. Uvedený prípravok sa vyznačuje devitalizačným účinkom aj na plesne.

Celková plocha ustajňovacieho objektu bola 2 172 m². Použitá koncentrácia Padoxu PAA/50 bola 3% na účinnú látku (kyselina peroctová) a dávka 0,5 l/m². Prípravok bol aplikovaný pomocou vysokotlakového zariadenia Kärcher. Pred aplikáciou bola vykonaná dôkladná mechanická očista. Po dezinfekcii a dvojhodinovej

expozícii bola vykonaná mikrobiologická kontrola účinnosti dezinfekcie podľa požiadaviek pri výkone preventívnej dezinfekcie.

Výsledky

Mikrobiologická kontrola účinnosti dezinfekcie

Rozsah počtu mikroorganizmov zo sterov z technológií objektu – 40 odberov

Použitá pôda	Pred dezinfekciou	Po dezinfekcii	Počet negatívnych nálezov
MPA	55 - NP	0 - 290	15
EA	80 -NP	0 - 45	18
SA	NP	0 - 40	18

Rozsah počtu vzdušných mikroorganizmov z objektu – 20 odberov

Použitá pôda	Pred dezinfekciou	Po dezinfekcii	Počet negatívnych nálezov
MPA	NP	0 - 11	13
EA	0 - 10	0 - 1	19
SA	NP	0 - 28	18

(MPA – Mäsopeptonový agar, EA – Endo agar, SA – Sabouradov agar, NP – Nepočítateľné množstvo)

Záver

Mykotickým ochoreniam vtákov sa napriek ich dôležitosti v klinickej praxi venuje málo pozornosti. Pri odchove hydiny je viacero faktorov (zloženie substrátov, relatívna vlhkosť prostredia, koncentrácia plynov a i.), ktoré podmieňujú rast a rozmnožovanie plesní podieľajúcich sa svojim parazitickým spôsobom života na vzniku mykóz. K poškodzovaniu organizmu vtákov môže dôjsť tiež v dôsledku pôsobenia sekundárnych metabolitov plesní – mykotoxínov, ktoré sú príčinou akútnych alebo chronických mykotoxikóz. Mykotické ochorenie je podmienené vlastnosťami mikroskopickej huby (patogenita, virulencia, adherencia, invazivita, toxicita) ako aj zdravotným stavom jedinca (aktuálny imunologický stav, poruchy výživy, bakteriálne ochorenie). Primárnymi zdrojmi patogénov sú krmivo, podstielka ako aj kontaminovaný biologický materiál. Prevencia pred mykotickými ochoreniami je z tohto pohľadu stále aktuálnou. Na základe týchto skutočností je treba zdôrazniť potrebu sanitácie v chovoch hydiny, pravidelne vykonávať dezinfekciu s použitím vhodného dezinfekčného prostriedku a následne vykonať mikrobiologickú kontrolu účinnosti dezinfekcie.

Literatúra

Leeson, S., Diaz, G., Summers, J. D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Canada 1995, s. 227-241

Novák, P., Odehnal, J., Kubíček, K., Treml, F.: Veterinárni asanace, nedílná součást biosecurity chovu hospodárskych zvierat. In: Zborník z konferencie DDD, Přivorovy dny, Poděbrady, 2002, s. 271-281

Ondrašovič M. a kol.: Využitie persterilu na dezinfekciu v potravinárskom priemysle, Zborník prednášok a posterov, Hygiene alimenterum XX, 1999, s. 181

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

Vnútrodruhová variabilita kliešť'a *Hyalomma aegyptium*

Intraspecific variability of tick *Hyalomma aegyptium*

Kautman Matej, Dvořáková Nela, Široký Pavel

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Hyalomma aegyptium ticks are tree-host parasites feeding specifically on tortoises. Together 127 ticks were examined. Research is focused on whole distribution area of *H. aegyptium*. Material has been collected from 85 localities in Afghanistan, Algeria, Azerbaijan, Bulgaria, Georgia, Greece, Iran, Iraq, Israel, Jordan, Morocco, Pakistan, Romania, Syria and Tunisia. First step was to determine primers suitable for phylogeography analysis. Together 9 different molecular markers were examined, five of them have been successfully amplified (COI, 12S rDNA, 16S rDNA, 18S rDNA and ITS2). COI gene was analysed by Bayesian method and maximum likelihood method, which formed geographically separated clusters. According to this single-gene approach-population clustering do not correspond clearly to geographic scale. Hence there is a hypothesis that gene flow among *H. aegyptium* populations is more affected by higher dispersion ability of less host-specific larvae and nymphs, feeding on relatively wide scale of hosts including other reptiles, birds and mammals.

Keywords: *Hyalomma aegyptium*; phylogeography; COI; 18S rDNA; 12S rDNA; 16S rDNA; ITS 2; intraspecific variability

Úvod

Do rodu *Hyalomma* Koch, 1844, patrí dnes zhruba 27 známych druhov kliešťov z čeľade Ixodidae, rozšírených v južnej Európe, Ázii a Afrike. Všeobecne ide o kliešte so zvýšenou toleranciou k arídnemu prostrediu, takže často obývajú stepné až polopúštne biotopy. Väčšina druhov je trojhostiteľská a v dospelom štádiu parazituje na cicavcoch, napríklad párnokopytníkoch, nepárnokopytníkoch a šelmách, ktoré na rozdiel od iných kliešťov, aktívne vyhľadávajú. Niektoré druhy sú dvojhostiteľské, alebo jednohostiteľské. V krajinách ich výskytu sú tieto kliešte významnými parazitmi dobytky a iných poľnohospodárskych a domácich zvierat. Rod *Hyalomma* je vektorom mnohých významných patogénov, medzi ktoré patrí aj Krymsko-konzská hemoragická horúčka, prenosná na človeka. Špeciálnym centrom druhov rodu *Hyalomma* je pravdepodobne Stredná Ázia, Blízky a Stredný Východ.

Kliešť *Hyalomma aegyptium* je rozšírený od západného pobrežia Maroka, naprieč severnou Afrikou, na Balkáne, Blízkom Východe a hranica jeho rozšírenia zasahuje až do Strednej Ázie. Je to typický trojhostiteľský druh, pričom jeho larválne a nymfálne štádia parazitujú na relatívne širokej škále plazov, vtákov a drobných cicavcov. Dospelé kliešte sú na rozdiel od lariev a nýmfov vysoko hostiteľsky špecializované a na rozdiel od ostatných druhov rodu *Hyalomma* parazitujú takmer výlučne na korytnačkách rodu *Testudo*. Výnimku tvoria nálezy dospelých jedincov *H. aegyptium* na ježoch a vzácne nálezy na iných cicavcoch.

Materiál a metodika

Spolu sme doteraz analyzovali 127 kliešťov z korytnačiek druhu *Testudo graeca* z 85 lokalít z Bulharska, Rumunska, Grécka, Turecka, Gruzínska, Azerbajdžanu, Sýrie,

Iránu, Iraku, Afganistanu, Pakistanu, Maroka, Alžírsku, Tunisku, Jordánska a Izraelu. Kliešte určené na analýzu boli uchovávané v 96% etanole.

DNA bola izolovaná komerčným kitom NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany). Koncentrácia DNA bola meraná prístrojom NanoDrop ASP-3700 (ACTGene, USA), ktorý určuje koncentráciu na základe spektrofotometrie. Extrahovaná DNA bola skladovaná pri teplote -20°C . Primárnou úlohou bolo otestovanie primerov vhodných na fylogenetickú analýzu. Celkom sme testovali 9 rôznych markerov. Na analýzu sekvencií DNA bolo po úspešnej amplifikácii vybraných 5 odlišných génov (Tab. 1). Z deviatich markerov sa nám nepodarilo amplifikovať štyri (COI-b, EF1- α , TROSPA a Defensin).

Tabuľka 1: Amplifikované markery.

marker	počet b.p.	primery	autor
COI	863	C1-N-2312, TY-J-1449	Rees et al. 2003
12S rDNA		SR-J-1499, SR-N-14594	Mtambo et al. 2007
16S rDNA	444	16S-F, 16S-R	Nourredine et al. 2011
18s rDNA	1814	A, B, C, D, E, F	Mangold et al. 1998
ITS2	300	RIB-8, RIB-11	Rees et al. 2003

Tabuľka 2: PCR programy amplifikácie jednotlivých génov.

gén	objem	úvodná denaturácia	denaturácia	hybridizácia	extenzia	extenzia 2
COI	25 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ (4 min)	40x 94 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)	40x 45 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	40x 72 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	72 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)
12S rDNA	50 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)	35x 94 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	35x 50 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	35x 72 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)	72 $^{\circ}\text{C}$ (15 min)
16S rDNA	30 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)	35x 95 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)	35x 59,4 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)	35x 72 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	72 $^{\circ}\text{C}$ (15 min)
18S rDNA	100 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ (4 min)	40x 94 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)	40x 45 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	40x 72 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	72 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)
ITS 2	25 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)	35x 92 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)	35x 55 $^{\circ}\text{C}$ (60 s)	35x 72 $^{\circ}\text{C}$ (45 s)	72 $^{\circ}\text{C}$ (7 min)

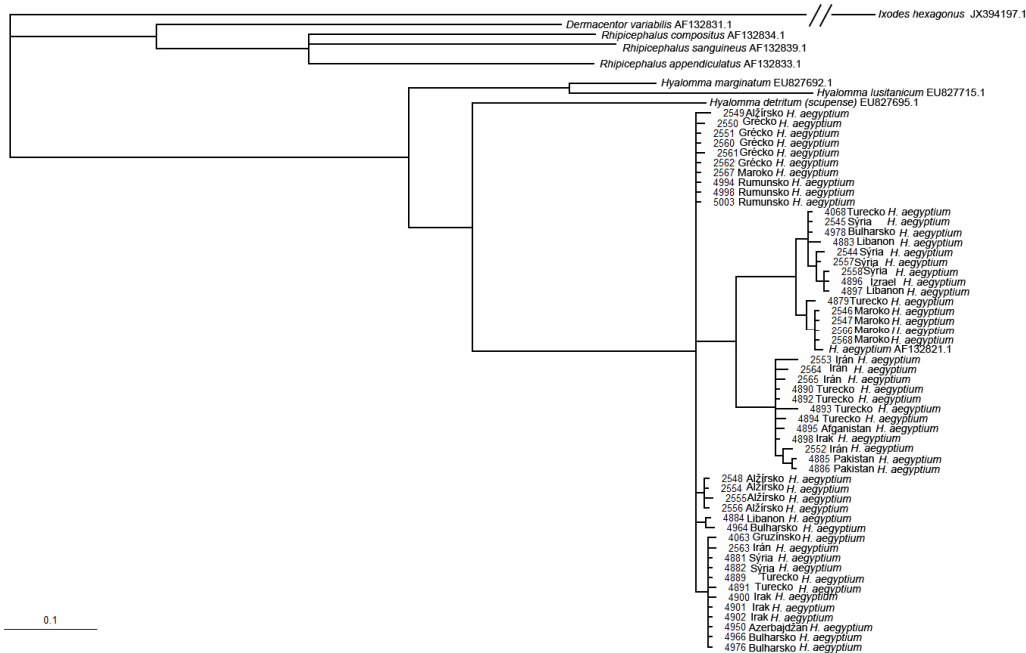
Vizualizácia pruhov prebiehala na 1,5% agarózovom gély, zafarbeným ethydiom bromidom, presvieteným UV svetlom. Vzorky vybrané na sekvenčnú analýzu boli prečistené komerčným kitom Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) a bola zmeraná koncentrácia DNA pomocou prístroja NanoDrop.

Sekvenovanie DNA bolo zaistené firmou Macrogen (Macrogen, the Netherland). Sekvencie boli upravené softvérom DNASTAR (DNASTAR, Inc.). Fylogenetická analýza sekvencií vybraných 54 jedincov prebiehala v programe MrBayes 3.1.2. (Ronquist & Huelsenbeck 2003) v nastavenom GTR modely 10^7 generácií. Ďalšia analýza odlišnou metódou maximum likelihood (ML) prebiehala v programe PHYML 2.4.4. (Guindon & Gascuel 2003) s počtom bootstrapových replikátov 1000. Fylogenetické stromy z oboch metód boli následne vizualizované programom TreeView 1.6.6. (Page, 1996b).

Výsledky a diskusia

Z deviatich testovaných markerov sa nám podarilo úspešne amplifikovať 5 génov (COI, 12S, 16S, 18S a ITS2). Na výpočet fylogeografického stromu bol zatiaľ testovaný marker COI, ktorý vykazuje dostatočnú vnútrodruhovou variabilitu. Na základe rozdielov v COI géne sa strom vetví na niekoľko geograficky oddelených populácií.

Keďže tieto oddelené populácie nekorešponujú s reálnou blízkosťou populácií, je pravdepodobné, že genetickú variabilitu kliešťov spôsobuje napríklad vyššia mobilita nedospelých štádií. Toto vysvetlenie sa ponúka aj v prípade genetickej príbuznosti niektorých jedincov, vykazujúcich príbuznosť s geograficky vzdialenejšími populáciami.



Obrázok 1: Fylogenetický strom na základe analýzy génu cytochróm oxidáza I (MrBayes).

Záver

Na základe vetvenia fylogenetického stromu môžeme konštatovať, že mitochondriálny gén cytochróm oxidáza I je dostatočne variabilný marker, tým pádom je vhodný aj pre ďalšie analýzy vnútroruhovej variability. Diverzita génu viditeľne oddelila niektoré geograficky separované populácie, niektoré jedince však nesú genetické znaky jedincov z iných populácií. Príbuznosť niektorých geograficky vzdialenejších populácií nemožno jednoznačne odvodiť od postupnej geografickej disperzie druhu, čo naznačuje inú formu genetického toku v rámci druhu. Prípustným vysvetlením je vyššia potenciálna mobilita larválnych a nymfálnych štádií druhu *H. aegyptium*, ktorých hosťiteľmi sú často iné druhy plazov, drobné cicavce a vtáky. Na získanie väčších výsledkov budú využité aj ďalšie pozitívne otestované markery. Podrobné analýzy ďalších štyroch testovaných génov a ich vzájomné porovnanie podrobnejšie vysvetlia princípy genetickej variability v rámci tohto druhu.

PodĎakovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom GAČR P506/11/1738.

Literatúra

Zoznam použitej literatúry a citácií je dostupný u uvedených autorov.

Kontaktná adresa: Kautman Matej, Mgr., Ústav biologie a chorob volne žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, kautman.matej@gmail.com

SEKCE 4

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

Studium glykanových struktur pomocí biočipů a biosenzorů využívající lektinové rozpoznávání

Study glycans structures for using biochips and biosensors utilizing lectin recognition

Šedivá Alena, Gemeiner Peter, Katrlík Jaroslav

Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Bratislava

Summary

Biosensors and biochips are used in many bioanalytical fields. In present they are beginning to replace conventional analytical methods such as gas or liquid chromatography. There are many sectors (for example: human and veterinary medicine, agriculture, pharmaceuticals, food and fermentation industry, the military and agriculture) where are used nowadays. Lectin biosensors and biochips are designed to detect glycans structures that are bound to different molecules and substrates such as proteins, lipids, cell walls as well as in biological material, including stem cells, tissues, viruses, microorganisms, serums, etc.. Changes in glycosylation are associated with physiological and pathophysiological changes that are associated with the development of diseases such as cancer, multiple sclerosis, tuberculosis, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, AIDS and many others. The aim of this work is the development and testing of advanced bioanalytical techniques using lectins biosensors and biochips.

Keywords: lectin; biochip; biosensor; glycan structures

Úvod

Od roku 2011 se na chemickém ústavu SAV zabývám prací s biosenzory založených na lektinovém rozpoznávání. K vlastní práci využívám povrchovou plasmonovou rezonanci (SPR – surface plasmon resonance), lektinovou a glykanovou microarray. V druhé polovině roku 2011 probíhalo měření pomocí povrchové plasmonové rezonance. Sledovali jsme interakci mezi lektinem (conA – konkanavalin A) a biotinylovaného mannanu při různých koncentracích. Tato měření probíhala i v první polovině roku 2012. V druhé polovině jsme se zaměřili na sledování interakcí protein-sacharid pomocí microarray. Koncem roku 2012 a začátkem roku 2013 optimalizujeme tuto metodu z důvodu následného měření vzorku sér a tkání pacientů s kolorektálním karcinomem. Při našich měření sledujeme změnu v glykosylaci. Změny v glykosylaci jsou doprovázena fyziologickými i patofyziologickými jevy.

Materiál a metodika

Povrchová plasmonová rezonance

Povrchová plasmonová rezonance je děj, při kterém dochází ke změně rezonančního úhlu odrazu monochromatického záření od povrchu (zlato, stříbro aj.) respektive ke změně rezonanční frekvence při fixním úhlu odrazu. Tento jev je důsledkem vzniku rezonance mezi zářením a povrchovými elektrony kovu.^{4,5}

Průběh měření je rozděleno do několika kroků. Prvním krokem je imobilizace ligandu na povrch snímače čipu. Další krok je navázání analytu na ligand po němž následuje fáze ustálení a disociace.¹

Lektinové a glykanové microarray

Lektinová a glykanová microarray se používá na charakterizaci sacharido-proteinových interakcí.² Jde o vysoce citlivou metodu, umožňující detekci glykoproteinu o pikomolárních koncentracích a z toho důvodu je vhodná pro glykoproteinové testování. Významnou výhodou microarray je poměrně rychlé zobrazení obrovského množství vzorků.³

Závěr

Hlavním cílem mé práce je navrhnout a připravit lektionový biočip a biosenzor pro sledování interakce různých glykanových struktur s lektinami nebo jinými proteinovými rozpoznávacími sacharidovými jednotkami. K tomuto účelu budou přednostně použity metody povrchové plasmonové rezonance a microarray, které budou doplněny o další techniky jako ELLA, elektrochemie nebo western blot.

Pomocí navrhnutých a připravených biočipů a biosenzorů budeme sledovat kinetiku interakcí lektinů s glykoproteiny, změny glykosylace proteinů v souvislosti s některými onemocněními.

Literatura

1. BIACORE AB BIACORE Technology Handbook, 1998
2. FLANAGAN M. T., PANTELL R. H.: Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electron Lett.* 20: 968-970, 1984
3. GLAVEN R.H., ANDERSON G.P., ZABETAKIS D., LIU J.L., LONG N.C., GOLDMAN E.R.: Linking single domain antibodies that recognize different epitopes on the same target. *Biosensors* 2, 43, 2012
4. KRETSCHMANN E., RAETHER H.: *Zeitschrift für Natur forschung A23*, 2135, 1968
5. SIMON H.J., MICHELL D.E., WATSON J.G.: *American Journal of Physics Letters* 398, 224, 2004

Kontaktní adresa: Alena Šedivá, Mgr., Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Bratislava, Dúbravská cesta 9, a.sediva@savba.sk

SEKCE 5

Veřejné veterinářství a ochrana zvířat

Vliv stresu na imunitní systém brojlerových kuřat Impact of stress on immune system of broilers

Želinská Gabriela, Bedáňová Iveta, Voslářová Eva

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Commercial broilers are exposed to many stress causing factors. The aim of this study was to summarize the negative impact of various stress factors during fattening and slaughtering on the immune system of commercial broilers. The possibility of using neopterin and biopterin as stress markers is indicated. Also the possibility of using probiotics during rearing to decrease stress is discussed.

Keywords: broilers; stress; pterins; probiotics

Úvod

Komerčně vykrmovaná brojlerová kuřata jsou vystavena řadě potenciálních stresorů působících během výkrmu i při procesech souvisejících s jejich přepravou na jatky a porážkou. Působení těchto vlivů může vyústit v úhyn, zranění, poškození zdraví či změny vnitřního prostředí v důsledku stresového zatížení (např. Bedáňová et al., 2006; Večerek et al., 2006). Z ekonomického pohledu je působení stresu sledováno zejména ve smyslu jeho dopadu na kvalitu masa. Teplotní stres během odchovu je jedním z významných stresorů antemortem, který způsobuje rychlý pokles pH a světlou barvu prsní svaloviny (McKee and Sams, 1997). Sandercock et al. (2001) dokumentovali, že akutní tepelný stres vyvolaný umístěním brojlerů do přepravních kontejnerů vede k alteraci acidobazické rovnováhy v krvi a postmortálně ovlivňuje hladinu svalového glykogenu a pH prsní svaloviny. Kannan et al. (1997) zjistili, že vyšší míra stresu před porážkou může ovlivnit barvu stehenní svaloviny. Méně pozornosti se dosud věnovalo dopadu stresu na imunitní systém.

Vliv stresu na imunitní systém brojlerových kuřat

Pokud stres trvá delší dobu, nebo se stane chronickým, ovlivní nejenom metabolismus a energetickou rovnováhu, ale i imunitní a reprodukční systém (Elrom, 2000). Je prokázána těsná provázanost neuroendokrinní reakce s imunitním systémem - imunitní buňky mají na svém povrchu receptory pro různé neuroendokrinní peptidy, hormony a neurotransmitery (Dostálová, 2012). V průběhu stresové odpovědi organismu jsou do krevního oběhu uvolňovány glukokortikoidy, katecholaminy a další neuroendokrinní působky. Po dlouhou dobu byl vliv stresu na průběh infekčních onemocnění připisován výhradně přímému účinku stresových hormonů na imunitní systém a funkci střevní bariéry. Je známo, že chronický stres má vliv na posun od buněčné imunity zprostředkované Th-1 typem buněk k imunitě humorální zprostředkované Th-2 typem buněk, což může ovlivnit průběh infekce a/nebo vnímavost k mikroorganismům (Verbrugghe et al., 2012).

Pteriny jako markery aktivace imunitního systému brojlerových kuřat

Nedávné studie ukazují, že akutní stres může ovlivňovat produkci neopterinu a biopterinu (Breinekova et al., 2007). Podle Smutné et al. (2010) lze stanovení biopterinu a neopterinu využít jako markery stresového zatížení organismu, kdy projevy aktivace

imunitního systému jsou v korelaci s koncentrací kortizolu, který manifestuje aktivaci osy stresu (HPA). Aktivace buněčné imunity byla prokázána při transportu prasat na jatky, aplikaci Fe³⁺ - dextranu, kastraci selat (Breineková, 2006; Maršálek et al., 2011; Smutná et al., 2010). Také podle Maršálka et al. (2011) je neopterin vhodný biomarker pro intenzitu imunitní odpovědi zprostředkovanou Th-1 typem buněk. Neopterin a biopterin patří do skupiny nekonjugovaných pterinů odvozených z guanosin trifosfátu pomocí guanosin trifosfát cyklohydrolázy I (Brown, 1971). Neopterin je syntetizován převážně monocyty/makrofágy po předchozí stimulaci cytokiny, především interferonem- γ , který je uvolňován T-lymfocyty a NK buňkami (Hoffmann et al., 2003). Biopterin je produkován neenzymatickou oxidací tetrahydrobiopterinu. Syntéza probíhá v T-buňkách, B-buňkách, endotelu, hladkých svalových buňkách, fibroblastech (Werner-Felmayer et al., 2002), popřípadě v játrech a ledvinách (Fujioka et al., 2008).

Využití probiotik k podpoře imunitního systému u brojlerových kuřat v případě stresu

Přidávání probiotik do krmiva u brojlerů nabývá na významu i ve smyslu snížení působení stresu (Kabir et al., 2004). Probiotika se mohou uplatnit jak v podpoře růstu v důsledku zlepšeného využití krmiva, tak v prevenci infekčních a neinfekčních poruch zažívání. Jejich preventivní účinky se projeví zejména ve stavech stresu (Krejčí et al., 2013). V poslední době je věnována značná pozornost také studiu protizánětlivých účinků některých probiotik. U lidí byly prokázány léčebné a preventivní účinky při idiopatických střevních zánětech snížením produkce protizánětlivých cytokinů (Geier et al., 2010). Podávání probiotik v produkci brojlerových kuřat považuje mnoho autorů za prospěšné z hlediska zlepšení konverze krmiva a podpory imunitního systému.

Závěr

Cílem probíhajícího výzkumu je sledování dopadu působení stresu na imunitní systém brojlerových kuřat na základě stanovení změn hladin pterinů v krevní plazmě. Je ověřována také využitelnost probiotik na eliminaci negativního dopadu působení stresu v podmínkách komerčního výkrmu brojlerových kuřat.

Poděkování

Tato práce je součástí projektu IGA VFU 28/2013/FVHE Sledování dopadu působení stresu na imunitní systém brojlerových kuřat na základě stanovení pterinů v krevní plazmě.

Literatura

Literatura dostupná u autorů.

Kontaktní adresa: Gabriela Želinská, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H11007@vfu.cz

Kanibalismus u bažantů chovaných v zajetí

Cannibalism in pheasants kept in captivity

Hrabčáková Petra, Voslářová Eva, Bedáňová Iveta

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Pheasants kept in captivity are prone to feather pecking and cannibalism which can cause health problems and death losses in pheasant flocks. Measures against feather pecking and cannibalism include beak trimming, the clipping of plastic or metal rings into the bird's nostrils, the fitting of spectacles onto the bird's beak, environmental enrichment and other management practices (stocking density, flock size). Alternative methods currently in research include e.g. the use of chemical sprays to the feathers and insoluble fiber in animal nutrition. Preventive measures are important not only to achieve economic efficiency, but also to maintain good health and welfare in captive-reared pheasants.

Keywords: *cannibalism; feather pecking; enrichment; spectacles; cauterization*

Úvod

Klování peří je dosud nevyřešený problém v chovech drůbeže na celém světě (Harlander-Matauschek, 2011). Byl popsán u mnoha druhů včetně domácích slepic (Blokhuis et al., 2007), krůt (Busayi et al., 2006), kachen (Gustafson et al., 2007), a křepelek (Bilcik and Bessei, 1993), ale také pernaté zvěře chované v zajetí, zejména bažantů (Kjaer, 2004). Problém je zvláště závažný ve volných ustájeních, kde může postihnout značné množství ptáků (Keeling, 1995). Ve Švédsku bylo v rámci rozsáhlého průzkumu chovů pernaté zvěře zjištěno klování peří ve 38 % chovů bažantů (Aland and Madec, 2009). Přestože řada rizikových faktorů, které ovlivňují rozvoj vyklovávání peří, byla identifikována (např. Lambton et al., 2010), nepodařilo se jej dosud vymýtit. V praxi jsou používány různé metody ke snížení výskytu klování peří.

Kauterizace zobáku

Jedním z preventivních opatření proti vzájemnému oštipování peří u bažantů je kauterizace zobáku. Jedná se o odstranění jedné třetiny až jedné poloviny horní a dolní části zobáku. Vzhledem k tomu, že kauterizace přeruší nervy zobáku, klování s kauterizovaným zobákem neposkytuje ptákům takovou smyslovou odezvu jako neporušený zobák (Kuenzel, 2007). U kura domácího je tento zákrok obvykle prováděn krátce po vylíhnutí za účelem redukce kanibalismu a zlepšení konverze krmiva (Glatz, 1990), u bažantů se však často provádí později a tím více je pak na místě otázka akutní a chronické bolesti u ptáků po zákroku (Cheng, 2006). Jak vyplývá z výsledků sledování krátko i dlouhodobého dopadu kauterizace zobáku u bažantů (Voslářová et al., 2013), kauterizace zobáku je pro bažanty velmi stresující zákrok a nelze jej tedy považovat za vhodné řešení nežádoucích projevů kanibalismu. V České republice se navíc jedná o zákrok zakázaný zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (ÚKOZ, 2011).

Násadce na zobák

Fehlberg et al. (1993) a Kjaer (1997) popisují použití různých typů násadců, které jsou aplikovány na zobák k prevenci vzájemného zraňování. Plastové nebo kovové kroužky

jsou zasazeny do nozder ptáků tak, aby se zabránilo zavírání zobáku. Jiným typem jsou násadce ve tvaru brýlí. Tyto násadce se používají ke snížení oštipování peří, kanibalismu a konzumace vajec bažanty ve snáškových klecích. Jedná se o plastové brýle, které jsou navrženy tak, aby blokovaly zorné pole a tím snižovaly vyklovávání peří u bažantů (Anon, 2012). Násadce mohou zlepšit stav peří a kůže, ale mohou také způsobit poškození zobáku a nozder (Bulter and Davis, 2010). Swarbrick (1985) zjistil při použití násadců na zobák zvýšenou úmrtnost. Voslářová et al. (2013) popsali negativní dopad na imunitní systém bažantů v důsledku chronického stresu při déle trvajícím použití násadců.

Obohacené klecové systémy

Konvenční klecové systémy neumožňují ptákům přirozené chování. Bažanti chovaní v konvenčních klecích tak mohou vykazovat poruchy chování, které často vyústí v různé formy agrese a kanibalismu, nezřídka způsobí výrazné zhoršení zdravotního stavu nebo dokonce smrt (Zapletal et al., 2010). Welfare zvířat lze zlepšit ustájením v druhově specifických přirozených podmínkách nebo podmínkách blízkých přirozenému prostředí. Obohacené prostředí, např. přítomnost hřadů může zlepšit životní podmínky kuřat (Duncan et al., 1992; Pohle and Cheng, 2009). Použití hřad (Swan, 1983) a nižší hustota osazení (Cain et al., 1984; Kjaer, 2004) byly navrženy jako potenciální způsob řešení snížení četnosti vyklovávání peří i v bažantích voliérách. Otázku obohacených klecí a jejich vlivu na úroveň agrese a vyklovávání peří řešili také Jendral et al. (2005) a Pavlík et al. (2008). Pozitivní vliv obohaceného prostředí na welfare bažantů chovaných v klecových systémech popisují také Hrabčáková et al. (2012).

Hustota osazení

Keeling and Gonyou (2001) uvádějí, že ustájení domácích slepic v konvenčních klecích s vyšší hustotou osazení je spojeno se snížením produkce vajec, vyšší mírou úmrtnosti, více případy vyklovávání peří a kanibalismu, a zvýšenou bázlivostí. Změny faktorů životního prostředí během odchovu mohou snížit problémy s chováním a hustota osazení je hlavním faktorem ovlivňujícím vyklovávání peří u pernaté zvěře (Hoffmeyer 1969, Cain et al., 1984, Fehlberg et al., 1993). Kjaer (2004) také uvádí, že hustota a velikost skupiny měla zřetelný vliv na kvalitu opeření a poškození kůže bažantích kuřat. Podle jeho pozorování lze bažantí kuřata až do věku 5-6 týdnů chovat při hustotě 0,7 kuře/m² ve skupině 80 kuřat bez rizika vzájemného klování. S vyšší hustotou bažantů chovu se snižovala kvalita jejich opeření, tedy rostl výskyt klování peří.

Postřiky na peří

Účinnost postřiků peří u bažantů dosud nebyla sledována, avšak studie u drůbeže přináší nadějně výsledky. Klování peří přímo souvisí s konzumací peří, což naznačuje, že peří je nosnicemi vnímáno jako substitute krmiva. Ve studii Harlander-Matauschek et al. (2009) se klování peří snižovalo, pokud se stalo peří chuťově nelákavé. Ukázalo se, že postřik peří odpuzující látkou (chinin) snižuje krátkodobě vyklovávání peří. Ptáci, jejichž peří bylo ošetřeno chininem, se naučili, že peří stejného druhu není atraktivní pro klování, a vyhýbali se mu. Všechny použité látky (např. 1% roztok česneku, 1% mandlový olej, 1% hřebíčkový olej, 1% hřebíčkový roztok, roztok síranu chininu ve čtyřech koncentracích (0.1%, 1%, 2%, 4%), 0.6 mol roztok chloridu hořečnatého) statisticky významně snížily vyklovávání i konzumaci peří ve srovnání s peřím bez

postřiku. Nejúčinnější byly koncentrace chininu 2 % a 4 % (Harlander-Mataushek and Rodenburg, 2011).

Využití vlivu nerozpustné vlákniny ve výživě zvířat

Úloha peří jako doplňkové složky výživy není známá. Peří není přisuzován nutriční význam (McCasland and Richardson, 1966). Harlander-Mataushek et al. (2006) ale předpokládají, že peří může mít podobný účinek jako nerozpustná vláknina. Nerozpustná vláknina stimuluje peristaltiku a urychluje průchod krmiva trávicím traktem (Krogdahl, 1986). Bylo také zjištěno, že zvýšení obsahu vlákniny zlepšilo pokryv peří nosnic z důvodu menšího výskytu vyklovávání peří (Wahlström et al., 1998, Aerni et al., 2000). To vyvolává otázku, zda peří lze nahradit vlákninou v dietách s nízkým obsahem vlákniny, kterými jsou obvykle nosnice krmeny, ke stimulaci průchodu krmiva (Harlander-Mataushek et al., 2006), a zda by se k tomuto dalo přistoupit i v chovech bažantů. Přetrvávající otázkou je, zda trávicí výhody konzumace peří jsou chybějícím článkem k vyřešení problému vzájemného vyklovávání peří. To znamená, že další studie v této oblasti jsou nezbytně nutné pro nalezení řešení, a tím zajištění dobrých životních podmínek zvířat (Harlander-Mataushek et al., 2006).

Závěr

Kanibalismus u bažantů a drůbeže obecně je závažným problémem počínajícím vzájemným vyklováváním peří. Převážná část autorů se shoduje, že je důsledkem nepřírodných podmínek chovu. Opatření k zabránění klovaní peří často neřeší příčinu, ale pouze mechanicky zabraňují zraněním a zpravidla ještě více narušují welfare chovaných ptáků (kauterizace, násadce). Upřednostněna by měla být opatření směřující k umožnění přirozeného chování v odpovídajících podmínkách chovu.

Literatura

Literatura dostupná u autorů.

Kontaktní adresa: Petra Hrabčáková, Mgr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42, Brno, H11008@vfu.cz

Vliv podmínek skladování těl černé zvěře na koncentraci biogenních aminů ve svalovině kýty a plece

Influence of storage conditions of wild boars carcasses on the biogenic amine concentration in shoulder and leg muscle

¹Hutařová Zdeňka, ¹Večerek Vladimír, ¹Maršálek Petr, ¹Forejtek Pavel,
²Svobodová Irena

¹Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická
univerzita Brno

Summary

The objective of this study was to assess the venison hygienic quality of wild boars carcasses stored at temperatures 0, 7, 15°C for 21 days. Venison hygienic quality was assessed on the base of biogenic amine concentrations. Muscle samples (shoulder and leg) were collected at regular weekly intervals (1., 7., 14 and 21. day after wild boars killing). Biogenic amine concentrations were assessed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. In muscle samples (both leg and shoulder) and leg muscle samples of wild boars stored at 0°C and 7 °C respectively, were not observed significant changes in the biogenic amine concentrations during whole storage time. In shoulder muscle samples of wild boars stored at 7°C were apparent changes of biogenic amine concentrations observed after the first storage week. In muscle samples (both shoulder and leg) of wild boars carcasses stored at 15°C was the increase of biogenic amine concentrations evident in the course of the first storage week.

Keywords: hygienic quality; *Sus scrofa*; venison

Úvod

V současné době je sledována zvýšená produkce a obchodování s masem prasat divokých. V souvislosti s tímto faktem je spojena snaha spotřebitelů o zajištění kvality této suroviny (Marchiory, 2003). Hygienická kvalita zvěřiny je často diskutovanou problematikou pramenící ze způsobu jejího získávání. Zajištění odpovídajících podmínek lovu, následného ošetření a skladování těl ulovené zvěře patří mezi nejčastěji zmiňované faktory spojené s kvalitou zvěřiny.

Možnými indikátory hygienické kvality potravin jsou biogenní aminy. Jedná se o nízkomolekulární látky, jejichž tvorba v potravinách je spojována zejména s pomnožením mikroorganismů. Hernandez-Jover et al. (1996), využili ve své studii následující rozmezí koncentrací biogenních aminů pro rozdělení hygienické kvality masa: < 5 mg/kg čerstvé maso, vysoké hygienické kvality; 5 – 20 mg/kg maso přijatelné hygienické kvality, již s počátečními známkami kažení; 20 – 50 mg/kg maso nízké hygienické kvality; > 50 mg/kg zkažené maso.

V Evropě je zaznamenán stále se zvyšující zájem spotřebitelů o maso zvěře neustále vzrůstá (Membré, 2011). Ověření dodržování požadavků spojených s manipulací ulovené zvěře bývá často v praxi nemožné. Jedinou možností je často posouzení hygienické kvality zvěřiny bez předchozích údajů. Využití koncentrací biogenních aminů pro hodnocení hygienické kvality by mohlo být možným způsobem ověření skutečného hygienického stavu zvěřiny.

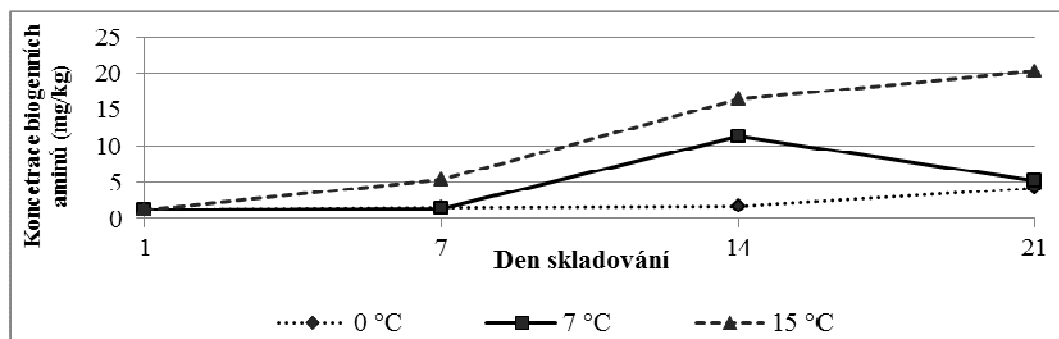
Materiál a metodika

Do pokusu bylo zahrnuto 21 ks prasat divokých (*Sus scrofa*) o hmotnosti 18-39 kg, do 1 roku stáří (tzv. lončák), ulovených v různých honitbách Jihomoravského kraje. Ulovené kusy prošly ihned po ulovení řádným prvotním ošetřením, bylo zahájeno chlazení a okamžitý transport do provozních prostor na VFU Brno. 3 kusy divokých prasat byly vyšetřeny ihned po transportu pro získání výchozích hodnot. Zbylá prasata byla rozdělena na 3 skupiny a za odlišných teplot (0, 7 a 15 °C) byla skladována po dobu 3 týdnů. V týdenních intervalech (7., 14. a 21. den) po ulovení byla analyzována svalovina získaná z kýty a plecí divokých prasat z každé testované skladovací teploty.

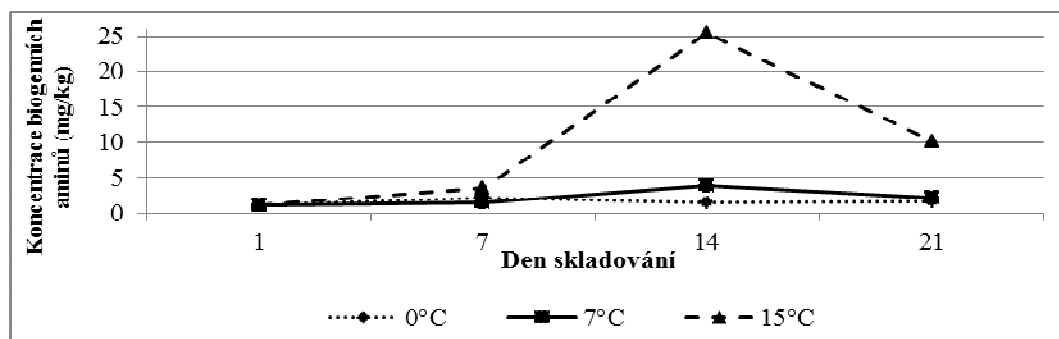
Vzorky svaloviny (m=0.5 g) pro analýzu byly připraveny extrakcí tkáně 5% roztokem kyseliny trichloroctové. Analýza byla provedena metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získané výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny statistickým programem UNISTAT 5.6 za použití vícevýběrového mediánového testu. Hodnota $p < 0.05$ byla považována za statisticky významnou.

Výsledky

Koncentrace biogenních aminů stanovené ve svalovině plece a kýty jsou uvedeny v grafu č. 1 a č. 2.



Graf 1: Koncentrace biogenních aminů ve svalovině plece prasete divokého v průběhu skladování při teplotách 0, 7, 15 °C.



Graf č. 2: Koncentrace biogenních aminů ve svalovině kýty prasete divokého v průběhu skladování při teplotách 0, 7, 15 °C.

Diskuse

Z výsledků získaných v naší studii je patrné, že míra tvorby biogenních aminů souvisí s teplotou, ve které byla těla prasat divokých skladována. Zjištění je v souladu s tvrzením, které uvádí ve své studii Naila et al. (2010).

Z výsledků uvedených v grafu č. 1 dále vyplývá, že součet koncentrací biogenních aminů ve svalovině plece prasat divokých skladovaných ve visu v kůži při teplotě 0°C nepřesáhl hodnotu 5 mg/kg. Na základě dělení hygienické kvality masa dle obsahu biogenních aminů, uvedené ve studii Hernandez–Jovera et al. (1996) tak může být označena jako maso vysoké hygienické kvality. U svaloviny plece prasat divokých skladovaných při teplotě 7°C došlo ke ztrátě vysoké hygienické kvality v průběhu druhého týdne skladování, kdy byl pozorován nejvyšší, statisticky významný ($p \leq 0.05$) nárůst koncentrací biogenních aminů. Ztráta vysoké hygienické kvality svaloviny plece prasat divokých skladovaných při teplotě 15 °C byla zaznamenána již sedmý den skladování. K nárůstu koncentrací biogenních aminů docházelo v průběhu celé doby skladování. Statisticky významný rozdíl mezi vyšší koncentrací biogenních aminů byl nalezen mezi prvním a 21. dnem skladování ($p \leq 0.05$).

Ve svalovině kýty prasat divokých skladovaných při teplotě 0 a 7°C byla vysoká hygienická kvalita zachována po celou dobu skladování. Ve svalovině kýty prasat divokých skladovaných při teplotě 15°C byla ztráta vysoké hygienické kvality zaznamenána v průběhu druhého týdne skladování. V tomto období skladování byl pozorován nejvýraznější, statisticky významný ($p \leq 0.05$) nárůst koncentrací biogenních aminů. Dle Hernandez–Jovera by mohla být svalovina kýty těchto prasat divokých označena jako maso přijatelné hygienické kvality (hodnoty koncentrací biogenních aminů do 20 mg/kg); po 14. dnech skladování, kdy koncentrace biogenních aminů dosáhly hodnoty 25.49 mg/kg by mohla být svalovina označena jako maso nízké hygienické kvality.

Závěr

Z výsledků uvedených v naší studii vyplývá, že u těl prasat divokých skladovaných při teplotě 0°C byla hygienická kvalita zachována po celou dobu skladování. U prasat divokých skladovaných při teplotě 7 °C došlo ke ztrátě hygienické kvality v průběhu druhého týdne skladování. Za zcela nevhodnou teplotu pro skladování těl prasat divokých lze označit teplotu 15°C, kdy byla ztráta hygienické kvality masa pozorována již 7. den skladování.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 13/2012/FVHE.

Literatura

- HERNANDEZ–JOVER, T.; IZQUIERDO–PULIDO, M.; VECIANA–NOGUES, M.T.; VIDAL–CAROU, M.C. Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, vol. 44, no. 10, s. 3097-3101.
- NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food-Existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*. 2010, vol. 75, no. 7, s. 139-150.
- MARCHIORI A.F.; FELICIO P.E. Quality of wild boar meat and commercial pork. *Scientia Agricola*. 2003, vol. 60, no. 1, s. 1-5.
- MEMBRE, J.M.; LAROCHE, M.; MAGRAS, C. Assessment of levels of bacterial contamination of large game meat in Europe. *Food Microbiology*. 2011, vol. 28, no. 5, s. 1072-1079.

Kontaktní adresa: Zdeňka Hutařová, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42, hutarovaz@vfu.cz

SEKCE 6

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

The effects of subchronic exposure to metribuzin and terbuthylazine on some oxidative stress parameters of early developmental stages of common carp

**Hostovský Martin, Blahová Jana, Pihalová Lucie, Štěpánová Stanislava,
Prášková Eva, Maršálek Petr, Svobodová Zdeňka**

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

Summary

*Our work evaluates the subchronic effects of triazine compounds metribuzin and terbuthylazine on embryo-larval stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using some selected oxidative stress parameters and biotransformation enzyme. Obtained results show that triazine herbicides induced oxidative stress in embryo-larval stages of common carp. Increased activities of antioxidant defence and biotransformation enzymes were evident biomarkers of free radical attack. The lipid peroxidation level was low in early developed fish after triazines exposure.*

Keywords: *triazine; fish; embryo-larval; antioxidant enzyme; detoxification enzyme*

Introduction

Due to the increasing use of chemical substances in agriculture, industry and households in the last few decades the environmental pollution has intensified and water pollution is a widespread problem in many aquatic environments (Valavanidis et al. 2006). Fish are suitable organisms for the study of biochemical, biological or behavioral effects of pesticide exposure in the ecosystem (Powers, 1989; van der Oost et al. 2003).

The primary mode of triazine herbicide action on plants is the inhibition of the Hill reaction phase of photosynthesis by the blocking of electron transport and they are widely used mostly in (Roberts *et al.* 1998; Tomlin, 2003). Triazine pesticides may cause morphological, physiological and biochemical alterations in fish (Arufe *et al.* 2004; Dezfuli *et al.* 2006; Nieves-Puigdoller *et al.* 2007) but less is known about the specific effects of terbuthylazine or metribuzin on oxidative stress parameters in early developmental stages of fish.

Our study evaluate the effects of subchronic exposure of embryo-larval developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to metribuzin and terbuthylazine herbicides by using selected oxidative stress biomarkers.

Material and Methods

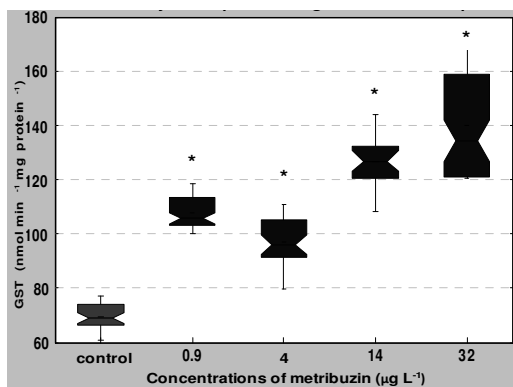
Embryo-larval toxicity tests were conducted using a modified protocol according to the OECD 210 guidelines (Fish, early-life stage toxicity test) (OECD, 1992). For the test a semistatic method was used, with twice daily bath replacement.

Metribuzin at concentrations of 0.9, 4, 14, and 32 mg L⁻¹ and terbuthylazine at concentrations of 0.9, 160, 520, and 820 µg L⁻¹ were used. Concentrations during the test did not sink below 80% of the nominal concentration. The test was ended after 30 days; the fish were killed (by CO₂) and immediately frozen, and stored at -85 °C until analyses. Whole body samples were weighed and homogenised using phosphate buffer. The total catalytic concentration of glutathione *S*-transferase was determined by measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione

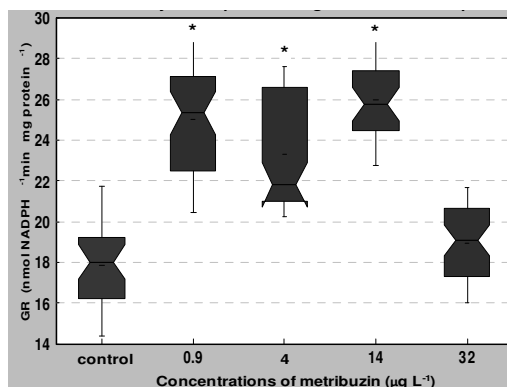
(GSH) at 340 nm (Habig *et al.* 1974). The catalytic concentration of GR was determined spectrophotometrically by measuring oxidation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1975). The protein concentration, for specific activities of GST or GR expression, was determined by Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). To check lipid peroxidation in the fish, TBARS assay described by Lushchak *et al.* (2005) at 535 nm was used. All spectrophotometric measurements were performed using the Varioskan Reader (Thermo Fisher Scientific Inc.). The statistical software program STATISTICA (version 8.0 for Windows, StatSoft) was used to compare differences among the test groups.

Results

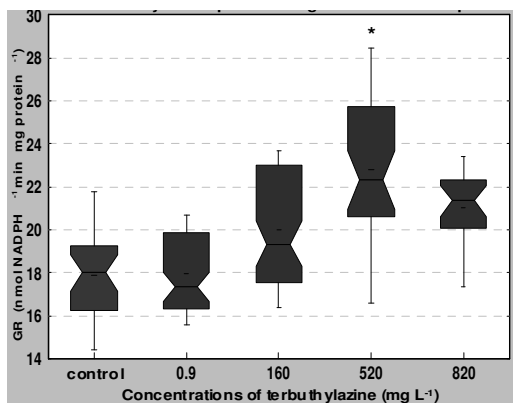
In metribuzin treated groups, the activity of GST was increased ($p < 0.05$) in all experimental groups, with the highest in 32 mg L⁻¹ (Graph 1.) The GR activity was increased in 0.9, 4, and 14 mg L⁻¹ groups (Graph 2.) and the TBARS levels were higher in 0.9 mg L⁻¹ group. Terbutylazine had no significant effect ($p > 0.05$) at any tested concentrations on GST activity. It caused an increase ($p < 0.05$) of GR activity in the concentration at 520 µg L⁻¹ (Graph 3.) We found non-significant ($p > 0.05$) effect of terbutylazine exposure on TBARS level.



Graph 1: GST activity after metribuzin exposure in early developmental stages of common carp, *significant effect ($p < 0.05$) compared to control.



Graph 2: GR activity after metribuzin exposure in early developmental stages of common carp, *significant effect ($p < 0.05$) compared to control.



Graph 3: GR activity after terbutylazine exposure in early developmental stages of common carp, *significant effect ($p < 0.05$) compared to control.

Discussion

Our study showed that metribuzin exposure significantly raised GST activity in embryo-larval fish stages at all tested concentrations and terbuthylazine at subchronic concentrations (0.9, 160, 520, and 820 $\mu\text{g L}^{-1}$) non-significantly increased GST activity in embryo-larval fish stages. Our results concerning GST activity confirm the potential of metribuzin herbicides to affect detoxification enzymes in early life stages of fish, which can also have an influence on antioxidant defence systems. Such activity points to a clear level of xenobiotic biotransformation in early life stage fish development. Wiegand *et al.* (2001) reported an effect on the detoxification system of zebrafish (*Danio rerio*) by atrazine, in which a higher atrazine concentration (up to 5 mg L^{-1}) caused a decrease in GST activity. A study concerning chronic exposure of juvenile common carp to simazine reported no influence of simazine (at 0.06, 1, 2, and 4 $\mu\text{g L}^{-1}$) on GST activity during a 90-day period of exposure (Velisek *et al.* 2012).

We obtained a significantly higher increase in GR activity in embryo-larval fish stages in metribuzin exposed groups at concentrations of 0.9, 4, 14 mg L^{-1} and at a terbuthylazine concentration of 520 $\mu\text{g L}^{-1}$ compared to control. Stara *et al.* (2012) observed the effect of simazine on oxidative stress and antioxidant responses in juvenile common carp after chronic exposure. Nwani *et al.* (2010) confirmed increased antioxidant activity, including GR, with increasing exposure to atrazine in freshwater fish (*Channa punctatus*).

We found a non-significant increase in TBARS levels in embryo-larval fish stages exposed to the highest tested concentration of terbuthylazine (820 $\mu\text{g L}^{-1}$), but in other exposed groups the level of TBARS decreased non-significantly compared to control. Studies concerning the effects of triazine showed a rise in TBARS levels with a positive correlation to tested pesticide concentrations (Elia *et al.* 2002; Nwani *et al.* 2010, Xing *et al.* 2012).

Conclusions

Our results suggest that metribuzin and terbuthylazine had an effect on the detoxifying enzyme and oxidative stress biomarkers in embryo-larval stages of common carp. The triazine herbicides induced oxidative stress in development stages of fish during 30 days of toxicity test and after this period we can use GST, GR and TBARS level as biomarkers of free radicals attack induced by pesticides. The results of this work provide additional data on the subchronic exposure of embryo-larval fish stages to the triazine herbicides terbuthylazine and metribuzin.

Acknowledgements

This project was financially supported by IGA VFU Brno, grant number IGA 90/2011/FVHE.

References

For references contact authors.

Contact address: Martin Hostovský, MVDr., Department of Biochemistry, Chemistry and Biophysics; Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno; Czech Republic, e-mail: hostovskym@vfu.cz

The effects of atrazine on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*)

Chromcová Lucie, Blahová Jana, Živná Dana, Štěpánová Stanislava,
Plhalová Lucie, Prášková Eva, Svobodová Zdeňka

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

Summary

Atrazine and its chloro-s-triazine metabolites are found in surface water, groundwater, even though they are banned in the Czech Republic since 2005. The objective of the present study was to determine the subchronic toxic effect of atrazine at concentrations of 0.3; 30; 100 and 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ on growth and development of early life stages of common carp and antioxidant defence enzymes. The study demonstrated that atrazine has not been effected the weight and growth rate evolution. Exposure to atrazine at 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ was associated with significant increased of activities glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and catalase compared to control. Activity of glutathione reductase (GR) was the slight increases only in the first experimental concentration of atrazine (0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$) and significantly lower ($p < 0.05$) activity of GR were observed in groups exposed to 30, 100 and 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ compared to the group exposed to 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. The level of oxidized lipids slightly increased in experimental groups exposed to atrazine at 100 and 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ compared to control. Atrazine demonstrated the significant influence on the biotransformation enzyme and oxidative defence enzymes of exposed early life stages of common carp. Based on these results were determine a lowest observed effect concentration (LOEC) = 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords: atrazine; embryo–larval toxicity test; LOEC; oxidative stress

Introduction

Atrazine (6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is a selective systemic herbicide belonging to the s-triazine family which causes inhibition of photosynthesis. Atrazine has been used in agriculture to kill weeds on crops include mainly maize, sorghum, sugarcane (Hussein et al., 1996; Kimbrough and Litke, 1996; U.S. EPA, 2012). Degradation of atrazine can be carried out by photolysis and microorganisms in surface water and then is hydrolyzed of the chloro substituent. Degradation decreases with increasing depth, atrazine has a low solubility and then can be stable and persist in groundwater (U.S. EPA, 1988; Howard, 1989; WHO, 2010).

This herbicide is still one of the most widely used in the U.S., China, Brazil and Argentina (Graymore et al., 2001; Zhou et al., 2008). Based on the European Commission No. 2004/248/EC the Czech Republic has banned use of atrazine since 1 August 2005. This substance is also currently contaminant of rivers in the Czech Republic and was detected ranging from 0.3 to 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Czech Hydrometeorological Institute, 2008).

The prevalence of these pesticides in the aquatic environment, and their potential for adverse effect, makes them strong candidates for toxicological studies. To date, fish have proved to be useful experimental models for the evaluation of the health of aquatic ecosystems exposed to environmental pollution and the associated biochemical changes (Neskovic et al., 1993; Steinberg et al., 1995; Hussein et al., 1996; Houjuan et al., 2010; Dong et al., 2012; Lazar et al., 2012; Lazar and Beiras, 2012).

Material and Methods

Experimental protocol

Embryo-larval toxicity test were performed according to the OECD 210. Each per 100 fertilized eggs at 24 h post-fertilization were transferred into 15 crystallization dishes and everything was done in 3 series. The eggs were exposed in 4 concentrations test solutions: 0.3; 30; 100 and 300 µg L⁻¹ and a control (atrazine-free tap water). Semi-static method with solution replacement twice a day was used, daily was measured temperature (21.3-22.9 °C), pH (8.1-8.9) and the dissolved oxygen saturation being above 60%. The first day, the day after post-fertilization was designated as the beginning of the test and was terminated after 33 days, when all larvae in the control dishes reached the juvenile stage. Embryos and larvae from all groups were collected in 4 % formalin during the test (6, 12, 19 and 26 days) and at the end (33 day), then was monitoring developmental stages, total length (TL), weight (w) and Fulton's condition factor (FCF), length-weight ratio.

Weight and growth rate evolution

Fulton's condition factor was calculated at each sampling time.

$$FCF = \frac{W \cdot 10^5}{L^3}$$

W = weight in g, L = total length in mm.

The mean specific growth rate (SGR) was calculated for each experimental group beginning on day 6 (the first sampling time) and on day 33 (completion of the test).

$$SGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T_2 - T_1} \cdot 100$$

SGR = specific growth rate, W₁ = weight of one fish at time T₁, W₂ = weight of one fish at time T₂, T₁ = first sampling time, T₂ = end of the test.

The inhibition of specific growth (I) rate for each experimental group was calculated as follows:

$$I [\%] = \frac{SGR (control) - SGR (group)}{SGR (control)} \cdot 100$$

Measurement of antioxidant defence enzymes and lipid peroxidation

The catalytic concentrations of glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were measured spectrophotometrically. To check lipid peroxidation in the samples, malondialdehyde was measured by the thiobarbituric-acid-reactive-substances (TBARS).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 8.0 for Windows (StatSoft CR).

Results and Discussion

Hatching

Hatching of embryos started on the third day and was completed on fifth days.

Accumulated mortality

Mortality in the control group and all the tested groups were in a similar range.

Histopathology

Histological examination did not reveal any histological lesions (skin, gill, liver tissue).

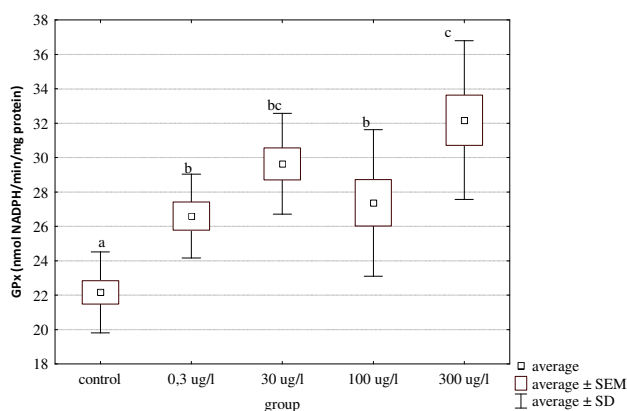
Length and weight growth parameters

Table 1: Growth rate results of the 33-day embryo-larva test on common carp.

Atrazine	Control	0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	300 $\mu\text{g L}^{-1}$
TL ₃₃ (mm)	18.22±2.68	18.25±2.25	17.92±2.04	22.84±18.13	18.23±1.85
W ₃₃ (mg)	87.92±42.22	85.56±33.00	79.95±30.07	81.33±29.1	86.66±29.74
FWC ₃₃	1.37±0.50	1.33±0.1	1.31±0.12	1.32±0.12	1.37±0.11
SGR	14.48	14.82	14.14	14.59	14.97
I (%)	-	-2.34	2.32	-0.75	-3.39

Table 2: Activities of GR (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹), CAT ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg protein⁻¹), SOD (U mg protein⁻¹) and GST (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹); and content of TBARS (nmol g of w.w⁻¹) in common carp (mean \pm SEM) after atrazine exposure; $p < 0.05$ between different treatments groups are indicated by different alphabetic superscripts.

Group	Control	0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	300 $\mu\text{g L}^{-1}$
GR	6.04±0.56 ^{ab}	6.84±0.69 ^a	5.46±1.01 ^b	5.59±1.20 ^b	5.64±0.68 ^b
CAT	19.67±2.05 ^a	24.52±2.87 ^b	22.88±4.28 ^{ab}	21.33±4.07 ^{ab}	22.14±2.62 ^{ab}
SOD	3.17±0.41 ^b	3.71±0.17 ^a	3.34±0.28 ^{ab}	3.00±0.35 ^{bc}	2.81±0.13 ^c
GST	101.80±8.6 ^{bc}	118.99±7.00 ^a	109.07±11.70 ^{ac}	93.73±7.30 ^b	91.91±5.07 ^b
TBARS	17.80±10.06 ^a	-	-	22.98±3.71 ^a	18.60±4.37 ^a



Similar results with significant increased activity of antioxidant defence enzymes and lipid peroxidation after atrazine exposure were reported by authors McFarland et al. (1999), Di Giulio and Meyer, (2008), Wiegand et al. (2000), Elia et al. (2002), Hostovský et al., (2012) and Blahova et al. (2013).

Figure 1: GPx (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹) after 33 days' exposure to atrazine; $p < 0.05$ between different treatments groups are indicated by different alphabetic superscripts.

Conclusion

Exposure of atrazine had a significant influence on the induction biotransformation enzyme and oxidative stress markers of exposed embryo-larval stages of common carp.

Acknowledgments

This research was supported by GACR P502/12/P163.

References

References available upon request.

Contact address: Lucie Chromcová, Mgr., Department of Veterinary Public Health and Toxicology, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, chromka.l@seznam.cz

Effects of terbuthylazine on oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*)

Slaninová Andrea, Blahová Jana, Hostovský Martin, Modrá Helena,
Bednář Daniel, Svobodová Zdeňka

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Effects of terbuthylazine on common carp (*Cyprinus carpio*) were observed after 24h exposure to the high pesticide concentration and after recovery period of 6 days. In this study, a commercial herbicide formulation Click 500 SC (terbuthylazine 500 g/l) was used, the test concentration of terbuthylazine was 3.3 mg/l. Biomarkers of oxidative stress such as glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathioneperoxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), amount of malonyldialdehyde (MDA) and ceruloplasmin activity were determined in liver of carp.

Keywords: herbicides; biomarkers; antioxidant defence

Introduction

Terbuthylazine (6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is used as a broad spectrum pre- or postemergence herbicide in agriculture and forestry. Its herbicidal activity is based on the inhibition of photosynthesis (Roberts et al. 1998). Like triazines, terbuthylazine and its main metabolite degradation product desethylterbuthylazine are frequently detected in surface and ground water (Larson et al. 1999, Guzella et al. 2006, Noppe et al. 2007, Quednow and Puttmann 2007, Fava et al. 2010, Loos et al. 2010).

Terbuthylazine belongs to triazine herbicides group. These pesticides are known due to their ability to induce oxidative stress in fish (Oropesa et al. 2009, Prasad et al. 1991, Elia et al. 2002, Davies et al. 1994). Oxidative stress is characterized as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant response of an organism where ROS production prevails (Sies, 1991).

The aim of the presented study was to assess the toxic impact of short-term exposure of terbuthylazine on common carp (*Cyprinus carpio*) with regard to oxidative condition and regeneration ability of liver of these fish.

Material and Methods

The experimental fish (*C. carpio*) (weight 130.7 ± 27.7 g) were exposed to the concentration of terbuthylazine of 3.3 mg/l for 24 hours. The test concentration (1/3 96hLC₅₀) was prepared by commercial preparation Click 500 SC (terbuthylazine 500 g/l) dissolved in 10 ml of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). After 24 hours (day 1) fish were exposed to dechlorinated tap water with DMSO (0.0005%) for another 6 days (day 7). The fish were sacrificed on day 1 and day 7 and the liver (hepatopancreas) were dissected. The liver samples were stored at -85 °C until further analyses were performed.

The analysis of ceruloplasmin activity, GST, GR, GPx, CAT and MDA were performed using a Varioscan flash spectral scanning multimode reader (Thermo Scientific).

Determination of terbuthylazine in water was performed by gas chromatography with ion trap mass spectrometry (GC/IT-MS).

Statistical analysis of the data was performed using the program Unistat 5.6.

Results

The results of determination of oxidative stress biomarkers are presented in table 1. The groups (control-K and experimental-T) were compared on the same day of sampling. Determination was performed after 24h exposure (groups K1 and T1) and after 6-day recovery period in water (groups K2 and T2). K1, K2 are control groups and T1, T2 are treated groups.

Statistically significant changes were found in GST activity and TBARS after recovery period.

Table 1: Parameters of oxidative stress on day 1 (K₁, T₁) and day 7 (K₂, T₂).

group	Parameter (mean ± SD)					
	GSH	GST	GPx	GR	CAT	TBARS
K ₁	2,74 ± 1,32	118,29 ± 21,21	227,35 ± 81,32	8,72 ± 2,73	270,70 ± 86,71	14,20 ± 5,98
T ₁	2,10 ± 1,91	101,69 ± 16,55	167,41 ± 46,42	6,85 ± 1,60	197,39 ± 59,36	10,65 ± 2,97
K ₂	1,76 ± 0,39	70,58 ± 35,72	230,24 ± 85,62	8,32 ± 1,73	335,11 ± 110,98	19,50 ± 7,86
T ₂	2,60 ± 0,87	121,28 ± 21,98*	252,14 ± 56,37	6,28 ± 1,50	270,36 ± 71,29	11,75 ± 2,90*

* $p < 0.01$

GR - glutathione reductase (nmol NADPH/min/mg of protein); GPx - glutathione peroxidase (nmol NADPH/min/mg of protein); GSH – total glutathione (nmol/mg protein); CAT – catalase (μ mol H₂O₂/min/mg of protein); GST – glutathione-S-transferase (nmol/min/mg of protein); TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances (nmol/g of w/w).

Discussion

Low values of GSH and antioxidant enzymes (GST, GR, GPx, CAT) in liver after 24h-exposure to terbuthylazine indicated oxidative stress presence in *C. carpio*.

On day 7 a significant increase in the activities of GST ($p < 0.01$) and decrease of TBARS ($p < 0.01$) have been recorded. Ceruloplasmin activity was not affected in contrast to Dunier et al. (1994), who observed ceruloplasmin activity increase 7 days after a single i.p. injection of lindan to trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Our observations show increase of antioxidant response and decrease of oxidative stress in fish during the recovery period.

Conclusions

The presented study proved high regeneration potential of the fish organism after short-term stress.

Acknowledgement

This research was supported by IGA VFU 17/2013/FVHE.

References

- DAVIES, P.E.; COOK, L.S.J.; GOENARSO, D. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology And Chemistry*. 1994, vol. 13, s.1341–1354.
- DUNIER, M.; SIWICKI, A.K.; SCHOLTENS, J.; MOLIN, S.D.; VERGNET, C.; STUDNICKA, M. Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity; III. Effect on nonspecific immunity and B lymphocyte functions. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 1994, vol. 27, s.324–334.
- ELIA, A.C.; WALTER, W.T.; NORTON, S.J. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bulletin Environmental Contamination And Toxicology*. 2002, vol. 68, s.809–816.
- FAVA, L.; ORRU, M.A.; SCARDALA, S.; ALONZO, E.; FARDELLA, M.; STRUMIA, C.; MARTINELLI, A.; FINOCCHIARO, S.; PREVITERA, M.; FRANCHI, A.; CALA, P.; DOVIS, M.; BARTOLI, D.; SARTORI, G.; BROGLIA, L.; FUNARI, E. Pesticides and their metabolites in selected Italian groundwater and surface water used for drinking. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*. 2010, vol. 46, s.309–316.
- GUZZELLA, L.; POZZONI, F.; GIULIANO, G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy *Environmental Pollution*. 2006, vol.142, s.344–353.
- LARSON, S.J.; GILLIOM, R.J.; CAPEL, P.D. Pesticides in streams of the United States – initial results from the National Water-Quality Assessment Program. *U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report*. 1995, s. 98-4222, U.S. Geological Survey, Sacramento, CA, s.1–99.
- LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; CONTINI, S.; SCHWESIG, D.; WERRES, F.; BALSAA, P.; GANS, O.; WEISS, S.; BLAHA, L.; BOLCHI, M.; GAWLIK, B.M. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*. 2010, vol. 44, s.4115-4126.
- NOPPE, H.; GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T; DE WULF, E.; VERHEYDEN, K.; MONTEYNE, E.; POLFIET, K.; VAN CAETER, P.; JANSSEN, C.R.; DE BRABANDER, H.F. Distribution and ecotoxicity of chlorotriazines in the Scheldt Estuary (B-Nl). *Environmental Pollution*. 2007, vol. 147, s.668–676.
- PRASAD, T.A.; SRINIVAS, T.; RAFI, G.M.; REDDY, D.C. Effect in vivo of atrazine on haematology and O₂ consumption in fish, *Tilapia mossambica*. *Biochemistry International*. 1991, vol. 23, s.157–161.
- QUEDNOW, K.; PÜTTMANN, W. Monitoring terbutryn pollution in small rivers of Hesse, Germany. *Journal of Environmental Monitoring*. 2007, vol. 9, s.1337–1343.
- ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H.; LEE, P.W.; NICHOLLS, P.H.; PLIMMER, J.R. Metabolic pathways of agrochemicals. Part 1: Hebicides and plant growth regulators, *The Royal Society of Chemistry*. 1998, Cambridge.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The Americal Journal of Medicine*. 1991, vol. 91, s.31–38.

Contact address: Andrea Slaninová, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3,612 42 Brno, H08354@vfu.cz

Toxicity evaluation of buckwheat hull flavonoid extracts on cancer cells

¹Danihelová Martina, ²Švajdlenka Emil, ¹Šturdík Ernest, ¹Jantová Soňa

¹Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia

²Eurofins Bel/Novamann s.r.o., Bratislava, Slovakia

Summary

The aim of this study was to screen ten buckwheat cultivars for their flavonoid content and cytotoxic effect on human cancer cells HeLa, HT-29 and Caco-2. The highest level of total flavonoids and rutin achieved tartary buckwheat cultivar Madawaska and common buckwheat cultivar Bamby. The best cytotoxic activity was observed on human cervical cancer cell line HeLa. Common buckwheat cultivars Bamby and KASHO-2 inhibited growth of HeLa cells up to 50%. Almost 50% inhibitory activity was found for common buckwheat Špačinská on human colon cancer cells HT-29. In the case of human colon cancer cell line Caco-2 the most effective was common buckwheat cultivar Bamby that achieved about 30% of growth inhibition.

Keywords: buckwheat hulls; cancer cells; cytotoxic activity; flavonoid; rutin

Introduction

Buckwheat is popular among consumers for its nutritional and medicinal value. It comprises valuable proteins, starch with low glycemic index and high ratio of unsaturated fatty acids. Added value lies in content of many prophylactic compounds such as dietary fiber, flavonoids, phytosterols, minerals and group B vitamins (Danihelová, Šturdík, 2012).

Polyphenols and flavonoids are concentrated mainly in outer layers of buckwheat grain (Hung, Morita, 2008). They participate in buckwheat antioxidant, anticancer, cardioprotective or antiobesity function (Lee et al., 2010; Zhou et al., 2011).

In this study we have examined buckwheat hulls from ten cultivars for total flavonoid and rutin content. Toxicity on three human cancer cell lines was also evaluated.

Material and Methods

We have tested the set of nine common buckwheat cultivars and one tartary buckwheat cultivar. Buckwheat grains were mechanically dehulled and obtained hulls were extracted using methanol (p.a.) for 24 hours at room temperature. Total flavonoids were determined spectrophotometrically according Kreft et al. (2002). To quantify rutin content in samples we used HPLC determination with mass detection according (Tian et al., 2002).

Cell viability and cytotoxic effect on human cervical (HeLa) and colon cancer cells (Caco-2, HT-29) was monitored by MTT test according Jantová et al. (2010) with modifications.

Results and Discussion

Methanolic hull extracts from ten buckwheat cultivars were examined for total flavonoid content using simple spectrophotometric assay. Further in extracts there was determined rutin content using HPLC method with mass detection. Results are presented in Table 1.

Table 1: Total flavonoid (mg RE/100 g, dry weight \pm SD) and rutin content (mg/100 g, dry weight) in buckwheat hull methanolic extracts, RE = rutin equivalent, n=5.

Buckwheat cultivar	Total flavonoid (mg RE/100 g)	Rutin content (mg/100 g)
<i>Pyra</i>	54.0 \pm 2.5	13.2
<i>Špačinská 1</i>	70.0 \pm 0.4	20.2
<i>Siva</i>	54.9 \pm 1.0	14.4
<i>Emka</i>	72.2 \pm 0.4	18.3
<i>Bamby</i>	232.7 \pm 3.9	157.1
<i>Aiva</i>	54.4 \pm 0.8	10.9
<i>Madawaska</i>	599.4 \pm 2.2	492.7
<i>KASHO-2</i>	114.2 \pm 1.8	22.0
<i>JANA C1</i>	48.5 \pm 1.1	10.3
<i>Hrusowska</i>	64.4 \pm 0.4	17.2

The highest total flavonoid content was found for tartary buckwheat *Madawaska*. Among common buckwheat richest in flavonoids were cultivars *Bamby* and *KASHO-2*. Total flavonoid content was in good correlation with rutin content ($R^2=0.992$).

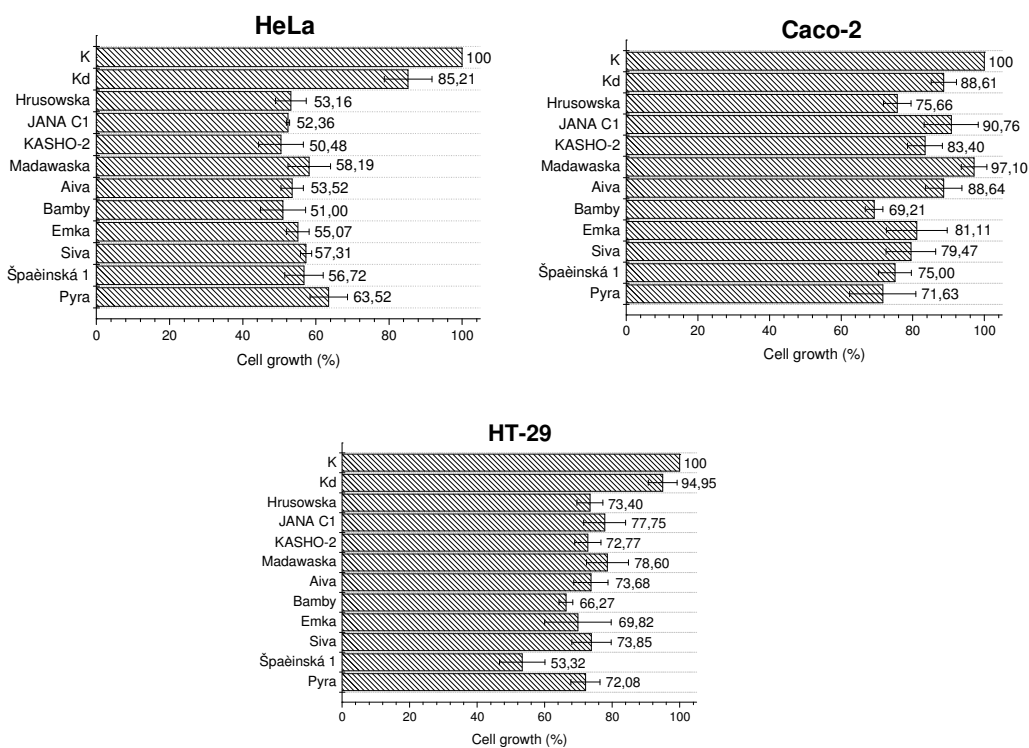


Figure 1: Cytotoxicity of buckwheat hull extracts (100 μ g/ml) on human cervical (HeLa) and colon cancer cells (Caco-2, HT-29) (72 hours); K = control, Kd = control with DMSO.

Toxicity of buckwheat hull flavonoid extracts was monitored on human cervical cancer cell line HeLa and colon cancer cell lines Caco-2 and HT-29. Cells were exposed to

extracts with concentration of 100 µg/ml for 72 hours. Percent of cell growth is outlined in Figure 1.

The highest toxicity revealed buckwheat flavonoid extracts on human cervical cancer cells HeLa. Common buckwheat cultivars *KASHO-2* and *Bamby* were the most effective with cell growth inhibition up to 50%. On colon cancer cells Caco-2 the inhibitory activity was weaker. The best in inhibition of this cell line was against common buckwheat *Bamby* (about 30%). Colon cancer cells HT-29 were more sensitive to buckwheat hull extracts. Cultivar *Špačinská* achieved the best results with cytotoxicity of 47%.

Conclusion

The screening of ten buckwheat cultivars revealed that highest total flavonoid as well as rutin content achieved tartary buckwheat *Madawaska* and common buckwheat *Bamby*. The best in cytotoxic action on human cancer cells was common buckwheat cultivar *Bamby*.

Acknowledgement

This work was financially supported by grants ASFEU (ITMS 26240220040), VEGA 1/0191/12 and APVV 0339-10. We are grateful to Plant Production Research Center Piešťany for providing buckwheat samples.

References

- DANIHELOVÁ, M., ŠTURDÍK, E. Nutritional and health benefits of buckwheat. *Potravinárstvo*. 2012, vol. 6, no. 3, p. 1-9.
- HUNG, P. V., MORITA, N. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chemistry*. 2008, vol. 109, no. 2, p. 325-331.
- JANTOVÁ, S., MATEJOV, P., THEISZOVÁ, M., BAKOŠ, D. Biocompatibility of bioactive glass composite based on $\text{Li}_2\text{O-SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2$. Text book of lecture – 30. Scientific symposium Industrial Toxicology. 2010, p. 258-264.
- KREFT, S., ŠTRUKELJ, B., GABERŠČIK, A., KREFT, I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*. 2002, vol. 53, no. 375, p. 1801-1804.
- LEE, J. S., BOK, S. H., JEON, S. M., KIM, H. J., DO, K. M., PARK, Y. B., CHOI, M. S. Antihyperlipidemic effects of buckwheat leaf and flower in rats fed a high-fat diet. *Food Chemistry*. 2010, vol. 119, no. 1, p. 235-240.
- TIAN, Q., LI, D., PATIL, B. S. Identification and determination of flavonoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, Polygonaceae) by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and photodiode array ultraviolet detection. *Phytochemical Analysis*. 2002, vol. 13, no. 5, p. 251-256.
- ZHOU, X., CHENG, S., YANG, Y., ZHOU, Y., TANG, W., ZHANG, X., WANG, Q., LI, Z. Toward a novel understanding of buckwheat self-defensive strategies during seed germination and preliminary investigation on the potential pharmacological application of its malting products. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, vol. 5, no. 32, p. 6946-6954.

Contact address: Martina Danihelová, Mgr., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, martina.danihelova@stuba.sk

Kombinované účinky vybraných toxických vplyvov na modelový organizmus *Artemia franciscana*
Combined effects of selected toxic impacts on the model organism of *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, Veterinárni a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The goal of our study was to observe mutual effects of low doses of ionising radiation, the most common pesticides (azoxystrobin and glyphosate) and zinc sulfid on the lethality of Artemia franciscana. Our results support the theory of radiation hormesis.

Keywords: *Artemia franciscana; azoxystrobin; glyphosate; ionising radiation; lethality; radiation hormesis*

Úvod

Zintenzívňovanie poľnohospodárskej výroby má za následok zvýšené využívanie pesticídov, a tým zvýšené zaťaženie ekosystému a značné hospodárske problémy (Hostovský a kol., 2012). Najpoužívanjšie pesticídy sú azoxystrobin, ktorý má fungicídne účinky a glyfosat, ktorý má herbicídne účinky (Pesticídny manuál, 2000, 2001).

Výrazný priemyselný rozvoj a zanedbávanie environmentálnej politiky na podnikovej, štátnej i medzinárodnej úrovni v minulom storočí spôsobili kontamináciu životného prostredia ťažkými kovmi.

Účinky vyšších dávok gama žiarenia popísali mnohí autori, ako na stavovcoch (Beňová a kol., 2003; Falis a kol., 2004; Beňová a kol., 2006), tak aj na bezstavovcoch *Artemia salina* (Dvořák a Beňová, 2002). Naproti tomu, nízke dávky ionizujúceho žiarenia môžu mať aj pozitívne účinky (tzv. radiačná hormézia).

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 azoxystrobinu v koncentrácii 0,1 mg.l⁻¹, roztok glyfosatu v koncentrácii 500 mg.l⁻¹ a roztok heptahydrátu sulfidu zinočnatého v koncentrácii 100 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 10 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 550 jedincov. Petriho misky boli po predchádzajúcej dezinfekcii termostatu (Kočišová, 2005) umiestnené pri teplote 20 ± 1 °C.

Tabuľka 1: Pokusné objekty boli rozdelené do 11 skupín následovne.

Rozdelenie pokusných skupín	Koncentrácia azoxystrobinu (mg.l ⁻¹)	Koncentrácia glyfosatu (mg.l ⁻¹)	Koncentrácia ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg.l ⁻¹)	Dávka ionizujúceho žiarenia (Gy)
K	0	0	0	0
AZn	0,1	0	100	0
AZn20Gy	0,1	0	100	20
AZn30Gy	0,1	0	100	30
AZn40Gy	0,1	0	100	40
AZn50Gy	0,1	0	100	50
GZn	0	500	100	0
GZn20Gy	0	500	100	20
GZn30Gy	0	500	100	30
GZn40Gy	0	500	100	40
GZn50Gy	0	500	100	50

V časovom intervale 24, 48, 72 a 96 hod. sme vykonali odčítanie živých artémií. Výsledky sme porovnali oproti kontrolnej skupine a štatisticky vyhodnotili. Na vylúčenie odľahlých hodnôt sme použili Deanov-Dixonov test (Dvořák, 1995). Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme testovali pomocou signifikantných rozdielov preukázateľnosti (Wayland a Hayes, 1991).

Výsledky a diskusia

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	6	5	4,3
AZn	0	5	0	0	5	0	6	5	8,6	48*	5	12,9
AZn20Gy	10	5	8,6	16*	5	8,6	26*	5	12,9	36*	5	4,3
AZn30Gy	14*	5	12,9	16*	5	12,9	18*	5	8,6	18*	5	8,6
AZn40Gy	32*	5	12,9	34*	5	17,2	34*	5	17,2	40*	5	8,6
AZn50Gy	2	5	4,3	4	5	4,3	4	5	4,3	20*	5	8,6
GZn	0	5	0	0	5	0	0	5	4,3	34*	5	12,9
GZn20Gy	0	5	0	0	5	0	0	5	0	24*	5	12,9
GZn30Gy	0	5	0	0	5	0	2	5	4,3	20*	5	8,6
GZn40Gy	0	5	0	4	5	4,3	4	5	4,3	28*	5	12,9
GZn50Gy	0	5	0	2	5	4,3	4	5	8,6	8	5	4,3

□ = 0,05

x - priemerná letalita v %

n - počet testovaných skupín

s - smerodajná odchýlka

* - štatistická významnosť preukázaná v porovnaní s kontrolnou skupinou

V kontrolnej skupine sme pozorovali maximálnu letalitu *Artemia franciscana* na úrovni 6%, a to po 96 hodinách. Po 24 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality v skupinách s azoxystrobinom, zinkom a žiarením s dávkou 30 (AZn30Gy) a 40 (AZn40Gy) Gy oproti kontrolnej skupine. Po 48 a 72 hodinách

expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenia letality v skupinách s azoxystrobinom a zinkom po ožiarení dávkami 20 (AZn20Gy), 30 (AZn30Gy) a 40 Gy (AZn40Gy) oproti kontrolnej skupine. Po 96 hodinách expozície sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality oproti kontrolnej skupine vo všetkých pokusných skupinách, s výnimkou skupiny vystavenej pôsobeniu glyfosatu, zinku a žiareniu s dávkou 50 Gy (GZn50Gy).

Pri porovnaní štatisticky významných zmien letality sme pozorovali signifikantné zníženie v skupine AZn50Gy vo všetkých časových intervaloch v porovnaní so skupinami AZn20Gy a AZn40Gy. V 96. hodine dokonca došlo k signifikantnému poklesu letality v skupinách vystavených azoxystrobinu, zinku a žiareniu s dávkami 30 a 50 Gy v porovnaní so skupinou vystavenou azoxystrobinu a zinku bez žiarenia, ale tiež v porovnaní so skupinami AZn20Gy a AZn40Gy. Došlo teda k prejavu radiačnej hormézie, resp. došlo k spochybneniu lineárnej bezprahovej teórie biologických účinkov ionizujúceho žiarenia (Luckey, 1997). Tieto výsledky mohli byť dosiahnuté tým, že pri 20, 30 a 40 Gy dochádzalo k sumácii negatívnych účinkov faktorov, ktorým boli pokusné organizmy vystavené. Naproti tomu v prípade žiarenia na úrovni 50 Gy sa prejavil účinok radiačnej hormézie, ako uvádzajú mnohí autori v epidemiologických štúdiách, ktoré podporujú predstavu, že nízke dávky prospievajú zdraviu (Cohen, 1995; Luckey, 1997; Pollycove, 1997). Obdobné štatisticky významné zníženie letality sme pozorovali aj v skupinách vystavených glyfosatu, zinku a žiareniu s dávkami 30 a 50 Gy v porovnaní so skupinou vystavenej pesticídu a zinku bez žiarenia. V prípade skupiny GZn50Gy bol pozorovaný v 96. hodine signifikantný pokles letality v porovnaní so všetkými pokusnými skupinami vystavenými glyfosatu, zinku a prípadne aj žiareniu. Porovnateľné 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. Veľkosť dávok v desiatkach Gy je nutné dať do súvislosti s fylogenetickým zaradením bezstavovcov, kôrovcov rodu *Artemia*. Najčastejšie je ako podstata hormézie uvádzaná aktivácia a stimulácia adaptatívnych a reparačných dejov a imunitných mechanizmov nízkymi dávkami ionizujúceho žiarenia, čo potom vedie ku zvýšenej obranyschopnosti organizmu (Luckey, 1991).

PodĎakovanie

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., Cigánková, V., Falis, M., et al., 2006: Acta Vet. Brno, 75, p. 557
 Beňová, K., Dvořák, P., Falis, M., et al., 2007: Acta Vet. Brno 76, p. 35
 Beňová, K., Toropila, M., Falis, M., et al., 2003: Acta Vet. Brno 72, p. 201
 Cohen, B., L., 1995: Health Phys. 68, p. 157
 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 1995, p. 25
 Dvořák, P., Beňová, K., 2002: Folia Veterinaria, 46(4), p. 195
 Dvořák, P., Šucman, E., Beňová, K., 2005: Biologia 60(5), p. 593
 Falis, M., Beňová, K., Toropila, M., et al., 2004: Bull. Vet. Inst. Pulawy 48, p. 503
 Hostovský, M., Bláhová, J., Kopřiva, V., et al., 2012: Interdisciplinary Toxicology 5(1), p. 35

Kočíšová, A., 2005: Dezinfekce, Dezinsekce, Deratizace 14(4), p. 149

Luckey, T., D., 1997: Ionizing radiation decreases human cancer mortality rates. Proceedings of International Conference on Low Doses of Ionizing Radiation, Seville, Spain, 17-21 November 1997, p. 227

Luckey, T., D., 1991: Radiation Hormesis. CRC Press, Boca Raton, p. 306

The e-Pesticide manual, 2000 – 2001: Twelfth edition. Version 2,0

Pollycove, M., 1997: Nuclear News 40(7), p. 34

Wayland, J., Hayes, Jr., 1991: Dosage and Other Factors Influencing Toxicity. In Handbook of Pesticide Toxicology. Volum 1. General Principles. Academic Press, p. 39

Kontaktná adresa: Michaela Špalková, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, SR, spalkova@uvm.sk

Influence of vaccine preservative thiomersal on total mercury content in the hair of dogs before and after vaccination

**Sedláčková Lenka, Král Tomáš, Ševčíková Marie, Kružíková Kamila,
Svobodová Zdeňka**

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

Summary

The aim of this study was to determine if there is any increase in the content of total mercury in hair of dogs after vaccination with vaccines containing thiomersal preservative. In total, 32 dogs were included in the experiment itself. Hair sampling was performed on days 0, 10, 15, 20 and 25. The content of total mercury in vaccines and hair was determined using AMA 254. The results show that vaccines do not increase total mercury content in hair of dogs. Total mercury content in vaccines corresponded with the declared quantity. Consumption of feed with fish increases mercury content in hair of dogs because fish contain the most toxic form of mercury, namely methylmercury.

Keywords: *preservative; hair; ethylmercury; vaccination*

Introduction

Mercury is a metallic element that occurs naturally in the environment. Mercury exists in three forms: elemental mercury, inorganic mercury compounds, and organic mercury compounds (WHO, 2004). Thiomersal (thimerosal, merthiolat) has been used as a preservative in vaccines since the 1930s because it is very effective in killing bacteria in vaccines and in preventing bacterial contamination (Ball et al., 2001). Thiomersal contains ethylmercury (Barregard et al., 2011) that was widely used in multidose vaccine vials (Pichichero et al., 2008; Folb et al., 2004). On July 7, 1999, the American Academy of Pediatrics and the US Public Health Service issued a joint statement calling for removal of thiomersal, a mercury-containing preservative, from vaccines. This action was prompted in part by a risk assessment from the Food and Drug Administration that is presented here (Ball et al., 2001). Methylmercury has been used as a reference for ethylmercury toxicity (Barrett, 2005). The toxicity of low doses exposure to ethylmercury is similar to the toxicity of methylmercury. Chronic, low-dose methylmercury exposure may cause subtle neurologic abnormalities. High-dose exposure to thiomersal includes neurotoxicity and nephrotoxicity (Ball et al, 2001). The neurotoxicity of methylmercury is higher than that of ethylmercury (Magos L, 2003). Although both have been proved to accumulate in brain.

The aim of this study was to assess total mercury (THg) levels in the hair of dogs before and after application of vaccine with preservative agent thiomersal.

Material and Methods

Sample collection

A total of 32 hair samples was collected from dogs. Each sample was accompanied with a questionnaire including data on age, gender, vaccinations. An important criterion was the consumption of fish or granules with presence of fish because fish are the primary source of methylmercury intake.

Experiment

The experiment was performed on days 0, 10, 15, 20 and 25. Day 0 was the day before vaccination and next samples were collected after vaccination (day 10, 15, 20 and 25).

In our experiment we have included dogs which were vaccinated with vaccine containing thiomersal preservative. Thiomersal was used in vaccines against rabies, leptospires, tetanus, parvovirus and also in combined vaccines. The majority of dogs in our experiment was vaccinated against rabies.

Determination of total mercury (THg)

Hair samples collected from dogs were located in the area of front leg. These samples were cut into small slivers (2–5 mm) and then washed according to the standard method. Hairs were washed in acetone, three times in water and once more in acetone; then samples were dried overnight.

For the mercury analysis, we used about 5–10 mg of the hair and 100µl of properly diluted vaccine. Total mercury content in hair and vaccines was determined by the direct method of cold vapours using AMA 245 (Altec Ltd., Czech Republic).

For statistical evaluation, we used the Wilcoxon test. This test is used for the evaluation of paired experiments, when the monitored parameter does not correspond to the Gaussian normal distribution.

Results

From the results in Table 1, it is clear that the total mercury content in the hair of vaccinated dogs ranged from 0.0014 to 0.5596 mg.kg⁻¹. The highest median was 0.0325mg.kg⁻¹ on the day 10 (30 dogs were analysed). The lowest median was 0.0229 mg.kg⁻¹ on day 25 (28 dogs were analysed in this group). In this table, dogs, which ate fresh fish and granule with fish meals, are included.

Table 1: Values of total mercury (THg) in dog's hair.

Time (day)	N	Median of THg (min - max) mg.kg ⁻¹	Median of differences from day 0	p (Wilcoxon test)
0	32	0.0321 (0.0026; 0.3893)		
10	30	0.0325 (0.0023; 0.5221)	0.0001	0.861
15	31	0.0290 (0.0015; 0.5062)	0.0007	0.309
20	29	0.0322 (0.0017; 0.5596)	-0.0007	0.689
25	28	0.0229 (0.0014; 0.5532)	0.0006	0.425

It is clear that thimerosal, which contains ethylmercury, does not increase the total mercury content ($p > 0.05$). Total mercury content in vaccines corresponded with the declared quantity. In the table 2 we show mercury values in three dogs which regularly ate fresh fish or granules containing fish meal. The table 2 shows higher levels of total mercury in the dog which ate rather fresh fish than granules. Content of total mercury ranged from 0.0751 to 0.5532 mg.kg⁻¹.

Table 2: Values of THg in the hair of dogs that ate fish.

Dogs	Days (content of THg mg.kg ⁻¹)					Note
	0	10	15	20	25	
1	0.3893	0.5221	0.5062	0.5596	0.5532	Fresh fish
2	0.3175	0.4152	0.4653	0.4483	0.4226	Fresh fish
3	0.1139	0.0751	0.1071	0.0961	0.1285	Granules with fish meals

Discussion

Values of total mercury content in the hair of dogs show that thimerosal does not influence the content of total mercury in the hair of dogs. Hair may be a valuable exposure index for thimerosal as well as for methylmercury (Clarkson, 2002). The content of total mercury in dog's hair is dependent on consumption of fish which contain the most toxic form of mercury - methylmercury. These data correspond with the values of mercury in the hair of children, since increased levels of mercury were observed in children who ate fish (Kružíková et al., 2008).

Conclusions

The results prove that vaccines do not increase total mercury content in hair of dogs. Consumption of feed with fish increases mercury content in hair of dogs because fish contain the most toxic form of mercury, namely methylmercury.

Acknowledgments

This work was supported by the Internal Grant Agency of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno 7/2012/FVHE.

Contact address: Lenka Sedláčková, Mgr., Department of Veterinary Public Health and Toxicology, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10023@vfu.cz

Assessment of pollution of selected rivers in the Czech Republic using chemical and biochemical markers in brown trout

Zelníčková Lenka, Blahová Jana, Maršálek Petr, Modrá Helena,
Svobodová Zdeňka

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

Summary

*The aim of the presented study was to investigate levels of the most important chemical and biochemical markers: persistent organic pollutants hexachlorocyclohexan (HCH), hexachlorobenzene (HCB), DDT and its metabolites and polychlorinated biphenyls in fish muscle, vitellogenin in plasma and detoxifying enzymes in liver tissue of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) from selected rivers of Czech Republic. The results presented in our study indicate the highest contamination in Černý potok stream, especially at the location upstream Bruntál, where intensive industrial and agricultural activities as well as domestic waste and sewage are most probably main impact sources responsible for the enhanced levels of pollutants and some biochemical markers in fish.*

Keywords: *environmental analysis; organochlorine pesticides; polychlorinated biphenyls; vitellogenin; detoxifying enzymes; WWTP*

Introduction

A major source of pollution of the aquatic environment is waste water (sewage, industrial waste water). Waste water contains many constituents and impurities which originate from urban communities, industrial and agricultural activities. These are inorganic and organic chemical compounds which may be dangerous to living organisms due to their toxicity and bioaccumulation potential effect (Van der Oost et al., 2003).

An important biomarker is vitellogenin (VTG), a female specific protein and egg yolk precursor, which is used for detection of fish exposure to estrogenic environmental endocrine disruptor.

Material and Methods

Assessment of contamination of the aquatic environment has been realized at three selected localities on small streams in the Czech Republic (Libotýňský potok, Černý potok, Moravice). The location studied in south Bohemia was Libotýňský potok stream, upstream and downstream WWTP (waste water treatment plant) of Vlachovo Březí. Two localities were selected in north Moravia: Černý potok stream, upstream and downstream WWTP of Bruntál and River Moravice, upstream and downstream WWTP of Břidličná.

Brown trout (*Salmo trutta m. fario*) was selected as the most suitable indicator species. At 6 locations, a total of 58 adult male brown trouts were captured by electrofishing for the determination of selected biomarkers and content of pollutants in muscle. After capture, blood samples were collected from the heart and/or caudal vein into heparinized tubes, stored at 4° C and transported to the laboratory where they were centrifuged (800 rcf for 10 min) to determine a content of VTG. Fish were killed,

weighted and dissected. The vitellogenin concentration was measured using a carp VTG Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kit.

The activity of EROD in liver samples was measured by spectrofluorometry and activity of GST was determined by measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzen with reduced glutathione.

Levels of selected POPs were determined in muscle samples and the measurement of PCB, DDT, HCH, HCB was conducted using gas chromatography with ion trap tandem mass spectrometry (GC/MS). Mercury concentrations in muscle were determined by the direct method of cold vapor atomic absorption spectrometry on an Advanced Mercury Analyzer 254.

Statistical analysis was performed using Unistat 5.1.

Results

Detected values of selected pollutants (PCB congeners (28, 101, 118, 138, 153 a 180), HCH (isomers α HCH, β HCH, δ HCH and γ HCH), HCB, organochlorine pesticides (metabolites o,p DDT, o,p DDE, o,p DDD, p,p DDT, p,p DDE a p,p DDD) and Hg) in fish muscle are shown in Table 1. The obtained results show that the highest levels of all pollutants were detected in Bruntál – Černý potok stream, especially upstream WWTP. In most sites, PCB 28 and 153 were evaluated as dominant PCB congeners. In the analysis of HCH isomers, isomers of β and δ were detected as dominant.

Table 1: Average content of pollutants in fish muscle at the monitored locations (PCB – sum of congeners; DDT and its metabolites; HCH – sum of isomers α , β , δ , γ ; Hg).

	Σ PCB [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Σ DDT [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Σ HCB [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Σ HCH [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Hg [mg/kg]
Libotýňský potok (upstream)	7,29	30,53	0,21	0,35	0,08
Libotýňský potok (downstream)	7,01	31,15	0,13	0,05	0,08
Černý potok (upstream)	57,36	107,70	2,33	2,59	0,14
Černý potok (downstream)	20,30	32,94	0,85	0,72	0,10
Moravice (upstream)	22,24	69,89	1,12	1,72	0,07
Moravice (downstream)	7,65	14,47	0,86	0,20	0,07

In the analysis of DDT, p,p DDE exhibited the highest concentration of all monitored metabolites at all locations (Table 2).

Table 2: Presence of DDT in brown trout muscle.

	p,p DDT [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	p,p DDE [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	p,p DDD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	o,p DDT [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	o,p DDE [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	o,p DDD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
all sampling sites	41,05	193,03	25,33	21,32	0,13	2,98

A total of 58 plasma samples of brown trout (males only) was analyzed and VTG was not detected in all samples. The results are shown in Table 3. The positive results of VTG were confirmed in 19 samples (32% of analyzed samples). The highest values and highest incidence were confirmed downstream Vlachovo březí – Libotýňský potok stream and in Bruntál – Černý potok stream. The lowest content of VTG and also the smallest percentage of positive samples were detected in Břidličná – River Moravice.

Significant differences ($p < 0.05$) in GST and EROD activity are shown in Table 3.

Table 3: Vitellogenin concentrations in plasma and activities of detoxifying enzymes in liver of brown trout in individual sampling sites. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by alphabetic superscript.

	The range of detected VTG concentrations [ng/ml] (n samples/positive samples)	X ± SEM EROD [pmol/mg/min]	X ± SEM GST [nmol/min/mg]
Libotýňský potok (upstream)	584,1 – 1520,6 ^{*a} [10/2]	46,2 ± 8,6 ^{*a}	915,0 ± 47,3 ^{*b}
Libotýňský potok (downstream)	5,4 – 2978,1 ^{*a} [7/5]	155,5 ± 20,2 ^{*bcd}	1173,4 ± 56,8 ^{*c}
Černý potok (upstream)	362,4 – 2882,9 ^{*a} [8/4]	77,5 ± 11,9 ^{*ac}	1025,2 ± 46,8 ^{*cb}
Černý potok (downstream)	2,8 – 2304,4 ^{*a} [12/5]	106,8 ± 36,2 ^{*ad}	624,8 ± 39,1 ^{*a}
Moravice (upstream)	69,1 – 449,4 ^{*a} [10/2]	235,7 ± 47, ^{3*b}	1159,5 ± 108,6 ^{*cb}
Moravice (downstream)	10,2 ^{*a} [11/1]	209,5 ± 30,0 ^{*bcd}	931,4 ± 50,1 ^{*cb}

Acknowledgements

This study was supported by IGA 04/2012/FVHE.

References

Available at author.

Contact address: Lenka Zelníčková, Ing., 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, H10026@vfu.cz

Vliv koexpozice patogenního činitele a cyanobakterií na koncentraci microcystinů v hepatopankreatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.)
The influence of pathogenic agent and cyanobacteria co-exposition on concentration of microcystins in the hepatopancreas of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

¹Soukupová Zdeňka, ²Adamovský Ondřej, ³Mareš Jan, ³Kopp Radovan,
¹Palíková Miroslava

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

²Research centre for toxic compounds in the environment (RECETOX), Masaryk University, Brno

³ Department of Fishery and Hydrobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno

Summary

Fish can be affected by multiple stressors in the environment and while mostly single agents in sub-lethal doses do not involve visible changes or mortality, their co-exposition does. The aim of this study was to test the hypothesis that influence of cyanobacterial biomass and infection agent, represented by the virus of spring viraemia of carp, can combine and influence the accumulation of microcystins in the hepatopancreas. The addition of cyanobacteria manifested by accumulation of microcystins in hepatopancreas of fish. Higher concentrations were found in groups exposed only to cyanobacteria without co-exposition with the virus.

Keywords: cyanobacteria; *Cyprinus carpio*; spring viraemia of carp; hepatopancreas; microcystin

Úvod

Sinice neboli cyanobakterie se řadí mezi prokaryotní organismy (Maršálek, 2004). Cyanobakterie působí zejména negativně, a to především prostřednictvím tvorby tzv. vodního květu, který znesnadňuje technické, rybářské a vodohospodářské využití postižených nádrží (Kalina, 1998). Kromě výše zmíněných negativních vlastností sinice do svého okolí uvolňují tzv. biologicky aktivní látky, kterými mohou ovlivňovat růst a vývoj ostatních vodních organismů, sebe navzájem, i fyzikální, biologické a chemické vlastnosti vody (Maršálek, 2004). Nejrozšířenější, a ve sladkých vodách nejčastěji nalézanou, skupinou cyanotoxinů jsou microcystiny (Kopp et al., 2010). Nejběžnějšími známými strukturálními variantami microcystinů jsou MC-LR, -RR, -YR, -LF (Sivonen et Jones, 1999). Byly prokázány případy bioakumulace toxinů a také jejich přenos v potravních řetězcích (Magalhaes et al., 2003). Někteří autoři uvádějí poměrně vysoké koncentrace microcystinů ve tkáních ryb (Xie et al., 2005). Primárně jsou postiženy jaterní buňky, které aktivně přijímají microcystiny z krevního oběhu prostřednictvím transportního systému pro žlučové kyseliny (Eriksson et al., 1990).

Jarní virémie kaprů je velmi závažné akutní virové onemocnění, postihující zejména kaprovité ryby v intenzivních chovech (Pokorný et al. 2004). Onemocnění se vyskytuje ve všech evropských státech s chovem kaprů.

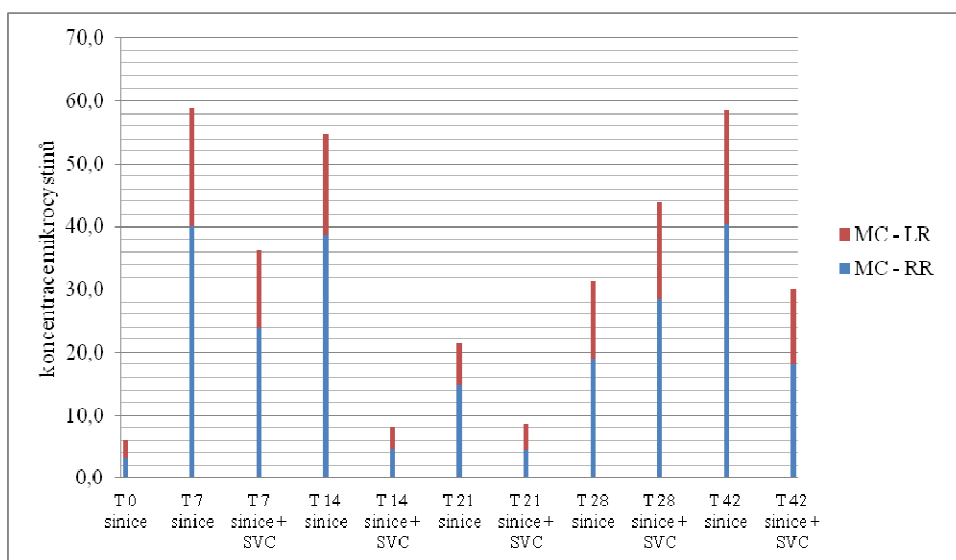
V přirozeném prostředí mohou být živočichové včetně ryb vystaveny působení mnoha patogenních činitelů, jež samotné v subletálních dávkách nemusí způsobovat viditelné změny. Tyto změny se však mohou projevit, dojde-li k jejich vzájemnému spolupůsobení. Cílem této studie bylo ověření hypotézy, že spolupůsobení cyanobakterií a infekčního činitele (jarní virémie) může vedle prohloubení zdravotních problémů

rovněž ovlivnit akumulaci mikrocystinů a jejich konjugátů v hepatopankreatu kapra obecného.

Materiál a metodika

Jako výchozí biologický materiál byl použit kapr obecný – forma lysec. Odchov probíhal na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Poté byla násada kaprů v počtu 200 kusů převezena na Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí VFU Brno. Od 18. 4. 2011 do 1. 5. 2011 probíhala přípravná fáze ryb na pokus a jejich aklimatizace. Ryby byly rozděleny po 50 kusech do čtyř nádrží (skupinově značené ryby). Každá z těchto nádrží má vlastní recirkulační zařízení. Ve dvou nádržích byl rybám individuálně aplikován virus SVC, v druhých dvou nádržích bylo rybám aplikováno placebo (injekční voda). V jedné nádrži kontrolní a v jedné s aplikací SVC byly ryby krmeny granulátem s přídatkem 3% sinic. Ve druhých dvou nádržích byly krmeny komerčním krmivem bez přídatku sinic. Aplikace viru a placebo proběhla v čase T 0. V době T (-7), tedy sedm dní před začátkem pokusu, se ryby začaly krmit sinicemi. V časových úsecích T 0, T 7, T 14, T 21, T 28, T 42 probíhalo odebrání vzorků. Koncentrace mikrocystinů (MC – LR a MC – RR) byla stanovována v hepatopankreatu pomocí kapalinové chromatografie s dvojitou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS), (Kohoutek et al., 2010). Ke statistickému porovnávání dat (sumárních koncentrací mikrocystinů) byl použit program Statistica for Windows® 7.0 (ANOVA a LSD test).

Výsledky a diskuze



Graf 1: Koncentrace mikrocystinů v hepatopankreatu ryb (MC – LR, MC – RR a suma mikrocystinů) v ng.g⁻¹ sušiny.

Z výsledků prezentovaných v grafu č. 1 je patrné, že ve všech skupinách ryb krměných krmivem s přídatkem sinic byly detekovány určité koncentrace mikrocystinů. Nárůst koncentrace mikrocystinů ve skupinách T 7 a T 42 exponovaných pouze sinicím byl statisticky signifikantní na hladině průkaznosti $p \leq 0,01$ a u skupiny T 14 exponované pouze sinicím na hladině průkaznosti $p \leq 0,05$ oproti T0.

Z grafu je dále patrné, že ko-exponované skupiny spolu s jarní virémií mají, až na výjimku v T 28, nižší hladiny MCs v hepatopankreatu. Tyto hodnoty však nejsou statisticky významné. Tento zajímavý výsledek lze vysvětlit větší stimulací/aktivací imunitního systému nebo detoxifikačního systému a s tím spojenou rychlejší eliminací mikrocystinů. Podobnou problematikou se zabývali Pikula et. al (2010) u křepelek, které vystavovali kombinované expozici cyanobakterií, olova a viru Newcastleovy choroby. Skupiny exponované kombinací cyanobakterií a olova a kombinací všech tří agens vykazovaly vyšší koncentrace mikrocystinů v játrech křepelek, naopak skupina exponovaná kombinací cyanobakterií a viru vykazovala nižší koncentrace mikrocystinů oproti skupině vystavené pouze cyanobakteriím. Ani tyto změny však nebyly signifikantně průkazné.

Závěr

Závěrem lze říci, že přídavek cyanobakterií v krmivu kapra se projevil jeho kumulací v hepatopankreatu. Koncentrace mikrocystinů se vyznačovaly poměrně vysokou variabilitou, pohybovaly se většinou v desítkách ng.g^{-1} sušiny. Vyšší koncentrace byly zaznamenány většinou u skupin bez spolupůsobení virového agens, tj. vystavených pouze cyanobakteriím.

Poděkování

Předložená práce vznikla díky finanční podpoře Výzkumného záměru MSM 62 15712402.

Literatura

- ERIKSSON, J. E., GRÖNBERG, L., NYGLRD, S., SLOTTE, J. P., MERILUOTO, J. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, n. 1025, p. 60-66.
- KALINA, T. *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha: Karolinum, Univerzita Karlova, 1998.
- KOHOUTEK, J., ADAMOVSÝ, O., ORAVEC, M., ŠIMEK, Z., PALÍKOVÁ, M., KOPP, R., BLÁHA, L. LC-MS analyses of microcystins in fish tissues overestimate toxin levels-critical comparison with LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 2010, vol. 398, p. 1231–1237.
- KOPP, R. et al. Experimentální *in vivo* studie vlivu toxických sinic na laboratorní potkany. *Cyanobakterie 2010 – Sborník semináře*: 136-141, 2010.
- MAGALHAES, V. F., MARINHO, M. M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA, A. C., COSTA, S.M., AZEVEDO, L. O., AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 2003, vol. 42, n. 3, p. 289-295.
- MARŠÁLEK, B. *Místo úvodu - sinice či cyanobakterie*. *Cyanobakterie - biologie, toxikologie a možnosti nápravných opatření*. Sborník konference: 5-7, 2004.
- PIKULA, J., BANDOUCHOVA, H., HILSCEROVA, K., PASKOVA, V., SEDLACKOVA, J., ADAMOVSÝ, 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. *Sci Total Env*, 2010, vol. 408, p. 4984–4992.
- POKORNÝ, J. et al. *Velký encyklopedický rybářský slovník*. 1. vyd. Plzeň: Fraus, 2004. s. 137 – 138. ISBN 80-7238-117-2.
- SIVONEN, K., JONES, G. Cyanobacterial toxins. *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to public Health Significance, Monitoring and management*, 1999, p. 41-111.
- XIE, L. Q., XIE, P., GUO, L.G., LI, L., MIYABARA, Y., PARK, H. D. *Environmental Toxicology*, 2005, vol. 20, p. 293-300.

Kontaktní adresa: Zdeňka Soukupová, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, soukupova.zdenka@centrum.cz.

Effect of subchronic exposure to copper oxychloride on oxidative stress biomarkers in liver of common carp

¹Ševčíková Marie, ¹Modrá Helena, ¹Blahová Jana, ¹Plhalová Lucie, ²Kizek René, ¹Svobodová Zdeňka

¹Faculty of Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

² Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno

Summary

The objective of this study was to evaluate subchronic effect of copper oxychloride on parameters of oxidative stress in liver of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish were exposed to sublethal concentrations (40.0 and 80.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) of commercial formulation Kuprikol 50 (84 % copper oxychloride) for 28 days. Selected biomarkers of oxidative stress (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, reduced/oxidised glutathion ratio, metallothioneins and lipid peroxidation) and detoxifying enzyme (glutathione-S-transferase) were determined to evaluate oxidative stress in fish liver. Statistically significant differences ($p \leq 0.01$) were found in glutathione-S-transferase activity. Lipid peroxidation was demonstrated in samples of 80.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ treated fish. Other analysed parameters were not affected. The results suggest that copper oxychloride is able to cost oxidative damage, however the enzymatic biomarkers of oxidative stress can be regulated during subchronic exposure.

Keywords: pesticides; metals; fish; lipid peroxidation, glutathione-S-transferase

Introduction

Copper oxychloride is active substance in commonly used fungicides and may be a source of water contamination by copper. Kuprikol 50 (84 % copper oxychloride, 50 % copper) is a fungicide formulation used to protect plants, especially grapevine against fungal disease. Kuprikol 50 is applied in the form of spray and thus easily gets into aquatic environment.

Copper is considered to be very toxic to aquatic organisms and its toxicity can be influenced by many factors, especially water chemical and physical characteristics (Carvalho and Fernandes, 2006). The toxicity of copper can be explained through its participation in increased production of reactive oxygen species through the Fenton reaction (Sevcikova et al., 2011).

The aim of our study was to evaluate the impact of copper oxychloride exposure on parameters of oxidative stress in liver of common carp (*Cyprinus carpio*).

Materials and Methods

The juvenile common carps (130±15 g) were obtained from a commercial fish farm. They were randomly distributed into six 200L glass aquaria, 12 specimens per each. The fish were supplied twice a day with commercial feed at a total rate of 1.5 % body weight. After 2 week acclimation to laboratory conditions, the fish were exposed to commercial formulation Kuprikol 50 (40.0 and 80.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) for 28 days. Each treated and control group was performed in duplicate. The test was conducted in a flow-through system. The volume of test solutions was exchanged twice a day. The control groups were subjected to dechlorinated tap water. The fish were sacrificed at the end of the test

and the liver (hepatopankreas) were dissected. The liver samples were stored at $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analyses were performed.

The total catalytic concentrations of GST (glutathione-*S*-transferase), GR (glutathione reductase), GPx (glutathione peroxidase), CAT (catalase) and lipid peroxidation (TBARS method) were determined spectrophotometrically. High performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) was used to determine GSH (reduced glutathione) and GSSG (oxidised glutathione) concentration. Metallothionein (MT) content was determined by the differential pulse voltammetry Brdicka reaction. Copper content in water was measured by atomic absorption spectrometry.

Statistical analysis of the data was performed using the program Unistat 5.6.

Results

Results of detoxifying enzyme and oxidative stress parameters are given in Table 1. Decreased GST activity was found in the concentration $80.0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0.01$) when compared to the control group and the concentration $40.0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Level of lipid peroxidation increased with tested concentrations with statistically significantly ($p < 0.01$) higher level in the concentration $80.0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ when compare to the control group. We have not found statistically significant differences in other tested parameters (GPx, GR, GSH/GSSG CAT and MT).

Table 1: Results of detoxifying enzyme and oxidative stress parameters.

Conc. of Kuprikol 50	GR	GPx	GSH/GSSG	CAT	MT	GST	TBARS
0	6.74 ± 1.20	318.59 ± 52.92	4.50 ± 2.88	277.34 ± 63.22	547.29 ± 83.54	97.69 ± 6.66 ^a	10.15 ± 1.79 ^a
40	7.13 ± 1.53	378.44 ± 56.34	3.71 ± 1.18	251.97 ± 45.41	572.34 ± 74.13	106.98 ± 11.91 ^a	12.10 ± 2.55 ^{a,b}
80	6.23 ± 0.86	372.15 ± 68.05	2.68 ± 1.08	236.98 ± 42.85	570.21 ± 56.94	83.56 ± 11.22 ^b	15.22 ± 5.74 ^b

Different letters indicate a significant differences ($p \leq 0.01$) Values are given as mean ± SE; Kuprikol 50 ($\mu\text{g L}^{-1}$); GR - glutathione reductase (nmol NADPH/min/mg of protein); GPx - glutathione peroxidase (nmol NADPH/min/mg of protein); GSH/GSSG – reduced/oxidised glutathione ratio; CAT – catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ of protein); MT – metallothioneins ($\mu\text{g/mg}$ of protein); GST – glutathione-*S*-transferase (nmol/min/mg of protein); TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances (nmol/g of w/w).

Discussion

The activation of antioxidant defence, both enzymatic and non-enzymatic, was found in several studies focused on fish exposed to copper (Gravato et al., 2006; Jena et al., 2009; Eyckmans et al., 2011). However, no response of enzymatic antioxidant defence was observed in our study. Sanchez et al. (2005) described rapid and transient increase of antioxidant enzymes and a depletion of glutathione content during the first 8 days of exposure to copper in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). The transient

manner of response suggests the occurrence of adaptive processes (Sanchez et al., 2005). The oxidative damage to lipids increased with Cu concentrations in our study suggesting that adaptive process was not effective. The lipid peroxidation increased with Cu concentration was also described by Jena et al. (2009). Glutathion-S-transferase can take a role in protection against lipid peroxidation (Yang et al., 2001). At higher concentration of Kuprikol 50 ($80.0 \mu\text{g L}^{-1}$) we observed a decreased GST activity, which suggests exhaustion and collapse of the enzymatic systems of the tested fish.

Conclusion

Low concentration of copper oxychloride, as an effective substance in fungicide formulation Kuprikol 50, is able to cause oxidative damage in fish. Antioxidant defence against copper toxicity is complex process. Therefore further research is necessary to elucidate involvement of individual antioxidant defence components in fish.

Acknowledgement

This research was supported by IGA VFU 22/2013/FVHE.

References

- CARVALHO, C.S.; FERNANDES M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*. 2006, vol. 251, no. 1, p. 109–117.
- EYCKMANS, M. et al. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology*. 2011, vol. 103, no. 1-2, p. 112–120.
- GRAVATO, C. et al. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. *Chemosphere*. 2006, vol. 65, no. 10, p. 1821–1830.
- JENA, S.D. et al. Non-enzymatic antioxidant status and modulation of lipid peroxidation in the muscles of *Labeo rohita* by sub lethal exposure of CuSO_4 . *Veterinary Research Communications*, 2009, vol. 33, no. 5, p. 421–429.
- SANCHEZ, W. et al. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005, vol. 19, no. 1, p.177–183.
- SEVCIKOVA, M. et al. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina*. 2011, vol. 56, no. 11, p. 537–546.
- YANG, Y. et al. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation - Overexpression of hgsta2-2 in k562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *Journal of biological chemistry*. 2001, vol. 276, no. 22, p. 19220-19230.

Contact address: Marie Ševčíková, DVM, Department of Veterinary Public Health and Toxicology, FVHE VFU Brno, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, sevcikovam@vfu.cz

Hodnocení toxicity ibuprofenu pro *Danio rerio* se zaměřením na vybrané biomarkery oxidativního stresu

Evaluation of ibuprofen toxicity for *Danio rerio*, targeting on selected biomarkers of oxidative stress

¹Bartošková Marta, ¹Dobšíková Radka, ²Bartoš Milan, ³Lesiuková Veronika

¹Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno

²Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, VFU Brno

³Student, Fakulta veterinárního lékařství, VFU Brno

Summary

The aim of the study was to determine the effect of ibuprofen toxicity for model organism zebra fish (*Danio rerio*). The test was performed according to OECD method No.215. Fish were exposed to 5 different concentrations of the test substance (0.0001 mg/l, 0.1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l, and 30 mg/l). At the end of the test fish were killed, frozen at - 86 °C and then used for the determination of selected markers of oxidative stress. The results show that ibuprofen does not affect the activity of glutathione reductase (GR). A statistically significant increase in the activity of glutathione peroxidase (GPx) was found, which was proved dose-dependent (10.58 nmol NADPH/min/mg protein in the control and 20.53, 26.36, 26.89, and 45.87 nmol NADPH/min/mg protein in the concentrations tested). An increased activity of glutathione-S-transferase (GST) (61.67 nmol NADPH/min/mg protein) in the highest concentration of ibuprofen (30 mg/l) was found. Malondialdehyde levels (MDA) were found significantly decreased from control in the concentrations of 0.0001 and 10 mg/l, but no dose-dependence was found.

Keywords: pharmaceuticals; fish; oxidative stress

Úvod

Léčiva jsou kontaminanty životního prostředí, používané v humánní a veterinární medicíně k preventivním, terapeutickým a diagnostickým účelům. Primárním zdrojem léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti, resp. nemocnice a subjekty veterinární péče. Léčiva jsou z organismu vylučována buď v původní formě, nebo ve formě metabolitů. Prostřednictvím splaškových odpadních vod jsou transportována do čistíren odpadních vod (Kotýza a kol., 2009), kde mohou být inaktivována. Přesto do životního prostředí (především do vodního prostředí) vstupuje řada farmak.

Ibuprofen patří mezi nesteroidní antiflogistika (NSAIDs), což je jedna z nejčastěji indikovaných skupin léčiv. NSAIDs se běžně používají k léčbě zánětu, bolesti, ke zmírnění horečky, a někdy jsou také používány ke dlouhodobé léčbě revmatických onemocnění. Mechanismus jejich účinku souvisí s inhibicí enzymu cyklooxygenázy (COX), zodpovědného za tvorbu prostaglandinů (Grosser et al., 2002).

Dle údajů Státního ústavu pro kontrolu léčiv činila spotřeba ibuprofenu v České republice v roce 2010 9,503 mil. balení. Monitoring Českého hydrometeorologického ústavu k výskytu reziduí farmakologicky aktivních látek prokázal výskyt stopových koncentrací (až 4,4 µg/l) ibuprofenu v povrchových vodách ČR.

Oxidativní stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a eliminací volných radikálů. Výsledkem nerovnováhy je tvorba nadbytečného množství volných radikálů (reaktivní formy kyslíku a reaktivní formy dusíku). Volné radikály jsou nezbytné pro

některé procesy v organismu, ale zároveň jsou odpovědné za řadu degenerativních procesů (Davies, 1995; Toro and Rodrigo, 2009).

Materiál a metodika

V pokusu bylo použito celkem 480 ks ryb. Po aklimatizaci ryb byl proveden test akutní toxicity podle metodiky OECD 203 (Fish, Acute Toxicity Test), cílem bylo stanovení rozpětí koncentrací pro následný růstový test provedený v souladu s metodikou OECD 215.

Dle metodiky OECD 215 (Fish, Juvenile Growth Test) bylo danio pruhované (*Danio rerio*) po dobu 28 dní vystaveno působení testované látky, ibuprofenu, který byl aplikován do vody. Pro test bylo zvoleno 5 různých koncentrací testované látky (0,0001 mg/l - environmentální koncentrace, 0,1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l a 30 mg/l), jedna skupina byla kontrolní. Ryby byly testovány ve dvanácti 30- ti litrových akváriích, v každém akváriu bylo umístěno 30 ks ryb (tj. celkem 360 ks ryb). Každá skupina byla testována duplicitně.

Na konci testu (28. den) byly ryby usmrceny oxidem uhličitým, zamrazeny při - 85 °C a následně použity pro stanovení biomarkerů oxidativního stresu.

Homogenizace zmražených vzorků tkání byla provedena ve fosfátovém pufru. Všechna spektrofotometrická měření byla provedena na mikrotitračních destičkách s použitím přístroje Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Ke stanovení malondialdehydu (MDA) byl využit TBARS test (thiobarbituric acid reactive substances). Principem metody je stanovení barevných adduktů, které vznikají reakcí produktů lipidní peroxidace s kyselinou thiobarbiturovou. Tyto produkty jsou následně spektrofotometricky kvantifikovány při 535 nm (Uchiyama and Mihara 1978, Livingstone et al. 1989, Surai et al. 1996).

Metody měření aktivity glutathion peroxidázy (GPx) a glutathion reductázy (GR) jsou založeny na katalýze přeměny oxidovaného glutathionu (GSSG) na glutathion redukovaný (GSH) za spotřeby NADPH (Carlsberg a Mannervik 1975). Aktivita GR je stanovována dle úbytku množství NADPH v reakci spektrofotometricky při 340 nm.

Katalytická koncentrace glutathion-S-transferázy (GST) byla měřena spektrofotometricky na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukovaným glutathionem a substrátem 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem (Habig et al. 1974) při 340 nm.

Výsledky

Tabulka 1: Vybrané parametry oxidativního stresu u dánia pruhovaného.

Skupiny	GR (nmol NADPH/min/mg protein) ± SD	GPx (nmol NADPH/min/mg protein) ± SD	GST (nmol/min/mg protein) ± SD	MDA (nmol/g vzorku) ± SD
Kontrola	9,16 ± 1,67 ^a	10,58 ± 1,23 ^a	52,18 ± 9,26 ^a	45,81 ± 14,68 ^a
0,0001 mg/l	10,22 ± 4,60 ^a	14,68 ± 4,56 ^{ab}	55,53 ± 3,29 ^{ab}	29,49 ± 8,83 ^b
0,1 mg/l	7,76 ± 1,44 ^a	20,53 ± 11,93 ^b	56,58 ± 3,55 ^{ab}	33,37 ± 9,33 ^{ab}
1 mg/l	8,32 ± 1,28 ^a	26,36 ± 6,87 ^b	57,10 ± 6,21 ^{ab}	35,13 ± 7,69 ^{ab}
10 mg/l	8,02 ± 1,02 ^a	26,89 ± 11,97 ^b	55,80 ± 4,29 ^{ab}	27,92 ± 6,48 ^b
30mg/l	8,32 ± 0,43 ^a	45,87 ± 9,35 ^b	61,67 ± 2,82 ^b	33,29 ± 8,53 ^{ab}

V tabulce 1 je uvedeno vyhodnocení výsledků parametrů oxidativního stresu u dánie pruhovaného (*Danio rerio*) vystaveného dlouhodobému účinku pěti různých koncentrací nesteroidního antiflogistika, ibuprofenu.

Závěr

Z výsledků vybraných parametrů oxidativního stresu vyplývá, že působení ibuprofenu neovlivňuje aktivitu glutathion reduktázy (GR). Bylo prokázáno statisticky významné zvýšení aktivity glutathion peroxidázy (GPx) v experimentálních skupinách v porovnání s kontrolou. Expozice ibuprofenu vyvolala signifikantní zvýšení aktivity GPx v koncentracích 0,1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l a 30 mg/l (20,53; 26,36; 26,89 a 45,87 nmol NADPH/min/mg proteinu). Dále byl prokázán signifikantně zvýšený nárůst aktivity glutathion-S-transferázy (GST), a to v nejvyšší koncentraci 30 mg/l (61,67 nmol min/mg proteinu) oproti kontrole (52,18 nmol/min/mg proteinu). U malondialdehydu (MDA) nebyla prokázána žádná korelace mezi aktivitou MDA a koncentrací testované látky.

Poděkování

Práce byla financována v rámci projektu IGA 10/2012/FVHE.

Literatura

- DAVIES, JAK. Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: Rice-Evans C, Halliwell B, Land GG, editors. Free radical and Oxidative stress: Environment, Drugs and Food Additives. London: Portland Press. 1995, p. 1-31.
- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978, vol. 86, no. 5, p. 271-278.
- LIVINGSTONE, DR. et al. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis*, and other mollusks. *Functional Ecology*. 1990, vol. 4, p. 415-424.
- SURAI, PF.; NOBLE, RC.; SPEAKE, BK. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996, vol. 1301, no. 11, p. 1-10.
- TORO, J.; RODRIGO, R. Oxidative stress: Basic Overview. In: Rodrigo R, editor. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease. New York: Nova Science Publishers, 2009 p. 1-24.
- HABIG, WH.; PABST, MJ.; JAKOBY, WB. Glutathione Stransferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974, vol. 249, p. 7130-7139.
- KOTYZA, J.; SOUDEK, P.; KAFKA, Z.; VANĚK, T. Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chemické listy*. 2009, vol. 103, p. 540-547
- GROSSER, T.; YUSUFF, S.; CHESKIS, E.; PACK, M.A.; FITZGERALD, G.A. (2002): Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 2002, vol. 99, p. 8418-8423
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975, vol. 249, p. 5475-5480.

Kontaktní adresa: Marta Bartošková, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11020@vfu.cz

**Stanovení parametrů oxidativního stresu u ryb po subchronické
expozici kyselinou acetylsalicylovou**

**Determination of oxidative stress parameters in fish after subchronic
exposure to acetylsalicylic acid**

**Živná Dana, Svobodová Zdeňka, Prášková Eva, Štěpánová Stanislava,
Široká Zuzana, Maršálek Petr, Blahová Jana, Poláčková Jana**

*Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární
a farmaceutická univerzita Brno*

Summary

*Aim of this study was to investigate the effects of subchronic exposure of juvenile development stages in zebrafish (*Danio rerio*) to acetylsalicylic acid by using selected oxidative stress biomarkers. We performed a test according to OECD 215, in which we used fish *D. rerio* aged 30 days. The tested concentrations were 0.004, 0.4, 40, 120 and 250 mg / l. As markers of oxidative stress were determined products of lipid peroxidation and antioxidant enzymes. On the basis of observed changes in individual parameters of oxidative stress we can be assume effect of acetylsalicylic acid on aquatic organisms. Especially changes in the values of antioxidant enzymes and products of lipid peroxidation were significant at a concentration of 40, 120 and 250 mg / l.*

Keywords: *pharmaceuticals; lipid peroxidation; antioxidant enzymes; Danio rerio*

Úvod

Do životního prostředí se vlivem lidské činnosti dostává celá řada cizorodých látek, které představují nebezpečí pro všechny živé organismy včetně člověka. Významnou skupinu těchto kontaminujících látek tvoří léčiva, která se do životního prostředí dostávají především prostřednictvím komunálních odpadních vod (Fent et al., 2006).

Kyselina acetylsalicylová, která patří mezi nesteroidní protizánětlivé látky (NSAIDs), je jedním z nejpoužívanějších léčiv v humánní medicíně. NSAIDs jsou látky inhibující enzym cyklooxygenázu, která katalyzuje syntézu prostaglandinů z kyseliny arachidonové (Vane a Botting, 1998). Tyto látky jsou běžně používány při léčbě horečky, bolesti a zánětu a celosvětově se jedná o jednu z nejpoužívanějších látek jak v humánní tak veterinární medicíně.

Po průchodu čističkou odpadních vod je celá řada léčiv, včetně NSAIDs, nacházena ve vodách jen v nízkých koncentracích. Pro kyselinu acetylsalicylovou se tyto koncentrace pohybují v rozmezí 0,34 - 1,5 µg/l (Ternes, 1998). Koncentrace těchto látek mohou při chronickém působení ovlivnit růst, vývoj a orgánové funkce organismu s následným dopadem na celou populaci ryb a dalších vodních organismů. Negativní dopad těchto cizorodých látek je zjišťován v experimentálních podmínkách. Jsou prováděny různé typy testů toxicity na rybách a v závěru hodnoceny efekty zejména za využití biomarkerů oxidativního stresu.

Oxidativní stres je proces, který vzniká v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a eliminací volných radikálů. Jako výsledek této nerovnováhy dochází k tvorbě nadbytečného množství volných radikálů, které představují reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Tyto radikály jsou nezbytné pro některé procesy

v organismu, ale jsou také odpovědné za celou řadu degenerativních procesů (Davies, 1995; Toro and Rodrigo, 2009).

Stanovení biomarkerů volných radikálů představuje možnost, jak sledovat a hodnotit míru oxidativního stresu. Biomarkery oxidativního stresu zahrnují především produkty peroxidace lipidů a enzymy antioxidační obrany (Di Giulio and Meyer, 2008).

Cílem tohoto výzkumu bylo zhodnocení subchronického účinku kyseliny acetylsalicylové na organismus ryb za použití markerů oxidativního stresu.

Materiál a metodika

Za účelem posouzení subchronických účinků kyseliny acetylsalicylové byl proveden test dle metodiky OECD 215 (Fish, juvenile growth test). Byly použity ryby *D. rerio* ve věku 30 dnů. V kontrole a každé koncentraci bylo použito 84 kusů ryb. Testované koncentrace byly 0,004, 0,4, 40, 120 a 250 mg/l. Test probíhal 28 dní v průtočných nádržích s obměnou roztoků po 12 hodinách. Pro stanovení jednotlivých biomarkerů oxidativního stresu byl použit celotělový homogenát.

Měření aktivity glutathion peroxidasy (GPx) a glutathion reductasy (GR) je založeno na katalýze přeměny oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby NADPH. Aktivita GPx a GR je stanovena na základě úbytku množství NADPH spektrofotometricky.

Katalytická koncentrace glutathion-S-transferasy (GST) se měří na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukovaným glutathionem a substrátem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem spektrofotometricky (Habig et al., 1974).

Měření aktivity katalázy (CAT) je založeno na schopnosti tohoto enzymu rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík. Při tomto rozkladu dochází k poklesu absorbance, která je stanovována spektrofotometricky ve speciálních mikrokyvetách (Aebi, 1984).

Pro stanovení MDA - lipidní peroxidace se využívá TBARS test (thiobarbituricacid reactive substances = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou – TBA). Metoda je založená na stanovení barevných adduktů, vznikající reakcí produktů lipidní peroxidace s kyselinou thiobarbiturovou, které jsou měřeny spektrofotometricky (Livingstone et al., 1990; Surai et al., 1996; Uchiyama and Mihara, 1978).

Koncentrace kyseliny acetylsalicylové ve vodě byla měřena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV absorpční detekcí při vlnové délce 234 nm.

Výsledky a diskuze

Průměrná hmotnost ryb na začátku pokusu byla 27,17 mg. Po skončení pokusu nebyl v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve hmotnosti v porovnání s kontrolou, kde se průměrná hmotnost pohybovala okolo 103,15 mg.

Při porovnání výsledků jednotlivých parametrů oxidativního stresu, které jsou uvedeny v tabulce, je zřejmé, že především u skupin, které byly vystaveny vyšším koncentracím kyseliny acetylsalicylové (40, 120 a 250 mg/l) došlo k signifikantním změnám u většiny parametrů.

U hodnoty TBARS došlo se stoupající koncentrací kyseliny acetylsalicylové v jednotlivých skupinách (0,004; 0,4; 40; 120 a 250 mg/l) k poklesu oproti kontrole

(54,66 nmol/g vzorku). Z toho lze vyvodit, že kyselina acetylsalicylová má schopnost snižovat peroxidaci lipidů ve tkáních ryb.

U GR došlo u všech skupin ke zvýšení aktivity tohoto enzymu oproti kontrole (10,71 nmol NADPH/min/mg protein). Ale ke statisticky významnému zvýšení došlo pouze v koncentracích 0,4; 40 a 120 mg/l (14,35; 15,44; 13,30 nmol NADPH/min/mg protein).

Hodnoty GST byly u všech skupin zvýšeny, přičemž k nejvýraznějšímu a statisticky významnému zvýšení došlo pouze v koncentracích 40; 120 a 250 mg/l. Na základě těchto hodnot lze říct, že došlo ke zvýšení aktivity enzymu druhé fáze detoxikace.

Aktivita CAT byla ve všech testovaných koncentracích zvýšena v porovnání s kontrolou (97,90 μ mol H₂O₂/min/mg protein). Ke statisticky významnému zvýšení aktivity tohoto enzymu, však došlo pouze v koncentraci 40 mg/l (122,94 μ mol H₂O₂/min/mg protein).

Pokles aktivity enzymů GR a CAT lze vysvětlit vyčerpáním kapacity těchto enzymů.

Tabulka 1: Výsledky jednotlivých parametrů oxidativního stresu.

Testované koncentrace mg/l	n	TBARS průměr ± SD (nmol/g vzorku)	GR průměr ± SD (nmol NADPH/min/mg protein)	GPx průměr ± SD (nmol NADPH/min/mg protein)	GST průměr ± SD (nmol/min/mg protein)	CAT průměr ± SD (μ mol H ₂ O ₂ /min/mg protein)
0	16	54,66 ± 13,90	10,71 ± 2,13	19,61 ± 5,63	89,98 ± 16,97	97,90 ± 16,33
0,004	16	45,45 ± 18,45	11,99 ± 2,08	26,88 ± 8,42*	101,00 ± 18,13	110,57 ± 20,36
0,4	16	41,12 ± 11,91	14,35 ± 1,76**	22,02 ± 7,27	83,59 ± 10,10	104,88 ± 11,69
40	16	33,19 ± 13,60**	15,44 ± 2,89**	20,20 ± 4,01	104,52 ± 17,58*	122,94 ± 22,63**
120	16	29,71 ± 9,09**	13,30 ± 2,06**	25,73 ± 4,94*	108,04 ± 14,63**	105,87 ± 22,26
250	16	40,47 ± 16,71*	12,21 ± 2,32	21,66 ± 8,06	122,16 ± 10,82**	91,28 ± 15,87

* (p<0,05); ** (p<0,01)

Tyto výsledky potvrzují i další studie sledující negativní působení salicylátů na fyziologické funkce vodních organismů (van Anholt et al., 2003; Gravel and Vijayan, 2009).

Závěr

Na základě změn v jednotlivých parametrech oxidativního stresu jsme prokázali, že kyselina acetylsalicylová může mít především ve vyšších koncentracích negativní vliv na průběh některých biochemických procesů v organismu.

Poděkování

Výzkum byl financován z projektu IGA 12/2012/FVHE.

Literatura

Použitá literatura je k dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Dana Živná, MVDr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11473@vfu.cz

SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat
zoologických zahrad*

Konspecifita parazitů rodu *Haemogregarina* u sladkovodních želv rodu *Emys* a *Mauremys*

Conspecificity of parasites of the genus *Haemogregarina* in freshwater turtles of the genera *Emys* and *Mauremys*

Dvořáková Nela, Široký Pavel

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

Summary

Members of the genus *Haemogregarina* are blood parasites of aquatic vertebrates, leech is their vector and definitive host. In our study, we examined 73 turtles (15 individuals of *Emys orbicularis*, 17 of *Mauremys caspica* and 41 of *M. rivulata*) originally from areas of Bulgaria, Iran, Syria and Turkey. Prevalence, parasitaemia and morphology of haemogregarines were studied using light microscopy of Giemsa-stained blood smears. We detected presence of various morphotypes of blood parasites belonging to the genus *Haemogregarina* in 93.3% of individuals of *E. orbicularis*, *M. caspica* 47.1% and 59.5% *M. rivulata*. The results of phylogenetic analyses of 1500bp long 18S rDNA sequences of our isolates confirmed their genetic identity and concurrently low host specificity of this blood parasite.

Keywords: *Haemogregarina*; *Emys*; *Mauremys*; 18S rDNA; microscopy; phylogenetic analysis

Úvod

Obecně jsou hemogregariny skupina s více než 400 druhy heteroxenních krevních parazitů infikující převážně vodní obratlovce. V minulosti byly nové druhy popisovány na základě odlišné morfologie gamontů – stádií nalézající se v periferní krvi a existoval předpoklad jejich striktní hostitelské specifity. Ta je v poslední době často zpochybňována díky studiím využívajícím molekulárně – genetických metod.

Želva, jako mezihostitel těchto parazitů, se infikuje při sání vektora (a definitivního hostitele), kterým bývá pijavka. Během sání dochází k přestupu merozoitů do krve hostitele. Z nich se v buňkách jater, plic a sleziny vyvíjejí preerytrocytární meronty, ve kterých zraje nová generace merozoitů napadající erythrocyty. Vývoj pokračuje tvorbou premerontů rozdělující se opět na další merozoity, kteří napadají nové erythrocyty a mění se na erythrocytární meronty nebo gamonty. Po prodělané infekci, která v těle dlouhodobě perzistuje (i několik let), nenastupuje imunita. K nejlépe prostudovaným hemogregarinám želv patří *Haemogregarina stepanowi* (Danilewsky, 1885) – typový druh rodu *Haemogregarina*, popsáný z želvy bahenní (*Emys orbicularis*), jehož definitivním hostitelem jsou pijavky rodu *Placobdella* (Reichenow, 1910; Paterson & Desser, 1976).

Materiál a metodika

Celkem jsme vyšetřili 73 krevních vzorků ze 3 druhů želv (15 jedinců *Emys orbicularis*, 17 *Mauremys caspica* a 41 *M. rivulata*) pocházejících z oblastí Bulharska, Iránu, Sýrie a západní části Turecka. Vyšetřované krevní nátěry byly fixovány absolutním metanolem a obarveny Giemsovým barvivem (ředění 1:10 v pufrované vodě, pH 7) po dobu 20 minut. Parazitologii jsme stanovili pod imerzí při zvětšení 1.000×. DNA byla izolována kitem NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany). Extrahovaná DNA byla kvantifikována spektrofotometricky pomocí přístroje nanodrop ASP-3700 (ACTGene,

USA) a následně skladována při -20°C . Přibližně 1500bp dlouhý úsek genu 18S rDNA byl amplifikován pomocí specifických primerů k potvrzení přítomnosti hemogregarin (Kvičerová *et al.* 2008). Reakce probíhala v objemu 25 μl za následujících podmínek - úvodní denaturace při $95^{\circ}\text{C}/4$ min, následována 40 cykly spočívajících z denaturace $92^{\circ}\text{C}/45$ s, navázání primerů při $58^{\circ}\text{C}/45$ s a extenze $72^{\circ}\text{C}/90$ s (závěrečná extenze při $72^{\circ}\text{C}/10$ min). Vizualizace výsledků po obarvení ethidium bromidem proběhla na 1.2% agarózovém gelu v UV světle. PCR produkty byly poté přečištěny kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) a opět byla změřena jejich koncentrace DNA.

Následné osekvenování DNA bylo zajištěno specializovanou laboratoří (Macrogen, the Netherland). Získané sekvence byly poté upraveny v programu DNASTAR (DNASTAR, Inc.) a identifikovány v algoritmu BLAST. Pro následnou fylogenetickou analýzu byly z databáze GenBank (NCBI) použity sekvence 18S rDNA příbuzných druhů. Fylogenetická analýza získaných sekvencí proběhla v programu MrBayes 3.1.2. (Ronquist & Huelsenbeck 2003) v nastaveném GTR modelu pro 10^7 generací. Další analýza metodou Maximum likelihood (ML) byla provedena v programu PHYML 2.4.4. (Guindon & Gascuel 2003) s počtem bootstrapových replikátů 1000. Fylogenetické stromy byly finalizovány v programu TreeView 1.6.6. (Page, 1996b).

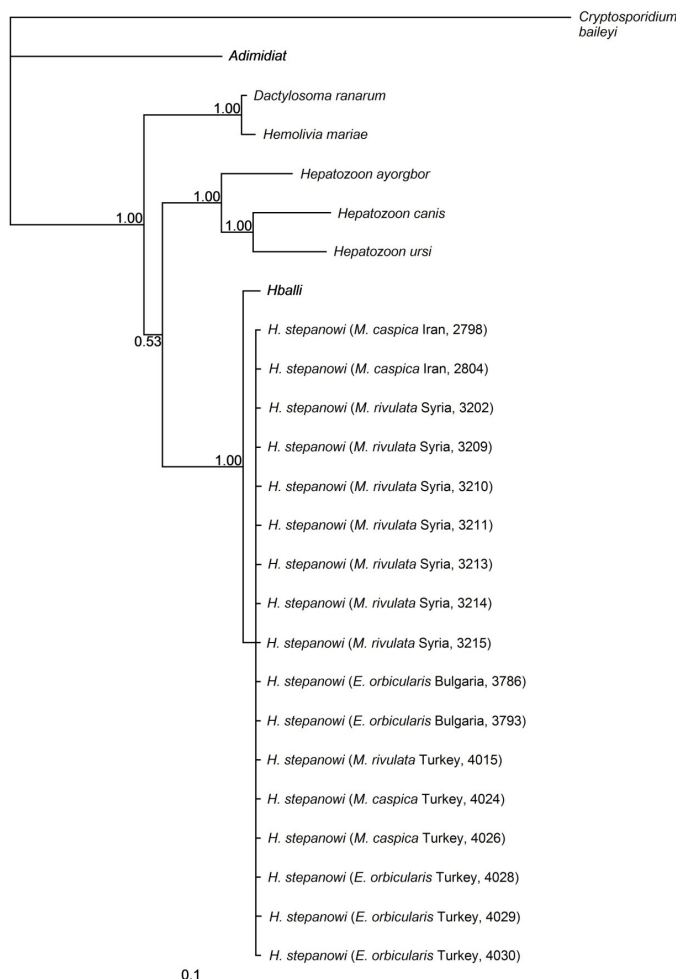
Výsledky a diskuse

Krevními parazity bylo infikováno 47 (64,4%) ze 73 studovaných želv. Počet vyšetřených želv a prevalence infekcí znázorňuje tabulka 1. Parazitémie se pohybovala v rozmezí 0.08 až 1.36%. Mikroskopicky byla u želv detekována přítomnost gamontů morfologicky podobných rodu *Haemogregarina*, v zásadě se shodující s druhem *H. stepanowi*. Diagnostika metodou PCR vykazovala stejné výsledky jako mikroskopické vyšetření. Fylogenetické stromy vytvořené pomocí Bayesovské analýzy (Obr. 1) a metodou maximální pravděpodobnosti (ML) ukázaly podobnou topologii větví pouze s malými změnami polohy příbuzných taxonů. Izoláty z želv rodu *Mauremys* tvořily spolu s *H. stepanowi* monofyletickou skupinu (clade).

Ve volné přírodě bývají želvy běžně infikovány krevními parazity (Mihalca *et al.* 2008). U rodu *Mauremys* byla v minulosti nekompletně popsána *H. bagensis* (Ducloux, 1904), v pozdějších letech se některé studie pouze zmiňují o přítomnosti hemogregarin u tohoto rodu želv (Desser *et al.* 1987, Paperna 1989). Dle našich výsledků usuzujeme, že výskyt *H. stepanowi* je pravděpodobně striktně vázán na vektora a definitivního hostitele - pijavku rodu *Placobdella*. Želva ve vývojovém cyklu zastupuje roli druhově nespecifického mezihostitele.

Tabulka 1: Počet vyšetřených želv a prevalence infekce.

Druh	Počet odebraných kusů (Prevalence, %)				Celkem (Prevalence, %)
	Bulharsko	Sýrie	Írán	Turecko	
<i>E.orbicularis</i>	8 (100)	0	3 (33,3)	4 (100)	15 (93,3)
<i>M. caspica</i>	0	0	8 (62,5)	9 (33,3)	17 (47,1)
<i>M. rivulata</i>	3 (100)	27 (63,0)	0	11 (45,5)	41 (59,5)
Celkem	11	27	11	24	73 (64,4)



Obrázek 1: Fylogenetický strom zkonstruovaný Bayesovskou analýzou znázorňující evoluční postavení nalezených hemogregarin.

Závěr

Z větvení fylogenetického stromu vyplynula nízká hostitelská specifita a značná konspecifita našich izolátů hemogregarin pocházejících ze tří druhů hostitelských želv. Studie poukázala na další dva možné hostitele parazita *Haemogregarina stepanowi* a to želvu kaspickou (*Mauremys caspica*) a želvu tmavobřichou (*Mauremys rivulata*). Získané výsledky výrazně upřesnily naše znalosti o distribuci, prevalenci a hostitelské specifitě hemogregarin u vodních želv západního Palearktu.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena granty IGA VFU číslo 11/2012/FVHE a GAČR P506/11/1738.

Literatura

Seznam použité literatury a citovaných zdrojů je k dispozici u autorů.

Kontaktní adresa: Nela Dvořáková, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11469@vfu.cz

***Neospora* spp. a *Toxoplasma gondii* u koňovitých v jižní Itálii**
***Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in equine from**
Southern Italy

Machačová Tereza, Bártová Eva

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat

Summary

*The sera of 155 horses and 238 donkeys from Southern Italy were tested for *N. caninum* antibodies by a Competitive-Inhibition Enzyme-linked Immunosorbent Assay (cELISA); $\geq 30\%$ inhibition was considered positive. The same sera were also tested for *T. gondii* antibodies by Latex Agglutination Test (LAT) and by the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT); a titre ≥ 50 was considered positive. In the case of horses, *Neospora* spp. antibodies were found by cELISA in 2 (1.3%) horses with low inhibition 3.18% and 30.01%; *T. gondii* antibodies were detected by IFAT in 8 (5.2%) horses. In donkeys, *Neospora* spp. antibodies were found in 28 (11.8%) donkeys with inhibition ranging from 30.07% to 44.34%; *T. gondii* antibodies were found in 12 (5%) and 19 (8%) donkeys by LAT and IFAT, respectively. Donkeys and horses from Southern Italy are not important hygienic factor for transmission of *T. gondii* and *N. caninum* infection.*

Keywords: *equines; neosporosis; toxoplasmosis; cELISA; IFAT*

Úvod

Koně a osli jsou hospodářská zvířata, která jsou v Itálii využívána mimo jiné i pro produkci masa případně mléka. Především chov oslů v poslední době v Evropských zemích, zvláště v Itálii, nabývá opět na významu. Paraziti *Toxoplasma gondii* a *N. caninum* jsou kokcidie, jejichž definitivním hostitelem je v případě *T. gondii* kočka a kočkovité šelmy, s širokým spektrem teplokrevných mezihostitelů, včetně člověka a v případě *N. caninum* pes, dingo, kojot a vlk, kdy přenos na člověka nebyl zatím prokázán (Dubey, 2010).

Člověk 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).

V Evropě existuje několik seroprevalenčních studií týkajících se *N. caninum* a *T. gondii* u koní. Z Itálie jsou známy 2 práce týkající se detekce protilátek proti *N. caninum* (Ciaramella et al., 2004; Piantedosi et al., 2009) a protilátek proti *T. gondii* (Polidori, 2003; Tassi, 2006). V případě oslů, byly doposud uskutečněny jen 3 studie zabývající se seroprevalencí *T. gondii* a to v Egyptě (El-Ghaysh, 1998; Haridy et al., 2010) a Turecku (Zeybek et al., 1998); prozatím nebyla publikována žádná studie týkající se seroprevalence *N. caninum* u oslů.

Cílem této práce bylo vyšetřit séra koní a oslů z jižní Itálie na přítomnost protilátek proti *N. caninum* a *T. gondii* a vyhodnotit tak možné riziko nákazy pro konzumenty oslího a koňského masa případně mléka.

Materiál a Metodika

Koně

Na 10 farmách v jižní Itálii bylo odebráno 155 vzorků koňské krve. Pomocí kompetitivní enzymoimunoanalýzy (cELISA) a nepřímé imunofluorescenční reakce (IFAT) byla séra vyšetřena na přítomnost protilátek proti *N. caninum*. Za pozitivní byly považovány vzorky v cELISA s titrem ≥ 50 nebo v IFAT s inhibicí $\geq 30\%$. Séra byla vyšetřena i na přítomnost protilátek proti *T. gondii* pomocí nepřímé imunofluorescenční reakce (NIFR), kdy za pozitivní byly označeny vzorky s titrem ≥ 50 .

Oslí

Vzorky krve byly odebrány od 238 klinicky zdravých oslů na 20 oslích farmách v jižní Itálii. Stejně jako u koní se jednalo 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 *N. caninum* byly detekovány pomocí kompetitivní enzymoimunoanalýzy (cELISA, VMRD, Pullman, USA), kdy za pozitivní byla považována inhibice $\geq 30\%$. Stejná séra byla také testována na přítomnost protilátek proti *T. gondii* pomocí Latex aglutinačního testu (LAT) /Pastorex TM 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. Vzorky s titrem ≥ 50 byly považovány za pozitivní.

Získané výsledky sérologického vyšetření koní a oslů 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

Koně

Protilátky proti *N. caninum* byly u koní detekovány pomocí metod cELISA i NIFR u dvou (1.3%) koní; v cELISA byla zjištěna nízká inhibice 3.18% a 30.01%. Pomocí metody NIFR byly protilátky proti *T. gondii* detekovány u 8 (5.2%) koní. Protilátky proti *N. caninum* a zároveň *T. gondii* byly zaznamenány jen u jednoho z vyšetřovaných koní. V případě *N. caninum* i *T. gondii* nebyla prokázána žádná statistická významnost ($P > 0.05$) mezi pohlavím, věkem, využitím zvířat a jejich séropozitivitou.

Oslí

Protilátky proti *N. caninum* byly prokázány u 28 (11.8%) oslů s inhibicí dosahující od 30,07% do 44,34%. Protilátky proti *T. gondii* byly metodou LAT prokázány u 12 (5%) oslů a metodou NIFR u 19 (8%) oslů. Žádný z vyšetřovaných oslů nebyl současně pozitivní na *T. gondii* i *N. caninum*. V případě *T. gondii* i *N. caninum* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ($P > 0.05$) mezi pohlavím, věkem, využitím oslů a jejich seropozitivitou. Statisticky významný rozdíl ($P > 0.05$) byl zaznamenán pouze v případě *N. caninum* mezi čistokrevnými plemeny oslů (18%) a kříženci (5%). Přítomnost koček, psů na farmě, velikost farem, ustájení nebo volná pastva neměly vliv na séropozitivitu oslů.

Diskuse

Protilátky proti *Neospora* spp. byly detekovány pomocí cELISA i NIFR u 1.3% koní. V jižní Itálii byla v předchozích letech zjištěna mnohem nižší prevalence protilátek proti

N. caninum. Ciaramella et al. (2004) detekovali protilátky proti *N. caninum* u 28% koní metodou NIFR, Piantedosi et al. (2009) u 10% koní pomocí IFAT.

Protilátky proti *T. gondii* byly metodou NIFR detekovány u 5.2% koní. U námi vyšetřovaných koní byla v porovnání s koňmi z předcházejících studií z Itálie zjištěna mnohem nižší séroprevalence *T. gondii*. Polidori (1993) detekoval protilátky proti *T. gondii* u 16% koní metodou NIFR a Tassi (2006) u 31% koní metodou modifikovaného aglutinačního testu (MAT).

Protilátky proti *Neospora* spp. byly prokázány u 28 (11.8%) oslů. Jedná se o první průkaz protilátek proti *N. caninum* u oslů. Protilátky proti *T. gondii* byly zjištěny u 5% oslů metodou LAT a 8% metodou NIFR. Zjištěná 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.

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

CIARAMELLA, P.; CORONA, M.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; SANTORO, D.; DI LORIA, A.; RIGATO, R.. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. *Veterinary Parasitology*. 2004, vol. 123, no. 2-3., s. 11–15.

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. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2010, vol. 40, no. 2, s. 459-464.

PIANTEDOSI, D.; GIUDICE, E.; PIETRA, M.; LUCIANI, A.; BRINI, E.; GUGLIELMINI, C.; PUGLIESE, A.; CIARAMELLA, P. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. *Ippologia* 2009, vol. 20, no. 2, s. 3-8.

POLIDORI, G.A. Role of foods of animal origin in the transmission of toxoplasmosis to man. In: *Proceeding of III Conference on Toxoplasmosis*. Regione Toscana. 1993, s. 51-54.

POZIO, E. Is horse meat trichinellosis an emerging disease in the EU? *Parasitology Today* 2000, vol. 16, no. 6, s. 266.

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.

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.

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 VFU Brno, Palackého tř. 1-3, 612 42 Brno, H11003@vfu.cz

Prevalencia endohelminťov rýb v procese osídľovania nového koryta rieky

Endohelminths prevalence in fish within the process of settlement the new artificial river channel

¹Šmiga Ľubomír, ¹Košuthová Lenka, ¹Košuth Peter, ²Koščo Ján, ²Ševc Ján,
²Manko Peter, ¹Lazar Peter

¹Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
²Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity v Prešove

Summary

In March 2009 was transshipped part of the Nitra river and its tributary, long 2650 metres, due to the extension of mining activities. Ichthyofauna, fish parasites and macroinvertebrates were examined at selected locations. The first species colonizing the new part of the river bed was *G. gobio*. Poor parasites diversity (*P. laevis*, *A. anguillae* and *P. torulosus*) was found in both river sections. The prevalence values between old and new sections were markedly different. Pronounced differences were observed between members of *S. cephalus* in new and old microhabitats.

Keywords: man-made river; succession; fish fauna; parasites; macrozoobenthos

Úvod

V dôsledku rozšírenia ťažby hnedého uhlia, uvoľnením 11. ťažobného úseku Bane Nováky (Hornonitrianske bane Prievidza) došlo k preloženiu časti koryta rieky Nitra (24.03.2009), ktoré bolo vážnym zásahom do pôvodného ekosystému. Prekládka bola vykonaná na dĺžke 2650 metrov rieky Nitra a jej prítoku Handlovka. Vytvorenie umelého koryta, ktoré je bezbariérové spojené s pôvodným, je v celosvetovom meradle ojedinelým javom. Relevantné poznatky o kolonizácii v podobnej oblasti chýbajú. Preferencie mikrohabitatov po prekládkach koryta rieky sú sledované predovšetkým v súvislosti s renaturačnými úpravami tokov (napr. Santos, 2005) alebo pri nepravidelne vysušovaných kanáloch (Lonzarich et al., 1998).

Materiál a metódy

Modifikovanou bodovou metódou (Persat a Copp, 1990; Persat a Olivier, 1991) boli pomocou elektrického agregátu vykonané odlovy, ktoré sme uskutočnili na jar (28.04.) a v lete (22.07.) v roku 2009. Zvolené boli tri lokality na novom úseku koryta (N1 – N3; v smere toku) a dve lokality na pôvodnej časti koryta (S1 – nad novým úsekom, S2 – pod novým úsekom). Lokalita S2 bola z technických príčin prelovená len v lete. Dĺžka jednotlivých skúmaných úsekov sa pohybovala od 60 – 150 metrov. Podrobné údaje o abiotických a biotických podmienkach jednotlivých mikrohabitatov boli zaznamenané v terénnych protokoloch. Charakteristiky ichthyofauny boli zostavené podľa Lososa et al. (1984) a Holčíka (1998). Vzorka rýb (rozdelných do veľkostných a druhových kategórií) z každej lokality bola podrobená štandardnej parazitologickej pitve, zameranej na helminty (Ergens a Lom 1970). Nájdené helminty boli fixované v horúcom 4 % formalíne a následne determinované. Parazitárna infekcia bola charakterizovaná prevalenciou a intenzitou parazitárnej infekcie.

Výsledky

V starom koryte sme zaznamenali 10 druhov rýb na jar a 4 v lete. Z hľadiska dominancie patrili v starom koryte na jar *Squalius cephalus* a v lete *Alburnoides bipunctatus* k superdominantným. V novom koryte sme na jar zaznamenali 9 a v lete 11 druhov rýb. Nové koryto viac vyhovovalo podustve severnej (*Chondrostoma nasus*) a čerebli pestrej (*Phoxinus phoxinus*), ktoré sme v starom koryte nezistili. Nové koryto s najväčšou pravdepodobnosťou najskôr osídlil hrúz škvrnitý.

Vyšetrených bolo 176 rýb z oboch úsekov koryta – starého (ST) 81 a nového (NT) 95, spolu 11 druhov. Predovšetkým však druhy dominantné na jednotlivých úsekoch, t.j. *Squalius cephalus*, *Alburnoides bipunctatus*, *Gobio gobio* a *Barbatula barbatula*. V jarnom odlove spolu 57 rýb; (ST-25 ks, NT-32 ks) v letnom odlove spolu 119 rýb (ST-54 ks, NT-65). Štatistickými analýzami boli preukázané výrazné zmeny v prevalencii parazitov v starom a novom úseku rieky Nitra ($p < 0.05$ v roku 2009, $p < 0.05$ v roku 2010). Parazitárna infekcia v starom koryte (priemerná intenzita 0.34) bola vyššia, ako v novovybudovanom úseku (s intenzitou 0.18). Hodnoty celkovej intenzity parazitárnej infekcie sa v roku 2010 v starom úseku mierne zvýšili 1- 6 (v roku 2009 1-5), v porovnaní s novým úsekom, kde došlo k výraznému zníženiu z 1-8 na 1-4. V starom úseku, celkovo najvyššiu prevalenciu sme zaznamenali na jar pri *Squalius cephalus* 61% (11/18). Druhovú skladbu tvorili *Pomphorhynchus laevis*, *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala) a *Proteocephalus torulosus* (Cestoda). *Barbatula barbatula* nebola na jar v starom úseku ulovená a v letnej vzorke boli odlovené slíže negatívne. *Alburnoides bipunctatus* infikovaná háčikohlavcami (*P. laevis*) v starom koryte dosahovala celkovú prevalenciu 11% (2/19), a to hlavne v letnom odlove, keďže v jarnom bolo vyšetrených len minimum vzoriek (3). Z 23 hrúzov vyšetovaných v starom úseku bolo pozitívnych na jar 22% (2/9) háčikohlavcami (*P. laevis*, *A. anguillae*), vzorka bola negatívna v lete (0/14). Intenzita infekcie jednotlivých helmintov u rýb sa pohybovala u *P. laevis* 1-5, *A. anguillae* 1-2, *Proteocephalus torulosus* 1-2. V novom úseku koryta bol celkovo výskyt parazitov skôr zriedkavý; nálezy boli obmedzené len na výskyt dvoch druhov háčikohlavcov. V jarnom odlove bol zo všetkých vyšetrených druhov jedinou pozitívnou rybou jalec (1/28) (*A. anguillae*). V lete bola prevalencia u rýb nasledovná: *Alburnoides bipunctatus* 22% (4/18) (*P. laevis*), *Squalius cephalus* 30% (3/10) (*P. laevis*, *A. anguillae*), *Gobio gobio* 14% (1/7) (*P. laevis*), slíž opäť negatívny, v celom novom úseku (0/26). Intenzita infekcie jednotlivých helmintov u rýb sa pohybovala u *P. laevis* 1-6, u *A. anguillae* 1-3.

Za sledované obdobie, najvyšší rozdiel v prevalencii parazitov medzi starým a novým úsekom koryta sme zaregistrovali u jalca: 61% - ST a 25% - NT; v jarnom odlove v ST bola prevalencia 78% a v NT 17%, v lete v ST 50% a NT 30%. Prevalencia u plosky v ST (16%) a NT (19%) bola takmer vyrovnaná, rovnako aj u hrúza - v ST 9% a v NT 4%. Slíž nebol infikovaný. Vzhľadom na nízke počty vyšetrených rýb ostatných uvedených druhov, výsledky prevalencie je možno považovať len za orientačné. Horná časť nového koryta rieky bola kolonizovaná makrozoobentosom - (Oligochaeta, Hirudinea a Crustacea (*Gammarus* sp.) a Diptera (*Chironomidae*, *Simuliidae*) pomerne rýchlo. vyššiou druhovou diverzitou v lete. Zaznamenané boli aj chránené a vzácne druhy, ako napr. *O. rhenana* (Ephemeroptera) a *Aphelocheirus aestivalis* (Heteroptera), aj napriek výraznej antropogénnej činnosti.

Diskusia

Charakter toku výrazne ovplyvňuje ichtyofaunu reofilných oblastí (Vlach et al., 2005). V nových úsekoch často nachádzame druhy so širokou ekologickou valenciou a reofilné druhy, ktoré v svojich prácach uvádza Andreji a Stráňai (2005) na nezmenenom toku. Invázny druh *Pseudorasbora parva*, ako nereofilný druh zrejme využíva nové niky v nových biotopoch.

Makrozoobentos, najmä zástupcovia Oligochaeta (Mathooko, 1995), Chironomidae and Simuliidae (Flory a Milner, 2000), kolonizujú pomerne rýchlo novovzniknuté úseky riek najmä v horných častiach (Allan, 1995) a neskôr slúžia ako zdroj potravy pre ryby (Larimore et al., 1959). Negatívny vplyv na šírenie parazitóz môžu mať aj rozdielne biotické a abiotické faktory v pôvodných a novo-kolonizovaných oblastiach (Kennedy, 1994). Akantocéphala, ktoré sa vyskytovali v najvyššej prevalencii, sú schopné využiť vo svojom vývinovom cykle širokú škálu medzihostiteľov a definitívnych hostiteľov, čo im zabezpečuje vyššiu úspešnosť v kolonizovaní nových habitatov. V opačnom prípade sú zdravé jedince úspešnejšie v kolonizovaní nových oblastí, čo sa prejavuje na zníženej prevalencii parazitóz (Kennedy, 2006).

Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0847/13, APVV 0154-07.

Literatúra

- ANDREJI, J., STRÁŇAI, I. Príspevok k poznaniu ichtyofauny toku Handlovka. *I. medzinárodné vedecké hydriárske dni, Nitra: 298-303, 2005.*
- ERGENS, R., Lom, J. *Causative agents of parasitic fish diseases.* Prague: Academia, 1970. s. 384
- FLORY E. A., MILNER, A., M. Macroinvertebrate community succession in Wolf Point Creek, Glacier Bay National Park, Alaska. In *Freshwater Biology*, 2000, 4: 465-480.
- HOLČÍK, J. *Ichtyológia.* Bratislava: Príroda, 1998, s. 320.
- KENNEDY, C., R. The ecology of introductions. In *Parasitic Diseases of Fish*, ed. A. W. Pike & J. W. Lewis. *Tresaith Cardigan: Samara*, 1994, s. 198-208.
- KENNEDY, C., R. *Ecology of the Acanthocephala.* Cambridge: Cambridge University Press, 2006, s. 249.
- LARIMORE, R., W., CHILDERS, W., F., HECKROTE, C. Destruction and reestablishment of stream fishes and invertebrates affected by drought. In *Transactions of the American Fisheries Society*, 1959, 88: 262-285.
- LONZARICH, D., G., WARREN, M., L., LONZARICH, M., R., E. Effects of habitat isolation on the recovery of fish assemblages in experimentally defaunated stream pools in Arkansas. In *Can. J. Fish. aquat. Sci.*, 1998, 55: 98-113.
- LOSOS, B. et al. *Ekologie živočichů.* Praha: SPN, s. 316.
- MATHOOKO, J., M. Colonization of artificial substrates by benthos in a second-order high altitude river in Kenya. In *Hydrobiologia*, 1995, 308 (3): 229-234.
- PERSAT, H., COPP, G., H. Electric fishing and point abundance sampling for the ichthyology of large rivers. In *Cowx I. G. (Ed.): Developments in Electric Fishing, 1990, s. 197-209.*
- PERSAT H. & OLIVIER J. M. 1991: The point abundance sampling, a fishing strategy for large rivers: short presentation of the concept, its appliance and some results. In *Penaz M.: Proceednigs of Biological monitoring of large rivers. Brno: 104-113.*
- SANTOS, T. Optimal swim speeds for traversing velocity barriers: an analysis of volitional high-speed swimming behavior of migratory fishes. In *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208: 421-432.
- VLACH, P. et al. Fish assemblage structure, habitat and microhabitat preference of five fish species in a small stream. In *Folia Zoologica*, 2005, 54 (4): 421-431.

Kontaktná adresa: Ľubomír Šmiga, MVDr., Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, akva.smiga@pobox.sk

Epizootologické šetrenie v populáciách túlavých mačiek na území východného Slovenska

Epizootiological survey in stray cat populations in Eastern Slovakia

Čechvala Peter, Ondrejková Anna, Ondrejka Róbert, Slepecká Eva

Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice, Slovenská republika

Summary

The article presents first records of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in stray cat population in the city of Košice. The cats were trapped alive and examined on presence of feline viruses. Using serological FIV and FLV in cats were confirmed.

Keywords: *stray cat; feline immunodeficiency virus; feline leukaemia virus*

Úvod

Populácie túlavých mačiek sú rezervoárom viacerých infekčných a parazitárnych ochorení. V analýze epizootologickej situácie v populáciách túlavých mačiek na území východného Slovenska sme sa preto zamerali na dve ochorenia (vírus leukémie mačiek – FeLV a vírus imunodeficiencie mačiek – FIV), ktoré výrazne ovplyvňujú ich zdravotný stav. FIV bol izolovaný v roku (Yamamoto, 2010). FIV je zaradený do čeľade *Retroviridae*, rod *Lentivirus* (Levy, 2009). Spôsobuje chronické, smrteľne prebiehajúce ochorenie mačiek a ďalších felidov. Výskyt infekcie sa markantne zvyšuje s vekom najmä u kocúrov s možnosťou voľného pohybu (Horzinek a kol., 2003). Hlavnou cestou prirodzeného prenosu infekcie u dospelých zvierat je prenos vírusu slinami pohryzním alebo poškriabaním. Štádium akútnej infekcie je charakterizované súborom nešpecifických príznakov ako je anémia, gingivitída, uveitída, konjunktivitída, pyoderma, depresia a hnačka. Štádium asymptomatického nosičstva môže trvať mesiace až roky. (Svoboda a kol., 2001). Štádium komplexu zdravotných komplikácií podobných ochoreniu AIDS u ľudí, je charakterizované chronickými sekundárnymi infekciami a oportúnnymi infekciami. Postihnutá je predovšetkým ústna dutina, dýchací aparát a príležitostne i tráviaci trakt (Horzinek a kol., 2003). V terminálnom štádiu dochádza k rozvoju patologických procesov, podmienených úplným zlyhaním prirodzenej imunity. Toto štádium trvá 6-12 mesiacov a končí úhynom (Svoboda a kol., 2001). V diagnostike FIV sa využíva detekcia protilátok pomocou ELISA metódy alebo imunochromatografia. Pre potvrdenie pozitívnych výsledkov je možné využiť Western Blot. PCR analýza je problematická, z dôvodu viacerých subtypov a vysokého stupňa mutácií.

FeLV prvýkrát popísal Jarrett s kolektívom v roku 1964 (Jarrett a Ganiere, 1996). Infekcia sa prenáša oronazálnou cestou, najčastejšie slinami a nosnými sekrétmi pri vzájomnej starostlivosti a vzájomným zdieľaním misiek na jedlo a vodu. Vertikálny prenos má len druhoradý význam (Hofmann-Lehmann a kol., 2001). V slinách je vyššia koncentrácia vírusu ako v plazme, okrem toho sa vírus prenáša trusom, mliekom a močom. Je možný aj iatrogénny prenos alebo prenos transfúziou krvi od infikovaných mačiek. (Hartmann, 2006). Prameňom nákazy sú mačky pri perzistentnej infekcii (Horzinek a kol., 2003). Komplex vírusovej leukémie zahŕňa lymfoproliferatívne a orgánové nádorové ochorenie, narušenie hemopoézy a imunodeficiencie (Svoboda a

kol., 2001). Priebeh ochorenia a klinické príznaky závisia od imunitného stavu mačky, jej veku a tiež patogenity, virulencie a titra vírusu (Hartmann, 2006). V diagnostike FeLV sa bežne využíva antigen-ELISA test na detekciu p27 antigénu vírusu. Ďalej je možné využiť imunofluorescenciu alebo PCR.

Materiál a metódy

Od začiatku roka 2013 analyzujeme epizootologickú situáciu v populáciách túlavých mačiek na území mesta Košice. Následne chceme zmapovať epizootologickú situáciu vo viacerých mestách východného Slovenska. Odchyt mačiek je realizovaný v spolupráci so súkromným veterinárnym lekárom, ktorý je držiteľom povolenia na odchyt túlavých, resp. zabehnutých psov a mačiek. Medzi 14. 1. 2013 až 21. 1. 2013 prebiehal odchyt mačiek v mestskej časti Nad Jazerom a od 4. 2. 2013 do 8. 2. 2013 v mestskej časti Staré mesto. Na odchyt boli použité živolovné pasce, kontrolované 2x denne. Ako krmivo poslúžila konzerva pre mačky. Po odchyte boli mačky umiestnené do karanténneho boxu s tlmeným svetlom. Mačkám bola odobratá potrava po dobu 12 – 24 hodín. Následne bola použitá sedácia medetomidín hydrochlorid 0,1mg/kg intramuskulárne. Krv bola od mačiek odoberaná z *vena cephalica* a *vena jugularis*. Pri vyšetrovaní sme používali Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit.

Výsledky

Už počas prvého odchytu realizovaného v Košiciach na sídlisku Nad Jazerom sa nám podarilo odchytiť prvého kocúra pozitívneho na FIV aj FeLV a dve pozitívne mačky na FeLV. Kocúr bol dospelý, agresívny, s viacerými poraneniami po tele spôsobenými súbojmi z inými mačkami. U kocúra bola zistená kachexia, gingivitída a mukopurulentný výtok z očí a nosa. Po prevezení do karantény trpel hnačkami. Po zistení pozitívnych výsledkov bola odporúčaná eutanázia. Mačky pozitívne na FeLV nevykazovali známky ochorenia. Boli socializované, inprintované na človeka. Následne boli ponúknuté na adopciu s upozornením na ich pozitívny FeLV test. Prehľad počtu odchytých mačiek a výsledky vyšetrení uvádza tabuľka 1 a 2.

Tabuľka 1: Výsledky z odchytu mačiek – Nad Jazerom (14. 1. 2013 až 21. 1. 2013).

	Počet odchytých mačiek	Počet FIV pozitívnych mačiek	Počet FeLV pozitívnych mačiek	Počet mačiek pozitívnych na FIV aj FeLV
Kocúry	1	1	1	1
Mačky	7	0	2	0
Spolu	8	1	3	1

Zdravotný stav mačiek bol na sídlisku Nad Jazerom viditeľne horší ako v Starom meste, avšak počet odchytých mačiek na porovnanie je stále malý. Najväčším problémom tohto sídliska je dokrmovanie takýchto túlavých mačiek – tzv. Syndróm starých žien, ktorý napomáha rozmnožovaniu takýchto túlavých mačiek.

Tabuľka 2: Výsledky z odchytu mačiek – Staré mesto (4. 2. 2013 do 8. 2. 2013).

	Počet	FIV+	FeLV+	FIV a FeLV+
Kocúry	3	0	0	0
Mačky	4	0	0	0
Spolu	7	0	0	0

Pri koprologickom vyšetrení všetkých mačiek bola zistená *Toxocara cati* +++ a u mačiek zo sídliska Nad Jazerom aj *Alurostrongylus abstrusus* +.

Diskusia

V EU sú zaznamenané subtypy FIV B, A, C so séroprevenciou medzi 2,2 – 23% v závislosti od krajiny (Yamamoto, 2010). Štúdiá vykonaná na Slovensku v 9 okrskoch u 109 mačiek potvrdila séroprevenciu FIV u 4,5% a FeLV u 2% mačiek (Ondrejka a kol., 2009). Táto séroprevencia FIV aj FeLV je štatisticky vypracovaná u domácich mačiek, ktoré majú majiteľa. Zväčša ide o tzv. free-roomingové mačky, ktoré dochádzajú do kontaktu s populáciou túlavých mačiek, alebo aj z mačkami ferálnymi. Nami doposiaľ odchytenými 15 mačkami sme potvrdili výskyt FIV aj FeLV u túlavých mačiek.

Záver

Údaje o séroprevencii túlavých a ferálnych nie sú známe. Je preto nesmierne dôležité vypracovať takúto epizootologickú analýzu práve v chovoch túlavých a ferálnych mačiek a porovnať ju s nákazovou situáciou v chovateľských staniach.

Literatúra

- HARTMANN, K. Antiviral and immunodulatory chemotherapy. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd edition*. Elsevier Saunders, St. Louis, USA. 2006, s. 10-25.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J.B.; GRUBER, S.; BORETTI, F.; SIGRIST, B.; LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *The Journal of general virology*. 2001, vol. 82, no. 7, s. 1589–1596.
- HORZINEK, M.C.; SCHMIDT, V.; LUTZ, H. et al. *Choroby mačiek*. Originál: *Krankheiten der Katze, 3/e*. Pro-Trade, s. r. o. Šťastná 7, Bratislava. 2003, s. 814.
- JARRETT, O.; GANIERE, J.P. Comparative studies of the efficacy of a recombinant feline leukaemia virus vaccine. *Veterinary Record*. 1996, vol. 138, s. 7–11.
- LEVY, L.S. Advances in Understanding Molecular Determinants in FeLV Pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008, 15, vol. 123(1-2), s. 14–22.
- LEVY, J.K. Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. In: MILLER, L.; HURLEY, K. *Infectious Disease Management in Animal Shelters*. Edition first published, Wiley-Blackwell, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. 2009, s. 398.
- MATTEUCCI, D.; BALDINOTTI, F.; MAZZETTI, P.; PISTELLO, M.; BANDECCHI, P.; GHILARDUCCI, R.; POLI, A.; TOZZINI, F.; BENDINELL, M. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, vol. 31, s. 494-501.
- ONDREJKA, R.; SLEPECKÁ, E.; ONDREJKOVÁ, A.; SŮLI, J.; POŠIVÁKOVÁ, S.; BENÍŠEK, Z.; PROKEŠ, M. Survey of the feline AIDS prevalence in the Slovak Republic. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*. 2009, vol. 1, s. 1–6.
- SVOBODA, M. a kol. *Nemoci psa a kočky – II. díl*. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat (ČAVLMZ), Brno: Noviko. 2001, s. 1083-1157.
- YAMAMOTO, J.K. Bovine and Feline Immunodeficiency Viruses. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. *Desk Encyclopedia of Animal and Bacterial Virology*. Academic Press in an imprint of Elsevier Linacre House. 2010, s. 50-57.

Kontaktná adresa: Peter Čechvala, MVDr., Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, cechvala@uvlf.sk

Papillomatosis of the roe deer (*Capreolus capreolus*)

¹Král Jiří, ¹Píkula Jiří, ¹Band'ouchová Hana, ¹Ondráček Karel, ¹Osičková Jitka, ¹Škochová Hana, ¹Kováčková Veronika, ¹Brichta Jiří, ²Škorič Miša, ³Kulich Pavel

¹ Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

² Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

³ Veterinary Research Institute Brno

Summary

Papovaviridae are very important pathogens of mammals and birds. They are characterized by their ability to form benign tumors (papillomas) or formation of latent or chronic infections, the oncogenic properties to take effect after infection of other animal species. The first mention of the positive specimens come from Hungary, Croatia and Austria. Here was based on PCR diagnostics identified papillomavirus (CcPV1) specific for roe deer. Total were examined tissue samples from eight individuals roe deer (*Capreolus capreolus*) aged 3-8 years and two younger than 1 year. To identify the source of papillomas was used a combination of laboratory diagnostics consisting of histology, electron-microscopic examination (negative staining method, the method of ultrathin sections) and nested PCR. Using nested PCR were investigated lesions in 10 individuals. In eight cases CcPV1 was found.

Keywords: papillomatosis; fibromatosis; fibropapillomatosis; roe deer; *Capreolus capreolus*

Introduction

Representatives of the family Papovaviridae are very important pathogens of mammals and birds. They are characterized by their ability to form benign tumors (papillomas) or formation of latent or chronic infections, the oncogenic properties to take effect after infection of other animal species. The most important viruses of this family are the representatives of the genus Papillomavirus. It is non-enveloped, icosahedral, size 50-55nm, containing circular doublestrand DNA having 7.4 to 8.6 kb (Erdelyi et al., 2009). The virus is relatively resistant to temperatures from – 70°C to 80°C, is sensitive to UV, and formaldehyde. Transmission is possible through direct contact or indirectly newly infected subjects and blood sucking arthropods.

Currently, attention is drawn to papillomatosis, fibropapillomatosis or fibromatosis of game, especially for members of the family Cervidae, hence the roe deer (*Capreolus capreolus*). The first mention of the positive specimens come from Hungary, Croatia and Austria. Here was based on PCR diagnostics identified papillomavirus (CcPV1) specific for roe deer (Erdelyi et al., 2009). Now the papillomatosis deer is very well discussed problem in the Czech Republic.

Material and Methods

In cooperation with the users of hunting grounds immediately after the blast were sampled skin lesions - papillomas and ectoparasites. Total were examined tissue samples from eight individuals roe deer (*Capreolus capreolus*) aged 3-8 years and two younger than 1 year. To identify the source of papillomas was used a combination of laboratory diagnostics consisting of histology, electron-microscopic examination (negative staining method, the method of ultrathin sections) and nested PCR. Ectoparasites were subjected to nested PCR and electron microscopy.

Tissue samples for histological examination were fixed in 10% formaldehyde solution for electron microscopy in 3% glutaraldehyde (method ultrathin sections) and 4% paraformaldehyde (negative staining method). Tissue for examination nested PCR were stored at -20 ° C. Ectoparasites were retained in the cooler temperatures.

For the nested PCR primers were used as described by CcPV1 virus (Erdelyi et al., 2008).

Results

Results are achieved knowledge about papillomas occurring in the population of roe deer (*Capreolus capreolus*). The most important finding is the determination of the type of papillomavirus (CcPV1) in affected individuals roe deer.

Using nested PCR were investigated lesions in 10 individuals. In eight cases CcPV1 was found (Table 1). Histological examination confirmed the presence of papillomavirus.

Table 1: Nested PCR detection.

Sex	Weight (kg)	Age (year)	Lesion size (cm)	Papilomavirus
male	15	6	1	+
			6	+
male	16	5	4	+
male	14	3	3	+
female	16	8	3	+
			4	+
female	14	6	10	+
female	12	5	12	+
female	14	4	5	+
female	14	4	3	+
male	9	0,5	0	-
female	8	0,5	0	-

Discussion

For the diagnosis method was used nested PCR, histology and electron microscopy. Of these methods, the least informative method showed electron microscopy, as this virus detection is very difficult. Histological examination has a high predictive value. The most sensitive and accurate method is PCR. For the refinement of interpretation will be sent to the sequenced samples.

Conclusion

Severity of the disease depends mainly on the location and size of the tumor changes. It self is not a disease for individuals serious health risk if no injury units and their infection. The adverse impact of rising fibropapillomas around the eyes, which make it difficult to focus vision, or growing up around the oral opening. Such are the cause of

the reduction to stop eating, especially if they are injured, or grow larger. These pieces are perishing from hunger and exhaustion.

Acknowledgment

The present study was supported by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Grant No. IGA VFU Brno 2012 (26/2012/FVHE).

References

ERDELYI, K; BALINT, A; DENCISO, L; DAN, A; URSU, K. Characterisation of the first complete genome sequence of the roe deer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. *Virus Research*, 2008, vol. 135, p. 307-311.

ERDELYI, K; DENCISO, L; LEHOCZKI, R; HELTAI, M; SONKOLY, K; CSANYI, S; SOLYMOSI, N. Endemic papillomavirus infection of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Veterinary Microbiology*, 2009, vol. 138, p. 20-26.

Contact address: Jiří Král, MVDr., Veterinary Ecology and Environment Protection, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10010@vfu.cz

Editace:	Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. MVDr. Šárka Cupáková, Ph.D.
Název:	XV. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Počet stran:	202
Vydání:	1.
Datum vydání:	květen 2013
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
ISBN:	978-80-7305-650-6