

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav hygieny a technologie mléka

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

A

KOORDINAČNÍ MÍSTO PRO VĚDECKOU A TECHNICKOU  
SPOLUPRÁCI S EFSA V ČR, MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



# XVI. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VFU Brno, 28. 5. 2014

---

Brno 2014

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

Elektronický sborník je dostupný na URL: <http://fvhe.vfu.cz/konference/Sborniky.html>  
ISBN 978-80-7305-670-4

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

## OBSAH

### SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

<b>The impact of ternary mixtures composed of sodium phosphate and citrate salts on processed cheese spreads hardness</b>	
Salek R.N., Černíková M., Nagyová G., Bačová H., Minarčíková L., Buňka F. ....	7
<b>Senzorické hodnotení tavených sýrových analogů</b>	
Sůkalová K., Vítová E., Buňka F. ....	10
<b>Vliv sacharózy na údržnost tvarohu při 8 °C v běžné atmosféře a atmosféře oxidu uhličitého</b>	
Vlášek V., Langová J. ....	13
<b>Glass transition tests for skimmed milk powder on DSC and DTA devices</b>	
Langová J., Vlášek V., Štencel J. ....	16
<b>Mikrobiologická kvalita syrového mléka na území České republiky</b>	
Bogdanovičová K., Skočková A., Koláčková I., Karpíšková R. ....	19
<b>Occurrence of <i>Enterococcus</i> spp. isolated from the whey</b>	
Lačanin I., Dušková M., Kladnická I., Bogdanovičová, K., Karpíšková R. ....	22
<b>Antibiotická rezistencia mikroorganizmov rodu <i>Enterococcus</i> izolovaných z farmového ovčieho mlieka a ovčej hrudky</b>	
Vrabec M., Gallo J., Dudříková E. ....	25
<b>Prežitie <i>Listeria monocytogenes</i> v mäkkom syre vyrobenom z pasterizovaného kozieho mlieka</b>	
Gallo J., Vrabec M., Dudříková E., Šmiga L. ....	28
<b>Production of technologically desirable metabolites by lactobacilli isolated from goat's milk</b>	
Klapáčová L., Slottová A., Bujňáková D., Kološta M., Dudříková E., Tomáška M. ....	31
<b>Characterization of <i>Cronobacter</i> spp. isolated from fruit, vegetable, water and environmental swabs in the Czech Republic</b>	
Vojkovská H., Karpíšková R., Oriesková M., Drahovská H. ....	34
<b>Identifikácia probiotických baktérií izolovaných zo pstruha dúhového</b>	
Fečkaninová A., Popelka P., Mudroňová D., Koščová J., Javorský P. ....	38
<b>Stanovenie rezistencie druhovo identifikovaných izolátov stafylokokov z mäsa králiká divého (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) voči vybraným antibiotikám</b>	
Marušková K., Pipová M., Jevinová P., Kmeť V., Regecová I. ....	41
<b>Chemical and microbiological parameters determining shelf-life of sausages with fish meat (<i>Cyprinus carpio</i> L.)</b>	
Kašpar L., Buchtová H., Hulánková R. ....	44
<b>Výskyt reziduí tetracyklinových antibiotík v syrovém kravském mléce</b>	
Kellnerová E., Navrátilová P., Borkovcová I. ....	47
<b>Screening reziduí kokcidiostatík v tkanivách brojlerových kurčiat</b>	
Poláková Z., Kožárová I., Gondová Z. ....	50

---

<b>Stanovenie salinomycínu v krmive pre hydinu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV detekciou</b>	
Maďarová M., Kožárová I., Kukura V. ....	53
<b>Screening rezíduí antibiotík v živočíšnych matriciach s použitím mikrobiálnych inhibičných testov</b>	
Gondová Z., Kožárová I., Poláková Z. ....	56
<b>Classification of raw material and their effect on selected textural and colour properties of cooked ham</b>	
Bednářová M., Kameník J., Saláková A., Tremlová B. ....	59
<b>Zastoupení DBP a DEHP v obalech masných výrobků</b>	
Bogdanovičová S., Jarošová A., Kameník J. ....	62
<b>Vliv doby skladování na reologické vlastnosti vaječných tekutin</b>	
Strnková J., Nedomová Š., Buchar J., Kumbár V. ....	65
<b>Možnosť náhrady fosforečnanov amarantovou múkou pri výrobe jemne mletých mäsových výrobkov</b>	
Plšková M., Gál R., Buňka F. ....	68
<b>Impact of vacuum frying on quality of potato crisps and frying oil</b>	
Bělková B., Čápková H., Hradecký J., Hajšlová J. ....	71
<b>Senzorická kvalita biologicky kypřeného bezlepkového pečiva</b>	
Masaříková L., Kulhanová S., Dvořák M., Burešová I. ....	74
<b>The development of image analysis methods for the evaluation of selected quality parameters of food animal origin</b>	
Čáslavková P., Pospiech M., Štarha P., Kameník J., Saláková A., Tremlová B., Řezáčová Lukášková Z. ....	77
<b>SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ</b>	
<b>Zastoupení skupin mastných kyselin v celých tělech bažantů v průběhu jejich růstu</b>	
Jakešová P., Zapletal D. ....	82
<b>SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE</b>	
<b>17β-estradiolem modifikované liposomy jako nanotransportér pro antisense terapii ER+ rakoviny prsu – <i>in vitro</i> studie s MCF-7 nádorovou linií</b>	
Heger Z., Masařík M., Beklová M., Zitka O., Adam V., Kizek R. ....	87
<b>Wastewater as source of musk fragrances</b>	
Komárková P., Vávrová M. ....	90
<b>Occurrence of selected bisphenols in surface water</b>	
Tesařová S., Vávrová M., Charvátová M. ....	93
<b>Lead poisoning in avian embryos and the use of ethylenediaminetetraacetic acid in therapy</b>	
Hrubá H., Mikšíková M., Ondráček K., Osičková J., Kováčová V., Pikula J., Bandouchová H. ....	96

<b>Impact of Pt, Pd and Rh on the soil invertebrate <i>Folsomia candida</i></b>	
Němcová B., Beklová M. ....	99
<b>Fylogeografia kliešť'a <i>Hyalomma aegyptium</i></b>	
Kautman M., Dvořáková N., Šíroky P. ....	102
<b>Prevalence and antibiotic resistance of <i>Salmonella</i> in large corvids of Europe and North America</b>	
Janecko N., Čížek A., Halová D., Karpíšková R., Myšková P., Literák I. ....	105
<b>Plazmidově kódovaná rezistence k cefalosporinům a fluorochinolonům u izolátů <i>Escherichia coli</i> z havrana polního (<i>Corvus frugilegus</i>) zimujícího v Evropě</b>	
Jamborová I., Dolejská M., Vojtěch J., Guenther S., Uricariu R., Drozdowska J., Papoušek I., Meissner W., Hordowski J., Čížek A., Literák I. ....	108
<b>Plazmidově kódovaná rezistence k chinolonům u <i>Aeromonas</i> spp. z ornamentálních ryb</b>	
Dobiášová H., Kutilová I., Piačková V., Veselý T., Čížek A., Dolejská M. ....	111
<b>Kolonizácia vankomycín rezistentnými enterokokmi u krkavcovitých vtákov v Európe a v Severnej Amerike</b>	
Oravcová V., Zurek L., Ghosh A., Guenther S., Townsend A., Clark A., Ellis J., Janecko N., Masaříková M., Literák I. ....	114
<b>Rickettsiae in ornitophilic ticks <i>Ixodes arboricola</i> and <i>Ixodes lividus</i> from the Czech republic and Slovakia</b>	
Nováková M., Bulková A., Borges C.F., Krause F., Kristin A., Krist M., Heneberg P., Bahía L.M., Literák I. ....	117
<b>SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT</b>	
<b>Effect of heat stress on plasma neopterin and biopterin in broilers with probiotic supplementation</b>	
Želinská G., Bedáňová I., Maršálek P., Plhalová L., Chloupek J., Voslářová E. ....	122
<b>Behaviour patterns of pheasant hens kept in enriched cages during the laying period</b>	
Hrabčáková P., Radisavljevic K., Voslářová E., Bedáňová I. ....	125
<b>The content of polyamines (spermine and spermidine) in the muscles of selected kinds of wild animals</b>	
Hutařová Z., Večerek V. ....	128
<b>SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN</b>	
<b>Monitorování obsahu PAH na vybraných tocích České republiky s využitím biochemického markeru 1-hydroxypyrenu</b>	
Divišová L., Blahová J., Kodeš V., Leontovyčová D., Mach S., Ocelka T., Svobodová Z. ....	133
<b>Evaluation of norfloxacin toxicity for zebrafish (<i>Danio rerio</i>) targeting on selected biomarkers of oxidative stress</b>	
Bartošková M., Dobšíková R., Stancová V., Pána O., Živná D., Plhalová L., Blahová J., Maršálek P. ....	136

<b>Determination of oxidative stress parameters in early life stages of common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) after subchronic exposure to ciprofloxacin</b> Živná D., Plhalová L., Prášková E., Chromcová L., Blahová J., Maršálek P., Štěpánová S., Svobodová Z. ....	139
<b>Hodnocení míry kontaminace psů rtuť pomocí analýzy srsti</b> Král T., Blahová J., Sedláčková L., Svobodová Z. ....	142
<b>SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD</b>	
<b>Výskyt hlístice <i>Raphidascaris acus</i> u lososovitých ryb chovaných v recirkulačním systému dánského typu</b> Soukupová Z., Palíková M., Navrátil S. ....	147
<b>Fenotypizace leukocytů u sivenů amerických (<i>Salvelinus fontinalis</i>) s využitím průtokové cytometrie</b> Cutáková Z., Soukupová Z., Palíková M., Ondráčková P. ....	150
<b>Biodiversity and phylogenetic relationships of blood parasites in freshwater turtles from Southeast and East Asia</b> Dvořáková N., Kautman M., Široký P. ....	153
<b>Parasite-mediated coexistence</b> Šmiga L., Košuthová L., Košuth P., Koščo J., Halačka K., Manko P., Ševc J., Oberhauserová K., Kočíšová J., Fedorčák J., Falatová L., Oros M., Barčák D., Lazar P. ....	156
<b>Nové druhy netopýrů postižené plísní <i>Pseudogymnoascus destructans</i></b> Kováčová V., Bandřouchová H., Brichta J., Ondráček K., Osičková J., Pikula J. ....	159

# **SEKCE 1**

*Hygiena a technologie potravin*





## The impact of ternary mixtures composed of sodium phosphate and citrate salts on processed cheese spreads hardness

Salek Richardos Nikolaos, Černíková Michaela, Nagyová Gabriela, Bačová Helena, Minarčíková Lucie, Buňka František

*Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně*

### Summary

*The scope of this study was to describe the dependence of hardness of processed cheese spreads on the composition of ternary mixtures of emulsifying salts (trisodium citrate (TSC), disodium hydrogenphosphate (DSP), tetrasodium diphosphate (TSPP), and sodium salt of polyphosphate (P20)) after a 30 day storage period. Three types of ternary mixtures (DSP:TSPP:TSC; DSP:TSC:P20; TSC:TSPP:P20) were studied and their composition was utilized at shifting proportions with a step of 20%. The effects were studied in samples (i) with pH adjustment (target values within the interval of 5.60–5.80); and, (ii) without pH adjustment. All analyses were performed after 30 days of storage at 6 °C. At constant P20 content ( $\leq 60\%$ ) in the ternary mixture an increase on hardness was observed at a DSP:TSPP ratio ( $\sim 1:1-3:4$ ). Moreover, when ternary mixtures with TSC and TSPP were used (at zero content of the rest of salts in the ternary mixture), the products consisting of TSC and TSPP ( $\sim 1:1$ ) were the hardest. The pH adjustment led to a significant change in the absolute values of hardness of the processed cheese spreads.*

**Keywords:** *emulsifying salts; citrate salts; phosphate salts; processed cheese; hardness*

### Introduction

Processed cheese (PC) is a dairy product manufactured by agitating and heating the mixture of raw materials (cheeses, water, dairy and non-dairy ingredients) in the presence of emulsifying salts (ES), until a smooth and homogeneous matrix is formed [1]. Factors including type and maturity degree of the used cheese, type and concentration of the ES, pH of the melt, processing conditions, dry matter and fat contents have high impact on the functional and textural characteristics of PC. Ingredients of essential importance during the PC manufacture are ES. Their addition significantly contributes to the PC matrix formation. Additionally, their main role lies on improving the emulsifying capacity of the proteins already present in cheese by sequestering calcium from the casein matrix [2, 3, 4]. The aim of this study was to compare the hardness of model PC samples containing ternary mixtures of phosphate (disodium hydrogenphosphate – DSP; tetrasodium diphosphate – TSPP; sodium salt of polyphosphate – P20) and citrate (trisodium citrate – TSC) emulsifying salts during a 30-day storage period.

### Materials and Methods

For the manufacture of the model PC samples (40% w/w dry matter, 50% w/w fat in dry matter), the following ingredients were applied: Edam cheese (50% w/w dry matter, 30% fat in dry matter, 7 weeks maturity;), butter (84% w/w dry matter, 82% w/w fat), water and 3% w/w emulsifying salts. The applied ES were disodium hydrogenphosphate (DSP), tetrasodium diphosphate (TSPP), sodium salt of polyphosphate with the mean of length  $n \approx 20$  (P20) and trisodium citrate (TSC). Three types of ternary mixtures were applied: DSP:TSC:P20; DSP:TSPP:TSC and TSC:TSPP:P20. Every type of mixture was utilized at shifting proportions of a 20% step including some ratios with 50% of some salts. Subsequently, model PC samples were manufactured with pH adjustment (target values within the range of 5.60 to 5.80) identically to the samples without pH adjustment, using NaOH or HCl ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ). The model PC samples were manufactured using a Vorwerk Thermomix TM 31-1 (Vorwerk & Co., GmbH, Wuppertal, Germany). The same device was also used by Lee et al. (2004) [6].

As packaging material were used polypropylene cups sealed with aluminium lids. Finally, the samples were cooled and stored at  $6 \pm 2$  °C for 30 days. The analyses were performed on the 30<sup>th</sup> day of storage ( $6 \pm 2$  °C; 1<sup>st</sup> day was the production day). The dry matter content was determined according to ISO 5534 (2004). Moreover, the pH values were determined inserting a glass tip electrode of a calibrated pH-meter (pH Sper, Eutech Instruments, Oakton, Malaysia) directly into the sample. A texture analyser TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Ltd., Godalming, UK) was used to measure the samples hardness by penetrating a probe (diameter 20 mm, strain of deformation 25%, speed 2 mm s<sup>-1</sup>).

### Results and Discussion

The dry matter contents of all examined samples, ranged from 40.58-40.86% w/w. The samples consisting of DSP, TSPP and TSC individually had the highest pH values ( $> 6.40$ ;  $P < 0.05$ ). The pH of the samples containing only P20 ranged in the interval from 5.31 to 5.36. The increasing proportion of P20 in the mixture caused a gradual decrease of the pH ( $P < 0.05$ ), which is in accordance with the work of Lu et al. (2008) [5]. The actual achieved pH values of the samples which were subjected to pH adjustment (target values 5.60-5.80), ranged within the interval 5.68-5.82.

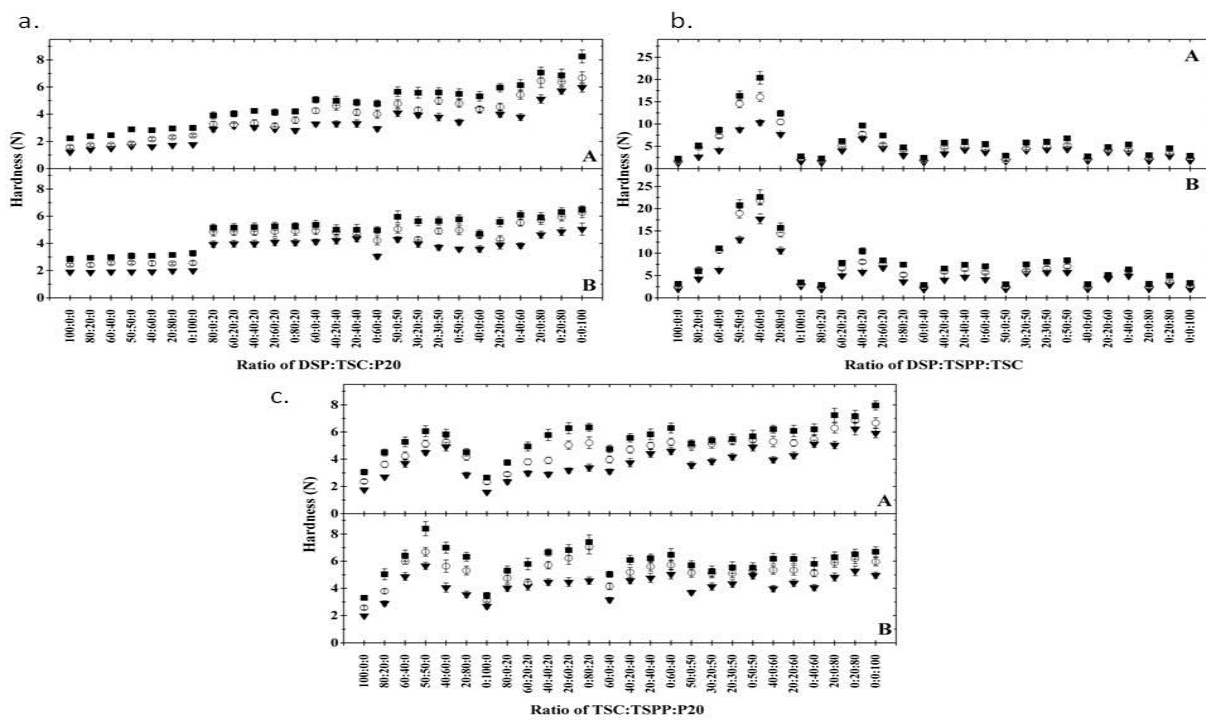


Figure 1: The dependence of processed cheese hardness (N) on the relative amount (in percentage; axis x) of phosphate and citrate salts in a ternary mixtures during 30-day storage at 6°C (▼ – the 2<sup>nd</sup> day; ○ – the 9<sup>th</sup> day; ■ – 30<sup>th</sup> day). Part A – without pH-adjustment; part B – with pH adjustment; a. DSP:TSC:P20, b. DSP:TSPP:TSC, c. TSC:TSPP:P20. The results are expressed as means and standard deviation (n = 6).

The results obtained when mixtures of DSP:TSC:P20 were applied (Fig. 1), showed that with a rising proportion of TSC and P20 to the detriment of DSP, caused the samples hardness increase. The hardness results of the samples composed of TSC:TSPP:P20 are illustrated in Fig. 1. At zero levels of P20 and at a ratio of TSC:TSPP ( $\approx 1:1$ ) were observed the hardest samples. However, any deviation from this ratio resulted in hardness decrease. On the other hand, with the increasing proportion of P20 in the mixture the hardness of the samples increased ( $P < 0.05$ ). Moreover, at constant levels of P20 and the decreasing content of TSC

resulted in the samples hardness decrease ( $P < 0.05$ ). In case of mixtures composed of DSP:TSPP:TSC (Fig. 1) the specific ratio of DSP:TSPP ( $\approx 1:1-3:4$ ) was identified, leading to a significant hardness increase. However, the impact of this ratio rapidly decreased with the decreasing proportions of DSP and TSPP and increasing proportion of TSC ( $P < 0.05$ ). Furthermore, even at 40% levels of TSC the influence of this ratio on the samples hardness was insignificant ( $P < 0.05$ ). In addition, if the concentration of TSC was higher than 40% (in the mixture), the hardness of the samples increased with the rising content of TSPP and TSC and with the decreasing levels of DSP. With the increasing concentrations of DSP in the mixture, however, the influence of the ratio of TSC:TSPP on the samples hardness was almost negligible. With increasing the chain-length of the sodium salts of polyphosphates the ability of ion exchange enhances. More intensive casein dispersion allows them to develop their emulsifying and hydrating abilities and thus stabilize the present water and fat in the mixture. The increasing range of protein hydration and fat emulsification increases the intensity of the interactions in the melt and in this way the casein cross-linking intensity [2, 7]. The process of casein dispersion is not sufficient explaining the specific ratio of DSP:TSPP ( $\approx 1:1 - 3:4$ ), in which a rapid increase in the samples hardness occurred. The relationship of the samples hardness decrease at a ratio of DSP:TSPP ( $\approx 1:1 - 3:4$ ) and simultaneously increasing the P20 concentration, could be located in the ability of polyphosphates charging caseins with negative ions [2, 5]. The effect of the ternary mixture composition containing TSC on the samples hardness might be explained by the ability of the mixture to disperse casein, however, only at the binary mixtures of TSC and TSPP (at 0 levels of the 3<sup>rd</sup> substance in the mixture). However, TSC does not bond with caseins and does not participate in the cross-linking process of the casein matrix [2, 5, 7]. In case of binary mixtures of TSC and TSPP the specific ratio 1:1 was observed which could be the reason of the hardness samples increase. A possible explanation could be that diphosphates (TSPP) are effective in promoting casein gel formation, however, only if they are in optimal concentration related to the protein content. Nevertheless, TSC addition can control the TSPP concentration so that it reaches its optimal level and thus supporting gel formation [2, 5, 7].

### Conclusion

The ternary mixtures consisting of TSC ( $\geq 40\%$ ) resulted in product increasing hardness with the increasing contents of TSPP and TSC and decreasing contents of DSP. The pH values adjustment to the optimal range resulted in significant changes in the values of hardness of the PC samples.

### Acknowledgement

This work was supported by a project of the internal grants of Tomas Bata University in Zlin, Czech Republic no IGA/FT/2013/010 funded from the resources for specific university research.

### References

1. GUPTA et al. (2007). *Journal of Dairy Science*, 67, 764–778.
2. MIZUNO, R. & LUCEY, J. A. 2007. *Journal of Dairy Science*, 90, 4524–4531.
3. DIMITRELI, G. & THOMAREIS, S. 2009. *International Journal of Food Properties*, 12, 261–275.
4. CUNHA, C. R. & VIOTTO, W. H 2010. *Journal of Food Science*, 75, 113–120.
5. LU et al. (2008). *Journal of Food Science*, 73, 363–369.
6. LEE et al. (2004). *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 763–771.
7. KALIAPPAN, S. & LUCEY, J. A. 2011. *Journal of Dairy Science*, 94, 4255–4263.

**Contact address:** Richardos Nikolaos Salek, Ing., Department of Food Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T. G. Masaryka 275, Zlín, rsalek@ft.utb.cz.

## Senzorické hodnocení tavených sýrových analogů Sensory evaluation of processed cheese analogues

<sup>1</sup>Sůkalová Kateřina, <sup>1</sup>Vítová Eva, <sup>2</sup>Buňka František

<sup>1</sup>Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Brno

<sup>2</sup>Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín

### Summary

*This work deal with the influence of the addition of selected vegetable oils on the sensory quality of model samples of processed cheese analogues. The seven-point hedonic scale was used for sensory evaluation of appearance and colour, gloss, texture and taste and aroma (flavour) of samples. The intensity of selected descriptors expressing off-flavour (e.g. sour, oily, bitter, salty, cheesy and others) were then evaluated using profile test. The addition of vegetable oil significantly ( $P < 0,05$ ) influenced sensory properties of processed cheese analogues, especially taste and aroma.*

**Keywords:** processed cheese analogues; flavour; sensory quality

### Úvod

Sýrové a tavené sýrové analogy jsou novodobým trendem v mlékárenství, kdy dochází k částečnému nebo úplnému nahrazení mléčné složky rostlinnou. Důvodem pro výrobu sýrových analogů jsou především nižší náklady na suroviny, nicméně tyto výrobky nabízejí i řadu pozitivních nutričních aspektů, např. vyšší podíl nenasycených mastných kyselin, nižší nebo žádný obsah cholesterolu, redukované množství nasycených tuků a sodíku, nižší obsah kalorií. Díky těmto nutričním výhodám se tavené sýrové analogy stávají vyhledávanými potravinami (Bachmann, 2001; Buňka et al., 2009).

Sýrový flavour je kombinací chuti, vůně a mechanických podnětů v ústní dutině během konzumace a mnohdy je rozhodujícím faktorem přijatelnosti sýra pro konzumenta (Delahunty & Drake, 2004). Senzorické vlastnosti tavených sýrových analogů jsou ovlivňovány řadou faktorů od vlastností a obsahu použitých surovin (druh přírodního sýru, obsah laktosy a tavicích solí, druh rostlinného oleje) přes tavicí proces až po skladovací podmínky (Sunesen et al., 2002; Guinee et al., 2004; Drake et al., 2010). Nahrazením mléčného tuku rostlinnými oleji dochází ke vzniku typických texturních vad, ke zhoršení tavicích vlastností a k vzniku nedostatečného flavouru, toto riziko však může být minimalizováno vhodnou volbou surovin a podmínek výroby. Největší slabinou analogů bývá právě flavour, který je méně výrazný než u klasických výrobků (Bachmann, 2001; Buňka et al., 2009).

Práce se zabývá posouzením vlivu přídatku vybraných rostlinných olejů s vyšším obsahem biologicky aktivních látek na senzorickou jakost modelových vzorků tavených sýrových analogů.

### Materiál a metody

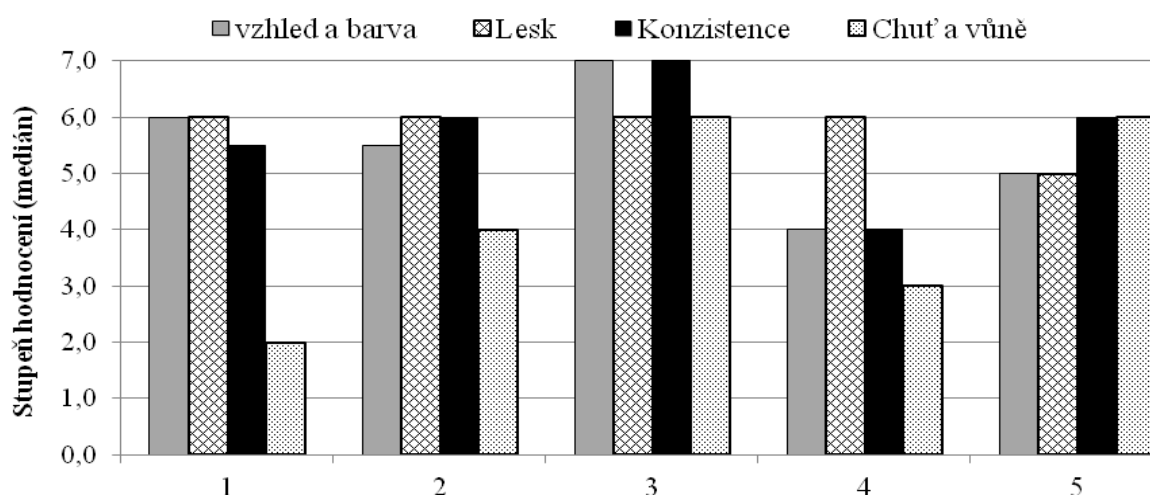
Hlavní surovinou pro výrobu tavených sýrových analogů (40% (w/w) sušiny, 50% (w/w) tvs.) byla eidamská cihla (30% (w/w) tvs.) zralosti 8 týdnů (Kromilk a.s.), máslo (~82% (w/w) sušiny, ~80% (w/w) tvs.), různé druhy olejů (meruňkový, lněný, hroznový a rybízový), tavicí soli (2,5 % (w/w)) a voda. Obsah tuku v sušině konečných výrobků byl 50%. Směs surovin byla zahřívána za stálého míchání na 90°C nepřímým ohřevem a udržována při této teplotě 1 minutu. Roztavená hmota byla plněna do polypropylenových kelímků, uzavřena a uskladněna při teplotě 6±2°C. Vzorky byly hodnoceny druhý den po vyrobení.

Pro senzorické hodnocení byli vybráni a proškoleni studenti FCH VUT v Brně. Jako hlavní ukazatele změn matrice tavených sýrových analogů byly zvoleny senzorické vlastnosti, které

konzumenti u tavených sýrů nejvíce sledují, především textura, barva, lesk a flavour a ty byly hodnoceny pomocí sedmibodové kategorové ordinální stupnice hedonického typu (ČSN ISO 4121); vybrané deskriptory flavouru byly hodnoceny profilovým testem (ČSN EN ISO 13299). Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Kruskal-Wallisova testu ( $\alpha = 0,05$ ). Jako chuťový neutralizátor byla použita čistá voda a bílé pečivo.

### Výsledky a diskuze

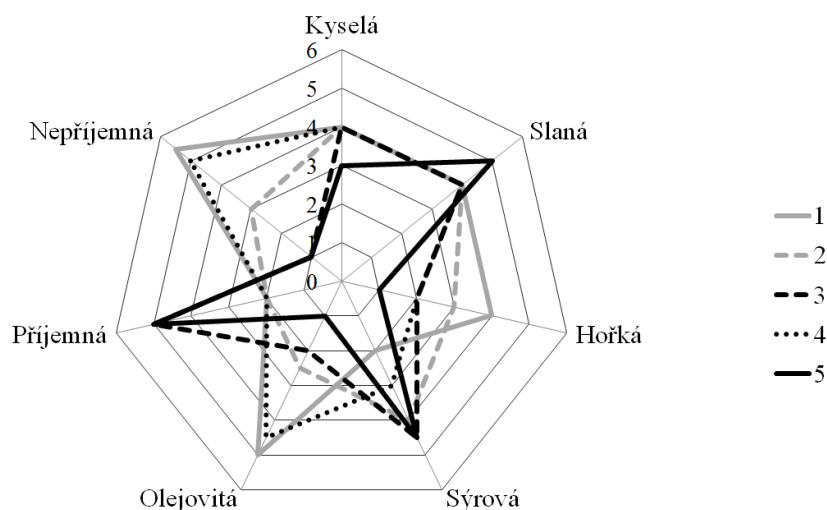
Vybrané senzorní parametry (vzhled a barva, lesk, textura, chuť a vůně) byly hodnoceny pomocí stupnice hedonického typu (1 nepřijatelný  $\Rightarrow$  7 vynikající). Při hodnocení lesku nebyly mezi vzorky shledány významné rozdíly, nicméně byly nalezeny významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) ve vzhledu a barvě. Jako nejhorší byl hodnocen analog s rybízovým olejem, jehož vzhled a barva byly hodnoceny pouze jako dobré, na rozdíl od taveného sýrového analogu s meruňkovým olejem, která byla hodnotiteli označena jako vynikající. Významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) byly zaznamenány také v hodnocení chuti a vůně. Jako nejlepší byl hodnotiteli označen vzorek s meruňkovým olejem, jehož chuť byla označena, podobně jako u standardu, jako výborná. Vzorky s rybízovým a hroznovým olejem byly hodnoceny jako méně dobré až nevyhovující.



Obrázek 1: Srovnání senzorních parametrů tavených sýrových analogů.

(Tavený sýrový analog s 1 - hroznovým olejem, 2 - lněným olejem, 3 - meruňkovým olejem, 4 - rybízovým olejem, 5 - máslem (kontrolní standard))

Při profilovém testu hodnotitelé určovali intenzitu vybraných deskriptorů chuti (kyselá, slaná, hořká, sýrová, olejovitá, příjemná a nepříjemná chuť) pomocí stupnice (1 neznatelná  $\Rightarrow$  7 velmi silná). Při hodnocení kyselé, slané a hořké chuti nebyly mezi vzorky shledány patrné rozdíly, jejich intenzita byla většinou hodnocena jako střední až neznatelná. Významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) byly zaznamenány u hodnocení sýrové, olejovité, příjemné a nepříjemné chuti. Vzorky s hroznovým a rybízovým olejem vykazovaly vysokou intenzitu olejové a nepříjemné (umělé až zatuchlé) chuti. Sýrový analog s meruňkovým olejem byl opět hodnocen jako nejlepší, velmi podobně standardní kontrolní vzorek bez rostlinného oleje.



Obrázek 2: Intenzitní profil chuti tavených sýrových analogů.  
(Tavený sýrový analog s 1 - hroznovým olejem, 2 - lněným olejem, 3 - meruňkovým olejem, 4 - rybízovým olejem, 5 - máslem (kontrolní standard))

### Závěr

Ze sensorického hodnocení tavených sýrových analogů vyplývá, že vzhledem k nepříznivým sensorickým vlastnostem a vzniku nepříjemného olejového, umělého až zatuchlého off-flavouru hroznový a rybízový olej se jeví spíše nevhodný pro výrobu tavených sýrových analogů, na rozdíl od oleje meruňkového, jehož sensorická kvalita je srovnatelná se standardním (klasickým taveným) sýrem obsahujícím pouze máslo.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory Standardního projektu specifického výzkumu č. FCH-S-14-2325.

### Literatura

- BACHMANN, H. P. Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, no. 4-7 pp. 505–515. ISSN 0958-6946.
- BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Základní principy výroby tavených sýrů. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009. 70 s. ISBN 978-80-7375-336-8.
- DELAHUNTY, C. M., DRAKE, M. A. Sensory character of cheese and its evaluation. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2004, vol. 1, no. 3, pp. 455-487.
- DRAKE, S.L., YATES, M.D., DRAKE, M.D. Development of flavour lexicon for processed and imitation cheeses. *Journal of Sensory Studies*. 2010, vol. 25, pp. 720-739.
- GUINEE, T.P., CARIĆ, M., KALÁB, M. Pasteurized Processed cheese and Substitute/Imitation cheese products. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed.). 2004, vol. 2, no. 3, pp. 349–394.
- MARILLEY, L., CASEY, M.G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal Food Microbiology*. 2005, vol. 90, no2, pp. 139-159.
- SUNESSEN, L.O., LUND, P., SORENSEN, J., HAMER, G. Development of volatile compounds in processed cheese during storage. *LWT-Food Science and Technology*. 2002, vol. 35, pp.128–134.

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

## Vliv sacharózy na údržnost tvarohu při 8 °C v běžné atmosféře a atmosféře oxidu uhličitého

### Effect of sucrose on the shelf-life of curd cheese in the ordinary and carbon dioxide atmosphere at 8°C

Vlášek Václav, Langová Jitka

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

#### Summary

*Sucrose is a significant hygroscopic substance. This hygroscopic ability is important in the protection of foods with high value of water activity. The decrease of water activity in food prevents its physicochemical, enzymatic and microbial deterioration. Thus, the effect of this substance is relevant. The effect of the modified atmosphere is also very significant. The modified atmosphere prevents the developing of microorganisms. This work investigates effect of sucrose (5 and 15%) on water activity, dry matter and pH and effect of carbon dioxide atmosphere on sucrose within 17 days of storage. Results show effect of carbon dioxide atmosphere on decreasing effect of sucrose on water activity and this atmosphere influences increasing of dry matter significantly. Sucrose influences water activity significantly. 5% of sucrose decreases water activity from 0.999 to 0.962. However, water activity increases rapidly over storing up to 0.993. 15% of sucrose decreases water activity from 0.999 to 0.980. This value is altered to 0.987 only very slightly. The effect of sucrose on dry matter is the strongest in ordinary atmosphere with 5% sucrose. This leads to decreasing from 27.98 to 38.90% over storage. Values of pH are the most affected in ordinary atmosphere. The addition of sucrose is stabilized in this atmosphere.*

**Keywords:** *hygroscopic substances; water activity; dry matter; pH; modified atmosphere*

#### Úvod

Sacharóza je jednou z látek mající hygroskopický charakter. Tato schopnost je důležitá u potravin s vysokou hodnotou vodní aktivitou a tedy vysokou dostupností vody pro mikroorganismy. Hygroskopický charakter snižuje hodnotu vodní aktivity a z toho vyplývá snížení dostupnosti vody pro mikroorganismy a tedy zvýšení údržnosti potraviny (Cerný *et al.*, 2011). Dalším prvkem bránícím rozvoji mikroorganismů je balení do modifikované atmosféry, která potlačuje rozvoj určité mikroflóry, a v neposlední řadě také chladničková teplota způsobuje zpomalení jejich rozvoje (Robertson, 2013). Tato práce se zaměřila na sledování vlivu sacharózy na snížení vodní aktivity a změnu sušiny a zároveň analyzuje vliv atmosféry oxidu uhličitého na hygroskopické látky.

#### Materiál a metody

Sledován byl tvaroh s obsahem min. 22 % sušiny, min. 6 % tuku v sušině, 16,4 g bílkovin, 5,3 g sacharidů a 2,2 g tuků na 100 g výrobku. Vzorky byly pečlivě odváženy a smíchány s požadovaným množstvím hygroskopické látky a zabaleny do vybrané atmosféry. Experiment probíhal v délce přesahující trvanlivost udávanou na obale, a to po dobu 17 dní. Odběr a měření probíhalo 1., 3., 7., 10., 14. a 17. den. Vzorky byly analyzovány také senzory kvůli viditelnému zaplísnění. Pokud se u vzorku zaplísnění neprojevovalo, tak byla manometrickou metodou měřena vodní aktivita a metodou gravimetrickou s použitím halogenového vysoušení sušina.

### Výsledky a diskuse

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 1–3. Dokazují, že vliv hygroskopických příměsí má výrazný účinek na snížení vodní aktivity, jak uvádí i Gysel *et al.* (2004). Výraznější vliv má však 5% koncentrace sacharózy při krátkodobém skladování. Při dlouhodobém skladování dochází u této koncentrace k postupnému nárůstu vodní aktivity, který nedosahuje hodnot vzorků bez příměsí, ale přesahuje již 3. den v běžné atmosféře a 10. den v atmosféře oxidu uhličitého hodnoty vzorků s 15 % obsahem cukru. Atmosféra oxidu uhličitého u této hygroskopické přísady ovlivňuje negativně schopnost snižovat vodní aktivitu, což je patrné u vzorků s 15 % cukru, kdy dochází k menšímu snížení, než v atmosféře běžné, ovšem stále je výrazné oproti vzorkům bez příměsí.

Tabulka 1: Výsledné hodnoty vodní aktivity u tvarohu bez a s příměsí cukru.

Den	Běžná atmosféra			Atmosféra CO <sub>2</sub>		
	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru
1.	0,999	0,966	0,980	0,999	0,962	0,983
3.	0,999	0,999	0,985	0,998	0,968	0,981
7.	0,995	0,985	0,975	0,999	0,972	0,975
10.	0,999	0,997	0,971	0,999	0,983	0,980
14.	0,999	0,998	0,978	0,997	0,995	0,985
17.	0,999	0,991	0,982	0,998	0,993	0,987

Z tabulky 2 je viditelný vliv přidavku hygroskopických látek na sušinu, kdy podle očekávání dochází k výraznému zvýšení s vyšším přidavkem hygroskopické látky. Nárůst je nejvíce patrný v atmosféře běžné, kdy i v průběhu skladování dochází k výraznému růstu u 5% přidavku cukru a k snížení u 15% přidavku cukru. V tomto případě se jeví jako daleko vhodnější atmosféra oxidu uhličitého, kdy u 5% přidavku cukru dochází k nárůstu v průběhu skladování z 25,64 % na 29,94 % a u 15% přidavku ze 40,15 % na 41,86 %, což poukazuje na daleko stabilnější hodnoty než u běžné atmosféry.

Tabulka 2: Výsledné hodnoty sušiny u tvarohu bez a s příměsí cukru.

Den	Běžná atmosféra			Atmosféra CO <sub>2</sub>		
	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru
1.	24,07 %	27,98 %	46,90 %	23,97 %	25,64 %	40,12 %
3.	25,56 %	28,88 %	33,88 %	24,02 %	28,97 %	39,12 %
7.	33,28 %	37,47 %	42,69 %	23,92 %	29,54 %	40,78 %
10.	24,81 %	28,69 %	34,66 %	23,84 %	30,12 %	41,65 %
14.	40,59 %	28,84 %	37,85 %	23,98 %	29,46 %	42,46 %
17.	23,57 %	38,90 %	43,50 %	24,06 %	29,94 %	41,86 %

Z tabulky analyzující vliv cukru na pH je viditelné, že vyšší hodnota cukru snižuje hodnotu pH, tato hodnota je jen málo ovlivněná vlivem oxidu uhličitého. Ovšem u vzorků bez příměsí je viditelný výrazný vliv modifikované atmosféry na snížení pH. K podobnému výsledku vedla i studie Singh *et al.* (2008).



Tabulka 3: Výsledné hodnoty pH u tvarohu bez a s příměsí cukru.

Den	Běžná atmosféra			Atmosféra CO <sub>2</sub>		
	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru	Bez příměsí	5 % cukru	15 % cukru
1.	4,54	4,56	4,52	4,52	4,57	4,52
3.	4,47	4,59	4,62	4,62	4,65	4,49
7.	4,60	4,54	4,41	4,58	4,58	4,42
10.	4,51	4,48	4,44	4,68	4,62	4,51
14.	5,36	4,57	4,49	4,75	4,61	4,48
17.	5,08	4,53	4,44	4,70	4,52	4,47

### Závěr

Z výsledků vyplývá vhodnost použití příměsí cukru k prodloužení údržnosti vlivem snížení vodní aktivity. Při krátkodobém skladování se jeví jako vhodnější 5% příměs, ovšem pro delší skladování je vhodnější 15% přídavek cukru. Zároveň bylo zjištěno, že atmosféra oxidu uhličitého má vliv na hygroskopické přísady, a to tím způsobem, že snižuje vodní aktivitu u vzorků. Naopak v běžné atmosféře dochází k významnému ovlivnění sušiny díky hygroskopickým přísadám, což atmosféra oxidu uhličitého úspěšně tlumí, zejména u nižšího přídavku cukru, což potvrzuje i studie Zeuthen *et al.* z roku 2003. Vliv cukru na pH je viditelný; čím větší přídavek, tím nižší je hodnota pH, ovšem vliv oxidu uhličitého se v tomto ohledu neprokázal jako významný. Výjimkou je běžná atmosféra, kde vliv oxidu uhličitého na snížení pH je významný.

### Poděkování

Tato práce byla financována z projektu IGA 16/2013/FVHE.

### Literatura

CERNY, CH.; FITZPATRICK, F.; FERREIRA, J. Effect of salt and sucrose addition on the formation of the Amadori compound from methionine and glucose at 40 °C. *Food Chemistry*. 2011, vol. 125, no. 3, s. 973 – 977.

GYSEL, M.; WEINGARTNER, E.; NYEKI, S.; PAULSEN, D.; BALTENSBERGER, U.; GALAMBOS, I.; KISS, G. Hygroscopic properties of water-soluble matter and humic-like organics in atmospheric fine aerosol. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2004, vol. 4, no. 1, s. 35 – 50.

ROBERTSON, G.L. *Food Packaging: Principles and Practice*. Taylor & Francis Group, London, 2013, 703 s. ISBN: 978-1-4398-6241-4.

ZEUTHEN, P.; BOGH-SORENSEN, L. *Food preservative technique*. CRC Press, English, 2003, 581 s. ISBN: 978-08493-1757-6.

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

## Glass transition tests for skimmed milk powder on DSC and DTA devices

Langová Jitka, Vlášek Václav, Štencl Jiří

*Department of Milk Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

### Summary

Spray dried products, such as milk powders exist in an amorphous nonequilibrium state. Amorphous materials have a glass transition temperature ( $T_g$ ) below which they are in a 'glassy' state. Above this temperature they exist as liquid-like 'rubbers'. Above  $T_g$  various properties of the materials are changed. Stickiness is one of example this changes. Procedures based on thermal analysis, differential scanning calorimetry (DSC) and differential thermal analysis (DTA) were examined to determine the  $T_g$  for skimmed milk powder. Thermal analysis methods consist of heating measurement. DSC detects the typical change of specific heat at  $T_g$ . DTA is based on difference between studied sample and reference.

**Keywords:** milk powder; moisture sorption isotherm; thermal analysis; stability

### Introduction

Significant features of the powders are their sorption and glass transitions properties. These properties have implications regarding the operating conditions for producing the powders and for the associated storage conditions (Chiou and Langrish, 2007). This physical state should not alter with time to the product to be stable for long periods of storage (Bhandari and Howes, 1999). Recently, the concepts related to water activity have been enriched by those of glass transition temperature ( $T_g$ ), thus providing an integrated approach to the role of water in food (Goula *et al.*, 2008).

It is known that spray drying produces largely 'glassy' (solid-like) amorphous products (Fontana, 1998). When the temperature is above  $T_g$  an amorphous solid exists in a 'rubbery' (liquid-like) state (Bhandari and Howes, 1999). In this 'rubbery' state, the molecular mobility of the matrix and the reactants are accelerated, which results in an increased rate of physicochemical changes in dried products, such as sticking (Jouppila and Roos, 1994). Increased molecular mobility and decreased viscosity result in a softening of particle surfaces at and above  $T_g$  (Hogan *et al.*, 2010).

Glass transition is second-order phase transition that occurs over a temperature range, although a single temperature is often referred. Some of the analytical methods to determine  $T_g$  are differential scanning calorimetry (DSC) and differential thermal analysis (DTA). These methods detect changes in heat capacity (Bhandari and Howes, 1999). The  $T_g$  is mainly a function of water content, molecular weight and nature of the dry matter compounds in a give substance (Khalloufi *et al.*, 2000). Glass transition can be determined from the precisely created moisture sorption isotherm (MSI), too. MSI's show the equilibrium relationship between the moisture content of foods and the water activity at constant temperatures and pressures (Delgado and Sun, 2002). The example of MSI is indicated in Figure 1.

High-tech devices based on thermal analysis are used for determination  $T_g$  in this work because determination  $T_g$  based on MSI is quite exacting and less accurate according to the methodology used. In this study the  $T_g$  is determined by the DSC and DTA for skimmed milk powder. Additionally, the thermogravimetry (TGA) was shown along with DTA for samples tested.

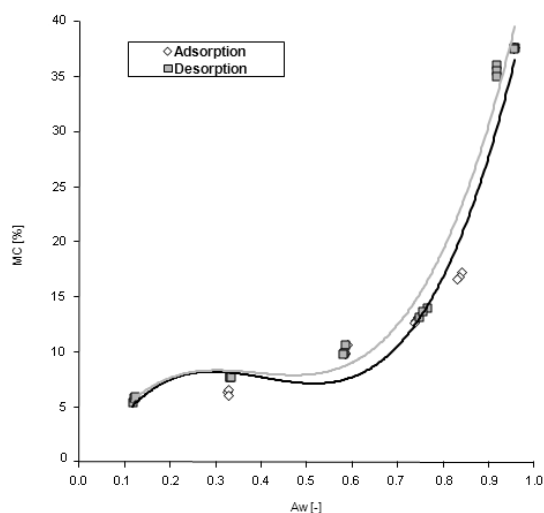


Figure 1: MSI of skimmed milk powder at 20°C (Langová *et al.*, 2012).

### Materials and Methods

Skimmed milk powder (per 100g: 5g fat, 35g protein, 49g carbohydrate) was purchased from a local store. The composition of this commercial product is informed in the label as minimum values. The dry matter of the skimmed milk powder was determined using halogen moisture analyzer (Mettler Toledo HB43-S) and was to be found 4.68%.

Differential scanning calorimeter (Mettler Toledo DSC 1) type of ‘heat flux’ and STAR<sup>e</sup> thermal analysis software were used to characterise the test samples. The reference material was Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The DSC sample weight was 124mg. Sealed aluminium pans (40μl) were used and measurement was made in an atmosphere of compressed air (rate of flow 50ml/min) with a heating rate of 20°C/min over a temperature range of 50–600°C. The instrument was calibrated by using indium standard.

DTA-analyzer along with thermogravimetric analyzer (Mettler Toledo TGA/SDTA851<sup>e</sup>) and STAR<sup>e</sup> software were used to analysing of glass transition. Sample (48mg) in 70μl corundum pans was heated over a temperature range of 45–1000°C in an atmosphere of compressed air (flow rate of 50ml/min) at a heating rate of 20°C/min with reference as Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The outputs are DTA trace, TGA trace and a derivative peak of the weight loss curve. The instrument was also calibrated by using indium standard.

### Results and Discussion

The midpoint of the glass transition was considered as the characteristic temperature of the transition. Usually  $T_g$  values reported are either onset or midpoint temperatures of the glass transition temperature range. Figure 2 displays DSC heating curve of a sample with point to  $T_g$  in the picture. The  $T_g$  value is about 68°C. Glass transition is endothermal process which leads to the energy absorption. DSC measurements like this are frequently performed in order to measure all the thermal processes that occur in one measurement run.

Fernández *et al.* (2003) pointed that  $T_g$  of skimmed milk powder is 62°C at 11% relative air humidity at 26°C. Hogan *et al.* (2010) determined the  $T_g$  midpoint 64±2°C by the DSC for 1.9% moisture content (MC), 48°C for 3.9% MC and 15°C for 8.1% MC, all for skimmed milk powder.

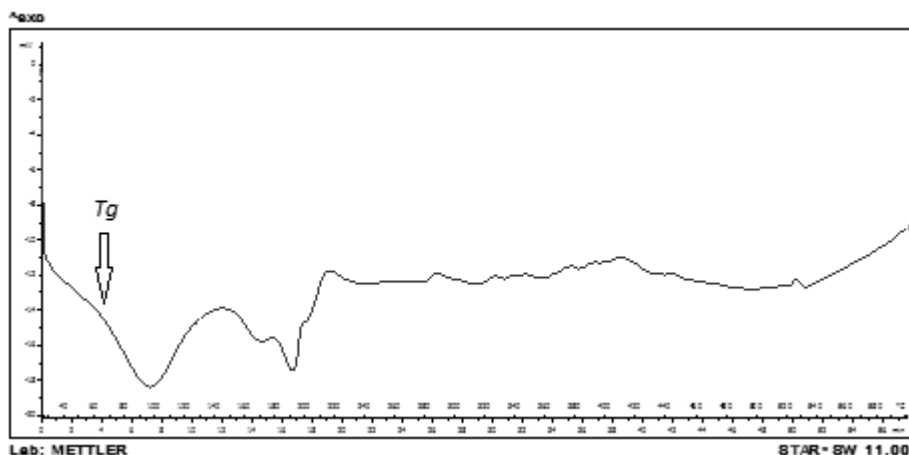


Figure 2: DSC trace of thermal decomposition of skimmed milk powder.

The DTA trace in the Fig. 3 is called as the differential heating curve.  $T_g$  of sample tested was determined as 70°C by the DTA. The principle of DTA is measurement of the temperature difference between sample studied and reference. TGA study changes of weight in measurement system depending on temperature. DTG trace shows a derivative peak corresponding to loss of weight. The thermal decomposition is carried out in five steps, as seen in Figure 3. The total weight loss is 85.6% of weight, i.e. 40.7mg of weight sample.

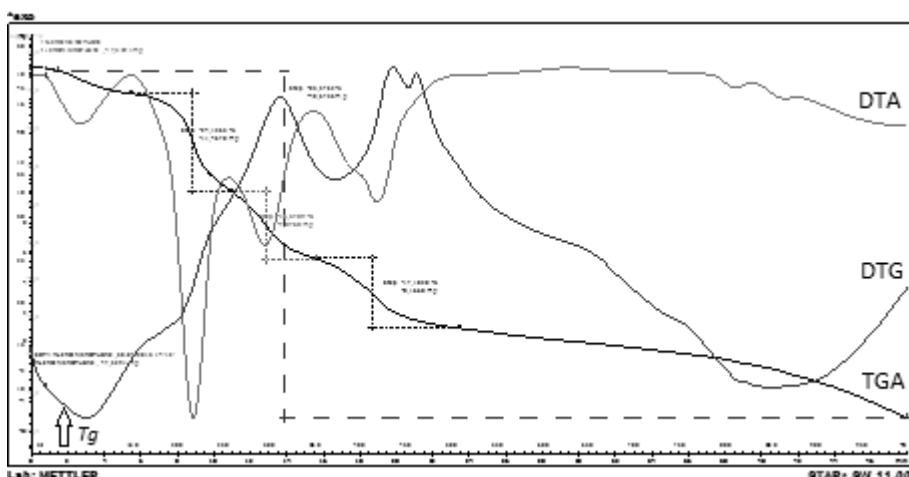


Figure 3: DTA, TGA and DTG traces of thermal decomposition of skimmed milk powder.

### Conclusion

$T_g$  of skimmed milk powder was determined by performing DSC, DTA and TGA at normal pressure conditions. The  $T_g$  value is about 68°C using DSC and 70°C using DTA. It was shown that  $T_g$  can be obtained using a rapid reliable and sensitive methods.  $T_g$  is no sufficient in itself to characterize the behaviour of a material and do not seems useful to predict with confidence the microbial stability of foods. Others parameters have to be collected for food materials along with  $T_g$ , such as water activity.

### References

References are available from the authors.

**Contact address:** Jitka Langová, Ing., Department of Milk Hygiene and Technology, FVHE VFU Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, H11009@vfu.cz.

# Mikrobiologická kvalita syrového mléka na území České republiky

## The microbiological quality of raw milk in the Czech Republic

<sup>1</sup>Bogdanovičová Kateřina, <sup>1</sup>Skočková Alena, <sup>2</sup>Kolářková Ivana, <sup>2</sup>Karpíšková Renáta

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno

<sup>2</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

### Summary

In this study microbiological and hygienic quality of raw milk and the occurrence of significant bacteria in milk filters was investigated for a total of 51 dairy farms in the Czech Republic. Sampling was carried out in the period of 2012-2014. Overall, 273 samples (175 samples of raw milk, 98 milk filters) were collected and tested. The occurrence and frequency of the following microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* was observed. Bacterium *E. coli* was detected in 87.4% of samples (153) in milk filters a higher percentage, and 96% (94) as observed. Within the detection of pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus* has been one of the most frequently detected pathogens, which was demonstrated in 37 samples of raw milk (21.2%). In milk filters *S. aureus* occurred in 21 of the investigated samples (21.4%). Bacterium *Listeria monocytogenes* was detected in 3 samples examined milk (1.7%). A higher detection was observed in milk filters, which has been demonstrated in a total of 8 samples (2.9%). Detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. was observed only in one milk filter (0.4%). The samples were negative for the presence of *Salmonella* spp.

**Keywords:** bacteria; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp.; *Campylobacter* spp.; *Listeria monocytogenes*

### Úvod

Mléko je komoditou, která se vyznačuje vysokou nutriční hodnotou, a jeho spotřeba je podporována mnoha odborníky. Někteří ve svých studiích uvádějí, že syrové mléko a výrobky z nepasterovaného mléka mohou být mikrobiálně kontaminovány. V dnešní době je spotřebiteli nabízena široká škála tržních druhů mléka včetně syrového mléka prodávaného prostřednictvím mléčných automatů nebo přímo na farmách. Právě v souvislosti s konzumací syrového mléka se mezi spotřebiteli objevily obavy o své zdraví. Cílem této práce bylo sledování mikrobiologické kvality a zdravotní nezávadnosti mléka a detekce možné mikrobiální kontaminace mléčných filtrů na farmách mléčného skotu na území České republiky.

### Materiál a metody

Průkaz bakterií *Escherichia coli* byl prováděn podle ČSN EN ISO 16649-1 s modifikací po pomnožení vzorku v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK) při 37 °C po dobu 24 hodin s následnou kultivací na TBX agaru (44 °C, 24 h). Konfirmace suspektních izolátů spočívala v detekci oxidázy (OXItest, Erba-Lachema, ČR) a v posouzení tvorby indolu (COLItest, Erba-Lachema, ČR).

Přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků byla prováděna podle ČSN EN ISO 6888-1, průkaz bakterií *Staphylococcus aureus* byl prováděn po pomnožení v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Ke kultivaci bylo použito médium Baird-Parker (OXOID, UK). 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 bakterií rodu *Salmonella* byl prováděn podle ČSN EN ISO 6579. Docházelo prvotně k neselektivnímu pomnožení, které proběhlo v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK).

Následovalo selektivní pomnožení v médiích RVS a MKTTN (OXOID, UK). Poté docházelo k vyočkování na média RAMBACH (MERCK, D) a XLD (OXOID, UK).

Detekce termotolerantních kampylobakterů byla prováděna podle ČSN EN ISO 10272-1. Před samotným průkazem docházelo k pomnožení, ke kterému bylo použito médium Bolton s koňskou krví (OXOID, UK), po 48 hodinové kultivaci při 42 °C bylo provedeno vyočkování na médium CCDA (OXOID, UK) s inkubací při 42 °C po dobu 48 hodin mikroaerofilně.

Průkaz bakterií *Listeria monocytogenes* byl proveden podle ČSN EN ISO 11290-1 s modifikací při primárním pomnožení, které bylo provedeno v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po přeočkování do Fraserova média (OXOID, UK) bylo provedeno vyočkování na médium ALOA agar (BIO-RAD, FR). U typických kolonií byla provedena confirmace a sérotypizace metodou skličkové aglutinace za pomoci komerčně dostupných antisér (DENKA SEIKEN, Japonsko) a výsledky skličkové aglutinace byly potvrzeny pomocí multiplex PCR (Doumith *et al.*, 2004).

### Výsledky a diskuze

V mikrobiologické kvalitě syrového mléka odebraného na mléčných farmách byly zaznamenány rozdíly, a to především v závislosti na farmě, ze které vzorky pocházely. Zatímco u některých farem bylo mléko po stránce mikrobiologické zcela bezpečné, u některých z nich došlo k záchytu patogenních mikroorganismů opakovaně.

Baktérie *Escherichia coli* byla detekována u 153 (87,4 %) vzorků syrového mléka a 94 (96 %) mléčných filtrů. Celkem bylo získáno 346 izolátů *E. coli* (syrové mléko: n = 220; mléčný filtr: n = 126). Baktérie *E. coli* bývá při mikrobiologické analýze používána k posouzení hygienické kvality potravin a potravinových surovin. Je běžnou součástí intestinální mikroflóry lidí i teplokrevných zvířat, ale může být i organismem patogenním (Costa *et al.*, 2009).

Bakteriální druh *Staphylococcus aureus*, který je považován za jednoho z nejúspěšnějších lidských patogenů dnešní doby, byl detekován při mikrobiologickém rozboru nejčastěji, a to u 58 vzorků (21,2 %). Z toho bylo pozitivních na přítomnost této bakterie 37 vzorků syrového mléka (21,2 %) a 21 vzorků mléčných filtrů (21,4 %). Celkem bylo získáno 62 izolátů *S. aureus* (syrové mléko: n = 41; mléčný filtr: n = 21). K podobným výsledkům došli ve studii Karpíšková R. *et al.*, (2011), kde docházelo k detekci 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*. Na čtyřech námi vyšetřovaných farmách byly detekovány i kmeny MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) produkující *mecA* gen, který kóduje rezistenci k antibiotiku meticilinu. Celkem bylo získáno 6 (9,7%) izolátů MRSA, (syrové mléko: n = 4; mléčný filtr: n = 2). V současné době je zaznamenáván celosvětově nepříznivý trend zvyšující se prevalence meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA). Baktérie *S. aureus* je jedním z hlavních etiologických agens způsobující mastitidy u mléčného skotu. I když ne všechny kmeny *S. aureus* mají toxigenní potenciál, může právě mléko a mléčné výrobky představovat zvýšené riziko pro konzumenty (Cretenet M., *et al.*, 2011).

Baktérie *Salmonella* spp. nebyla izolována v žádném z testovaných vzorků.

Detekce kampylobakterů prokázala přítomnost pouze jednoho pozitivního kmene, který byl ve vyšetřovaném vzorku mléčného filtru současně přítomen spolu s *Listeria monocytogenes*. V rámci mikrobiologického rozboru syrového kravského mléka a mléčných filtrů bylo zachyceno 11 vzorků s pozitivním nálezem *Listeria monocytogenes* (4 %). Z toho byly pozitivní na přítomnost této bakterie 3 vzorky syrového mléka (1,7 %) a 8 vzorků mléčných filtrů (8,2 %) pocházejí ze čtyř farem. Současně s identifikací bakterie byla provedena i

serotypizace. Byly detekovány tři rozdílné serotypy *Listeria monocytogenes*, a to 1/2a (37,5 %), 1/2b (25 %) a 4b (37,5 %). Námi detekované serotypy *L. monocytogenes* se v odborné literatuře označují za ty, které se z 90 % podílejí na vzniku humánních listerióz (Farber *et al.*, 1991). Podle několika autorů souvisí se vznikem humánních listerióz zejména sérotyp 4b (Garrido *et al.*, 2008; Kasper *et al.*, 2009). V České republice zaujímá v potravinách prvotní postavení sérotyp 1/2a.

### Závěr

Výsledky této studie potvrzují výskyt patogenních bakterií v syrovém mléce i na mléčných filtrech. Ze studie vyplývá fakt, že konzumace syrového mléka není pro spotřebitele bezpečná, a že tepelná úprava syrového mléka před jeho konzumací má pozitivní význam.

### Poděkování

Tato studie vznikla za finanční podpory NAZV KUS QJ 1230044 a QJ I210284.

### Literatura

COSTA, D, L VINUÉ, P POETA *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*. 2009, vol. 138, p. 339-44.

CRETENET, M, S EVEN a Y LE LOIR. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science Technology*. 2011, vol. 91, no. 2, p. 127-150.

DOUMITH, M., C BUCHRIESER, P GLASER, C JACQUET a P MARTIN. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, p. 3819-3822.

GARRIDO, V., L TORROBA, I GARCÍA-JALÓN a AI VITAS. Surveillance of listeriosis in Navarre, Spain, 1995-2005 – epidemiological patterns and characterisation of clinical and food isolates. *Euro Surveillance*, 2008, vol. 13, no. 49, p. 19058.

FARBER, JM, a PI PETERKIN. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*. 1991, vol. 55, p. 476-511.

MARTINEAU, F, FJ PICARD, PH ROY, M OUELLETTE a MG BERGERON. Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, vol. 36, no. 3, p. 618-623.

KARPÍŠKOVÁ, R, I KOLÁČKOVÁ, M VYLETĚLOVÁ a B JANŠTOVÁ. „Mléčné automaty“ - nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce. SZÚ, PRAHA: ZPRÁVY CEM, 2011., vol. 20, p. 212–214.

KASPER, S., S HUHULESCU, B AUER, I HELLER, F KARNER, R WÜRZNER, M WAGNER, a F ALLERBERGER. Epidemiology of listeriosis in Austria. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2009, vol. 121, no. 3-4, p. 113-119.

SECCHI C., ALS ANTUNES, LS PEREZ RODRIGUES, VV CANTARELLI a PA D'AZEVEDO. Identification and Detection of Methicillin Resistance in Non-Epidermidis Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008. vol. 12, p. 316-320.

**Kontaktní adresa:** Kateřina Bogdanovičová, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika, H12019@vfu.cz.

## Occurrence of *Enterococcus* spp. isolated from the whey

<sup>1</sup>Lačanin Ines, <sup>1</sup>Dušková Marta, <sup>1</sup>Kladnická Iva, <sup>1</sup>Bogdanovičová Kateřina,  
<sup>1,2</sup>Karpíšková Renáta

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno  
<sup>2</sup>Veterinary Research Institute

### Summary

*Enterococcus* spp. is the most controversial group of lactic acid bacteria that have been ascribed with beneficial or detrimental role in food and feed. The aim of our study was to monitor the occurrence of *Enterococcus* spp. and determine the counts in the whey. Cultures of enterococci were cultivated periodically from whey samples (n=71) from one dairy plant in the Czech Republic, in the period of one month. The results of counting the number of cultivated colonies showed that the largest number of enterococci is found in the samples of whey taken after the process of electro dialysis ( $9.7 \times 10^2$  CFUM/mL) and the smallest in the native whey sample. From collected whey samples, 64 samples (90%) were PCR positive for enterococci species and only 7 samples (10%) weren't. Among 86 suspected isolates, 83 isolates (96.5%) were identified as *Enterococcus* spp.

**Keywords:** enterococci; PCR; whey; electro dialysis

### Introduction

Whey is the greenish translucent liquid obtained from milk after precipitation of casein. For a long time it has been viewed as one of the major disposal problems of the dairy industry, but not anymore. Today there are several types of whey, which depending mainly on the processing sequence resulting in casein removal from fluid milk, but the most often encountered types (sweet or acid whey) originates from the manufacture of cheese. With its nutritional aspects and enriched with some other additions like fruits is one of the healthy products that can be found on the market (Jelen, 2002, Pescuma et al., 2008; Tratnik and Božanić, 2012).

The genus *Enterococcus* is the most controversial and one of the largest group that belongs to lactic acid bacteria (LAB) group. They are Gram-positive homofermentative cocci, occurring singly or in pairs and can be found in variety of habitats including humans and animals. From the taxonomic point of view enterococci have been reviewed several times and today it consists of at least 53 species of which are *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* the most important (Giraffa, 2003; Khan et al., 2010;). These bacteria play important role in the food and feed fermentation and nowadays these strains are frequently used as probiotics. They are considered as a potential cholesterol-lowering agents, in treatment of gastrointestinal diseases and for immune regulation (Franz et al., 2011). With their ability to produce enterocins (class II of bacteriocins) *Enterococcus* strains can provide natural preservation of dairy products and hurdle in the growth of microorganisms (antimicrobial activity against spoilage or pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp.). Also on the other hand enterococci have their negative influence – opportune pathogens and can cause diseases (Fouquié Moreno et al., 2006; Franz et al., 2011).

The aim of this study was to monitor the occurrence of *Enterococcus* spp. and determine the counts in the whey.

### Materials and Methods

Together 71 whey samples were periodically collected in different manufacturing stages, from one dairy plant in Moravia in the Czech Republic, in the period of middle of February to the middle of March 2014 (one month). Basic processing of the samples was carried out



immediately according to the ISO 7218 and ISO 6887-1 standards. The amount of 25 mL of sample was diluted in 225 mL of Buffered Peptone Water (Oxoid, England) and made different dilutions. From diluted sample 200µL was aseptically spread on Slanetz Bartley agar (Oxoid) and Bile Esculin agar (Oxoid) and cultivated at 37°C for 24h. All colonies from each sample that showed different morphological characteristics and pigment production were selected and purified for further characterization. Isolation of bacterial DNA was performed by 20% Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, USA). Isolates were identified by the genus-specific polymerase chain reaction (PCR) method based on the detection of *sodA* genes encoding enzyme mangan-dependent superoxide dismutase for the rapid identification of enterococci (Jackson et al., 2004).

### Results and Discussion

A total amount of 86 suspected enterococci isolates were obtained from 71 collected whey samples (Table 1).

Table 1: The origin and frequency of *Enterococcus* isolates.

Commodity*	Number of enterococci (CFU/mL)	Number of samples	Number of positive samples	Number of suspected isolates	Number of positive isolates
Native whey sample	<5	6	0 (0%)	2	0 (0%)
w in drying station	1,8×10 <sup>1</sup>	6	5 (83%)	7	6 (86%)
w from the tank	1,5×10 <sup>2</sup>	9	9 (100%)	11	10 (91%)
w before the electro dialysis	5×10 <sup>2</sup>	13	13 (100%)	18	17 (95%)
w after the electro dialysis	9,7×10 <sup>2</sup>	13	13 (100%)	17	17 (100%)
Desalted w before concentration	4,4×10 <sup>2</sup>	7	7 (100%)	13	13 (100%)
Desalted w behind the pasteur	2,4×10 <sup>2</sup>	5	5 (100%)	8	8 (100%)
Concentrated, desalted w	1,3×10 <sup>1</sup>	4	4 (100%)	5	5 (100%)
Sample of dried powder	<50	5	5 (100%)	5	5 (100%)
<b>Total</b>		71	64 (90%)	86	83 (96.5%)

\*w = the sample of whey

Based on the detection of *sodA* genes only 3 strains (3.5 %) of 86 suspected isolates didn't show the specific PCR product. The number of the grown colonies, that after cultivation showed typical growth as enterococi, was counted. The lowest number of enterococci was counted in the native whey sample (<5 CFU/mL) and the largest was counted in the samples that were collected after the phase of electro dialysis (9.7×10<sup>2</sup> CFU/mL). Enterococci were present during all phases of manufacturing (Table 1). This could be due to their ability of biofilm formation (electro dialysis) or maybe due to their resistance so they continually remain during the process.

Enterococci occur as nonstarter LAB in variety of cheese production and ripening (e.g. the development of flavor) probably due to their thermal resistance during pasteurization of milk. High level of contaminating cheese with enterococci, except as starter cultures, can result in the poor hygienic practices during manufacturing (Pieniz et al.,2014). Whey is a by-product of the cheese industry which was often disposed as the waste. During the cheese production some compounds present in milk and / or cheese end up in the composition of whey. The major factors to determine the survival of this bacteria include particular characteristics of the

strains, composition of food ingested and competition of microbiota (Pieniz et al.,2014). Whey and its protein content are ingredients used in dairy industry mainly due to their foaming and emulsifying properties and increasing nutritional quality (cheese, dairy desserts etc.). LAB in whey can decrease the high content of lactose and increase the digestibility of BLG ( $\beta$ -lactoglobulin) and ALA ( $\alpha$ -lactalbumin) proteins. This can contribute to the change and increase the flavor, aroma and texture of the end product and provide extra nutritional value (Pescuma et al., 2008).

### Conclusion

The results of this study point out the presence of *Enterococcus* spp. during the whole whey manufacturing process. The study shows the fact that the high prevalence of enterococci in whey may be attributed to their resistance to heat, acid, salt and harsh conditions during food processing. Enterococci were present in all phases of whey processing, except in the native way sample, but in the amount that is not hazardous for human health. To conclude, the application of electrodialysis, in the process of whey manufacturing, proved to be good.

### Acknowledgment

This study was supported by the project NAZV KUS QJ1230044.

### References

- FOULQUIÉ MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol.106, p.1-24.
- FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implication in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, vol.151, p.125-140.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol.88, p.215-222.
- ISO6887-1:1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of tests samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*
- ISO7218:2007, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*
- JACKSON, CH; FEDORKA-CRAY, PJ; BARRETT, JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol.42, p.3558-3565.
- JELLEN, P. Whey processing-Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Science*, Academic Press, 2002, p.2739-2745.
- KHAN,H.; FLINT, S.; YU, P.L. Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol.141, p.1-10.
- PESCUMA, M.; HÉBERT, E.M.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evaluation of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 2008, vol.25, p.442-451.
- PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 2014, vol.37, p.251-256.
- TRATNIK, LJ., BOŽANIĆ, R. Mlijeko i mliječni proizvodi. *Hrvatska Mljekarska Udruga*, Zagreb, 2012, p.357-394.

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

## Antibiotická rezistencia mikroorganizmov rodu *Enterococcus* izolovaných z farmového ovčieho mlieka a ovčej hrudky

Vrabec Marek, Gallo Juraj, Dudriková Eva

Ústav hygieny a technológie mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

### Summary

The aim of study was detect the antibiotic resistance of microorganisms of genus *Enterococcus* isolated from sheep raw milk and sheep lump. 150 isolates of *Enterococcus* spp. were confirmed by PCR method. In the present experiment were used six antibiotics: ampicilline, erythromycin, chloramphenicol, penicilin, tetracycline, vancomycin. Susceptibility or resistance was determined by disc diffusion method. The results of the experiment suggests it to the highest resistance was on ampicilline (53% of isolates) and the lowest resistance was recorded on erythromycin (18% of the isolates). The highest susceptibility of isolates was recorded on chloramphenicol (78%). Neither one isolate was resistant to all 6 antibiotics used in the experiment.

**Keywords:** antibiotic resistance; *Enterococcus*

### Úvod

Význam a úlohy príslušníkov rodu *Enterococcus* sú v potravinárskej mikrobiológii na prvý pohľad protichodné. Využívajú sa ich pozitívne biochemické vlastnosti z pôvodnej príslušnosti k rodu *Streptococcus*. Intenzívne fermentujú sacharidy a niekedy sa zúčastňujú na tvorbe arómy a chutnosti potravín. Pripisuje sa im toxigénnosť, tvorba biogénnych amínov a využívajú sa ako indikátory recentného fekálneho znečistenia (Görner, Valík, 2004). Enterokoky predstavujú ubiquitné mikroorganizmy a ich prirodzeným miestom výskytu je predovšetkým tráviaci aparát ľudí, ale aj väčšiny druhov zvierat (Ducková et al., 2012). Sú zaradené medzi fakultatívne patogénne mikroorganizmy (Biendo et al., 2010). Enterokoky sú známe aj ako závažné nozokomiálne patogény, ktoré spôsobujú najčastejšie endokarditídy, baktériemiu, infekcie močových ciest, infekcie brucha, žlčových ciest, infekcie krvného obehu a zúčastňujú sa aj pri infekciách popálenín (Lavová et al., 2011). Enterokoky sú často aj pôvodcami meningitíd (Števlíková et al., 2006). Greifová et al. (2003) označujú enterokoky ako ubiquitárne baktérie, ktoré sa frekventovane vyskytujú v značnom počte v mliekarenských výrobkoch, ale aj v iných fermentovaných potravinách. Prítomnosť enterokokov v mlieku a mliečnych výrobkoch sa spája predovšetkým s nedodržaním hygienických a sanitačných zásad, pri získavaní, manipulácii s mliekom a pri jeho spracovaní (Cogan et al., 2001). Vďaka ich psychrotrofnému charakteru, termorezistencii a schopnosti prežít v rôznych substrátoch a podmienkach, sa môžu počty enterokokov v mlieku počas jeho chladenia, skladovania a prepravy zvyšovať a taktiež môžu prežiť pasterizačnú teplotu. Práve preto sa enterokoky stávajú súčasťou mikroflóry nielen surového ale aj pasterizovaného mlieka a mliečnych výrobkov (Giraffa, 2003). Nebezpečenstvo enterokokov spočíva hlavne v ich patogenite, ktorá je daná rezistenciou k veľmi širokému spektru antibiotík a zároveň ďalšími faktormi virulencie (Fabianová et al., 2010). Pre enterokoky je charakteristická prirodzená rezistencia na niekoľko druhov antibiotík, ale aj ich jedinečná schopnosť výmeny genetického materiálu. Vďaka tejto výmene genetického materiálu si dokážu získať rezistenciu voči viacerým druhom antibiotík ako sú napr. aminoglykozidy, chloramfenikol, glykopeptidy, makrolidy a tetracyklíny (Huys et al., 2004).

Cieľom práce bolo stanovenie klinicky významnej rezistencie enterokokov voči vybraným druhom antibiotík používaných ako v humánnej tak aj veterinárskej medicíne.

## Materiál a metodika

V roku 2013 sa uskutočnili odbery vzoriek na ovčej farme pri obci Košický Klečenov, z ktorej produkty boli využívané majiteľom farmy len na súkromné účely. Počas laktačnej periódy sa uskutočnilo 10 odberov vzoriek, pri ktorých sa získalo 100 individuálnych vzoriek ovčieho mlieka a 10 vzoriek čerstvého ovčieho syra vyrobeného z nepasterizovaného mlieka o hmotnosti 300g. Do experimentu bolo celkovo zaradených 150 izolátov rodu *Enterococcus* rodovo potvrdených metódou PCR. Izolácia kmeňov enterokokov a ich rodová konfirmácia bola robená metódou Poľaková et al. (2011). Identifikované kmene rodu *Enterococcus* boli podrobené hodnoteniu rezistencie na vybrané antibiotiká používané v humánnej a veterinárnej medicíne diskovou difúznou metódou na Müller-Hinton agare (HiMedia Laboratories, India) s použitím nasledovných antibiotických diskov a koncentráciou: ampicilín (10 µg), erytromycín (15 µg), chloramfenikol (30 µg), penicilín (10 µg), tetracyklín (30 µg) a vankomycín (30 µg). Na zaradenie jednotlivých izolátov rodu *Enterococcus* medzi rezistentné, stredne rezistentné a citlivé boli použité kritériá CLSI (2011).

## Výsledky

Výsledky zaradenia jednotlivých 150 izolátov rodu *Enterococcus* na vybrané antibiotiká používané v humánnej a veterinárskej medicíne medzi rezistentné, stredne rezistentné a citlivé sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Rezistencia *Enterococcus* spp. (n=150) izolovaných zo surového ovčieho mlieka a čerstvého ovčieho syra na vybrané antibiotiká používané v humánnej a veterinárskej medicíne.

druh antibiotika	rezistentné	stredne rezistentné	citlivé
	počet (%)		
ampicilín (10 µg disk)	80 (53,33)	0	70 (46,67)
erytromycín (15 µg disk)	27 (18,0)	67 (44,67)	56 (37,33)
chloramfenikol (30 µg disk)	32 (21,33)	0	118 (78,67)
penicilín (10 µg disk)	71 (47,33)	0	79 (52,67)
tetracyklín (30 µg disk)	31 (20,67)	35 (23,33)	84 (56,0)
vankomycín (30 µg disk)	69 (46,0)	54 (36,0)	27 (18,0)

Z Tabuľky 1 vyplýva, že najvyššia zaznamenaná rezistencia bola na ampicilín, na ktorý bolo rezistentných 80 kmeňov (53,33%) a najnižšia rezistencia bola zaznamenaná na erytromycín, na ktorý bolo rezistentných iba 27 kmeňov enterokokov (18,00%).

Najvyššia citlivosť izolátov *Enterococcus* spp. bola zaznamenaná na chloramfenikol (78,67%). Multirezistenciu enterokokov znázorňuje Tabuľka 2.

Tabuľka 2: Multirezistencia *Enterococcus* spp. (n=150) na vybrané antibiotiká používané v humánnej a veterinárskej medicíne.

počet antibiotík	počet izolátov	percento
1	25	16,67
2	32	21,33
3	22	14,67
4	16	10,67
5	15	10,00
6	0	0

Z celkového počtu testovaných izolátov *Enterococcus* spp. len u 25 izolátov bola zistená rezistencia na jedno antibiotikum (16,67%). Najvyššia rezistencia bola zistená na dva druhy antibiotík, kde bolo rezistentných 32 kmeňov (21,33%). Ani jeden nami izolovaný a potvrdený izolát *Enterococcus* spp. nebol rezistentný na všetkých šesť vybraných druhov antibiotík zaradených do experimentu.

### Záver

Výsledky práce potvrdili, že enterokoky ako kontaminant ovčieho mlieka a čerstveho ovčieho syra predstavujú závažný negatívny problém z hľadiska ich významnej rezistencie na antibiotiká. Z tohto dôvodu je potrebné znížiť kontamináciu potravín živočíšneho pôvodu týmito mikroorganizmami a dodržiavať všetky zásady hygieny a sanitácie pri získavaní a spracovaní mlieka.

### PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom KEGA č. 0011UVLF-4/2012.

### Literatúra

DUCKOVÁ, V. a kol. Antibacterial activity of thyme and rosemary essential oil against Enterococci isolated from meat. In *Potravinárstvo*. [online]. 2012, roč. 6, č. 1 [cit. 27. 9. 13].

Dostupné na internete:

<http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/178/164>. ISSN 1337-0960.

BIENDO, M. et al. Molecular Characterization of Glycopeptide- Resistant Enterococci from Hospitals of the Picardy Region (France). In *International Journal of Microbiology*. ISSN 1687-9198, 2010, vol. 2010, no. 1, p. 1-8.

LAVOVÁ, M. et al. Enterococci and their ability live out activity of sanitation detergents. In *Potravinárstvo*. ISSN 1338-0230, 2011, roč. 5, č. 4, s. 42-44.

ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. *Mikrobiológia 2. časť*. Druhé nezmenené vydanie. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. 156 s. ISBN 80-8069-683-7.

GÖRNER, F. – VALÍK, E. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľin*. 1 vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-697064-9-7.

GREIFOVÁ, M., et al. Enterokoky a ich hodnotenie v mliekarenskej technológii. In *Mliekarstvo*. ISSN 1210-3144, 2003, roč. 34, č. 2, s. 42-45.

COGAN, T. M. et al. 2001. Enterococci in food fermentation: Functional and safety aspects. In *Armis* (online). 2001, no 4547 (cit. 2001-08-30) p.120-130.

GIRAFFA, G. 2003. Functionality of enterococci in diary products. In *Internacional Journal of Food Microbiology*, vol.88, 2003, p. 212-222.

FABIANOVÁ, J. a kol. Výskyt enterokokov v kravskom mlieku a ich rezistencia na antibiotiká. In *Potravinárstvo*. ISSN 1338-0230, 2010, roč. 4, č. 2, s. 17-21.

HUYS, G. D. et al. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolated from foods. In *Applied and Enviromental Microbiology*. ISSN 0099-2240, 2004, vol. 70, p. 1555-1562.

CLSI M100-S21. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational supplement, M100S21. 01/01/2011. ISBN 1562387421. 172pp.

**Kontaktná adresa:** Marek Vrabec, MVDr., Ústav hygieny a technológie mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice, SR, vrabecmarek@gmail.com.

## Prežitie *Listeria monocytogenes* v mäkkom syre vyrobenom z pasterizovaného kozieho mlieka

### Survival of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses made from pasteurized goat's milk

<sup>1</sup>Gallo Juraj, <sup>1</sup>Vrabec Marek, <sup>1</sup>Dudríková Eva, <sup>2</sup>Šmiga Ľubomír

<sup>1</sup>Katedra hygieny a technologickej potravin, Ústav hygieny a technologickej mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

#### Summary

The aim of our study was to determine the survival of artificially inoculated *L. monocytogenes* reference strain CCM 5576 in soft goat cheese made from pasteurized milk, stored under conditions specified by the manufacturer on the product label for durability. Detection and enumeration of *L. monocytogenes* as well as water activity ( $a_w$ ), pH, dry matter content, fat content and total protein content were tested over 10 days. The growth potential of *L. monocytogenes* was calculated as the difference in the counts of *L. monocytogenes* between the last day and the first day of the test. Our experimental results show that soft goat cheese made from pasteurized milk under farm condition which was artificially inoculated with *L. monocytogenes* reference strain CCM 5576 on the basis of its growth potential is not able to support the growth of *L. monocytogenes*.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; soft goat cheese

#### Úvod

Zatiaľ čo vo väčšine sveta sa komerčne dostupné syry vyrábajú z kravského mlieka, v mnohých krajinách sa produkuje syr z kozieho a ovčieho mlieka. Na Slovensku má výroba špecifických syrov dlhodobú tradíciu. Tieto komodity sú vyrábané priamo na farmách a salašoch, kde sa kozie mlieko získava. Aj keď kozí syr vyrábaný predovšetkým z pasterizovaného mlieka je považovaný za bezpečnú potravinu zlé hygienické podmienky pri získavaní mlieka a samotná výroba syra môže spôsobiť jeho kontamináciu (Pažáková et al., 2001). Medzi nebezpečné baktérie z pohľadu konzumácie potravín (ready-to-eat) patrí *Listeria monocytogenes* a zostáva tak jedným z najvýznamnejších patogénov takto pripravených potravín (Oevermann et al., 2010). Z týchto dôvodov má pasterizácia svoje opodstatnenie, za účelom zníženia mikrobiálnej kontaminácie mlieka (Quigley et al., 2013). Listerie sú baktérie ktoré sú veľmi citlivé na fyzikálno-chemické vlastnosti potravín predovšetkým pH a aktivitu vody ( $a_w$ ), ktoré ovplyvňujú ich prežitie v potravinách. Práve preto nariadenie komisie (EC) 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny umožňuje producentom potravín umiestniť svoje produkty na trh aj napriek prítomnosti *Listerie monocytogenes*. Podľa tohto nariadenia sú výrobcovia potravín povinní vypracovať vedeckú štúdiu pre každý produkt, pred jeho uvedením na trh preukazujúcu, že baktérie nebudú prekračovať limit, alebo že tento druh potraviny zabráni rastu baktérií (Cabanová et al., 2011). Cieľom tejto štúdie bolo sledovať rast *Listerie monocytogenes* v umelo kontaminovaných mäkkých syroch vyrobených z pasterizovaného kozieho mlieka kôz, ako aj stanovenie zmien fyzikálno-chemických parametrov v kozom syre počas skladovania pri teplote 2 - 8 °C po dobu 10 dní.

#### Materiál a metodika

Vzorky kozieho syra boli po privezení do laboratória rozvážené do sterilných stomacherových sáčkov (Seward, UK) a umelo kontaminované 24 hodinovou kultúrou *Listeria monocytogenes* (CCM 5576) pomnoženou v brain heart infusion broth (HiMedia, IND). Bakteriálna kultúra

bola zriedená v sterilnom fyziologickom roztoku a inokulum bolo aplikované o objeme 50  $\mu\text{l}$  = 1086 CFU/g. Následne boli sáčky uzavreté, homogenizované v Bagmixer® 400VW (Interscience, USA) a uskladnené pri chladničkej teplote počas priebehu celého experimentu. Meranie hodnoty pH boli vykonané pH metrom inoLab pH7110 (WTW, Nemecko) pomocou vpichovej elektródy priamo v syroch. Vodná aktivita bola detegovaná prostredníctvom Novasina Labmaster-aw (Novasina, Švajčiarsko). Obsah bielkovín sme stanovili použitím Kjeltac Auto 1030, (Tecator Co. Sweden), obsah tuku a sušiny bol stanovený podľa (STN EN ISO 3433/2012, STN EN ISO 5534/2004). Mikrobiologická analýza prítomnosti a počtu *Listerie monocytogenes* bola vykonaná podľa STN EN ISO 11290-1 a STN EN ISO 11290-2. Potenciál rastu *Listerie monocytogenes* bol vypočítaný na základe rozdielu hodnôt medzi prvým a posledným dňom experimentu podľa Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods podľa (EC) 2073/2005 z Novembra 2005.

### Výsledky

Tabuľka 1 predstavuje mikrobiálnu analýzu rastu *Listeria monocytogenes* v umelo kontaminovanom kozom syre, ako aj fyzikálno-chemické parametre tohto syra, pri skladovaného pri 2 - 8 °C po dobu 10 dní. Obsah tuku, sušiny, dusíkatých látok, ale predovšetkým  $a_w$  a pH hodnoty sa počas doby spotreby, vyznačenej výrobcom (max. 10 dní chladiarenské skladovanie) výrazne nemenili. Na druhej strane, umelá inokulácia *Listeria monocytogenes* do syrov (predtým *Listerie monocytogenes* prostých) spôsobila prítomnosť patogénu vo všetkých vzorkách u ktorých sme počas experimentu detegovali klesajúce počty *Listerie monocytogenes*.

Tabuľka 1: Hlavné zložky, fyzikálno-chemické zloženie a mikrobiologická analýza mäkkého kozieho syra počas doby skladovania.

Parameter	1. deň	3. deň	5. deň	7. deň	10. deň
Sušina (%)	39,6	39,8	40,3	40,8	40,5
	39,4	40,1	39,8	40,3	39,8
	40,1	39,5	40,2	39,7	40,1
Tuk (%)	21,0	20,0	20,0	20,5	20,4
	20,5	20,0	20,1	20,0	20,1
	20,6	20,0	20,3	20,2	20,0
Celkové bielkoviny (%)	13,2	13,4	13,8	13,3	13,3
	13,1	13,4	13,1	13,4	13,4
	13,2	13,2	13,9	13,9	13,4
$a_w$	0,88	0,87	0,88	0,88	0,88
	0,87	0,88	0,88	0,88	0,88
	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
pH	4,58	4,58	4,56	4,55	4,55
	4,60	4,56	4,57	4,56	4,55
	4,59	4,56	4,57	4,53	4,48
Detekcia <i>L. monocytogenes</i>	pozitívna	pozitívna	pozitívna	pozitívna	pozitívna
Počet <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ/g)	3,80	3,37	3,38	3,16	2,98
	3,74	3,26	3,33	3,13	2,96
	3,83	3,36	3,34	3,27	3,16

Rastový potenciál bol vypočítaný ako rozdiel hodnôt posledného a prvého dňa experimentu (Tabuľka 2). V posledný deň experimentu je stredná hodnota logaritmu 2,96 a v deň prvý je to 3,80. Rozdiel medzi nimi je  $-0,86$ , čo je menej ako 0,5 (hodnota odporúčaná EURL), znamená to, že výrobok nepodporuje rast *Listerií*. Počiatočná koncentrácia bola vypočítaná podľa nasledujúceho vzorca:  $2\log - 0,86$ , čo predstavuje v 14 KTJ/g a konečná koncentrácia ( $1\log + 0,86$ ) dáva výsledok 73 KTJ/g.

Tabuľka 2: Rastový potenciál a jeho kalkulácia.

Posledný deň kultivácie	Prvý deň kultivácie
2,98	3,80
2,96	3,74
3,16	3,83

### Diskusi a záver

Nariadenie Komisie (ES) 1441 / 2007 definuje, že (ready-to-eat) potraviny môžu podporovať rast *Listerie monocytogenes*, avšak v maximálnej výške 100 KTJ na gram produktu počas expirácie, rovnako ako výrobky s  $\text{pH} \leq 4,4$  ;  $a_w \leq 0,92$  ; alebo  $\text{pH} \leq 5,0$  a  $a_w \leq 0,94$ , ale trvanlivosťou kratšia ako päť dní. Avšak, výrobky s dlhšou trvanlivosťou, musia byť podrobené vedeckej štúdií pred ich zaradením do tejto kategórie. Na základe dosiahnutého výsledku sme dospeli k záveru že nami vyšetovaný kozí mäkký syr je potravina ktorá na základe svojich vyrovnaných hodnôt pH a  $a_w$ . Na základe dosiahnutého mikrobiologického vyšetrenia, pri dodržaní štandardných výrobných procesov a dodržaní odporúčaných skladovacích podmienok je potravina, ktorá nepodporuje rast *Listerie monocytogenes* a z pohľadu spotrebiteľa je bezpečný aj ak sa tam táto baktéria nachádza v počte neprevyšujúcom 14 KTJ/g na začiatku a 73 KTJ/g na konci doby spotreby.

### Podakovanie

Práca bola podporená grantom KEGA č. 0011UVLF-4/2012.

### Literatúra

CABANOVÁ, L.; ŠKUNTOVÁ, O.; MATISOVÁ, D.; PIPOVÁ, M. Development of a scientific study for accessing the criteria under Commission Regulation (EC) 2073/2005 on traditional Slovak sheep cheese “Brynza”. 2011, vol. 29, no. 1, p. 31-34.

Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuff (2008). Available at [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc\\_listeria\\_monocytogenes\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en.pdf).

PAŽÁKOVÁ, J.; PIPOVÁ, M.; TUREK, P.; NAGY, J. Changes in some Microbiological Parameters during the Ripening of Sheep Cheese at Different Temperatures. Czech Journal of Food Sciences. 2001, vol. 19, p. 121-124.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T.P.; ROSS, R.P, FITZGERALD, G.F.; COTTER, P.D. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews. 2013, vol. 37, p. 664-98.

Oevermann, A.; Zurbriggen, A.; Vandeveld, M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? Interdiscip Perspect Infect Dis 2010; 2010:635213. doi: 10.1155/2010/632513. Epub 2010 Feb 28.

**Kontaktná adresa:** Juraj Gallo, MVDr., Ústav hygieny a technológie mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice, SR., [galllo44@gmail.com](mailto:galllo44@gmail.com).



## Production of technologically desirable metabolites by lactobacilli isolated from goat's milk

<sup>1</sup>Klapáčová Lýdia, <sup>2</sup>Slottová Anna, <sup>3</sup>Bujňáková Dobroslava, <sup>2</sup>Kološta Miroslav,  
<sup>1</sup>Dudriková Eva, <sup>2</sup>Tomáška Martin

<sup>1</sup>University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice; Košice; Slovakia

<sup>2</sup>Dairy Research Institute, JV; Žilina; Slovakia

<sup>3</sup>Institute of Animal Physiology Slovak Academy of Sciences; Košice; Slovakia

### Summary

In previous study, selected technological properties were characterized in strains of lactobacilli isolated from goat's milk – *Lactobacillus paracasei* (21/L10), *Lactobacillus johnsonii* (KB2-1) and *Lactobacillus paraplantarum* (25/1L). The aim of this study was to supplement these properties with urease activity, lipolytic activity and ability to produce exopolysaccharides. The strains did not show urease activity and with exception of the strain KB2-1 they grew even in medium with high levels of urea. They did not show any lipolytic activity on medium with tributyrin. They formed pink colonies on medium with ruthenium red as suspected rosy strains. Presented characteristics complete technological vision for using these strains as starters or starter adjuncts during production of lactic acid beverages or cheeses made from pasteurised goat's milk. Thus these products will be safer and variability of lactic acid bacteria will be wider for the consumers.

**Keywords:** goat's milk; lactobacilli; lipolysis; urease; exopolysaccharides

### Introduction

Goat's breeding has an increasing tendency. There are several herds with large numbers of animals but predominate small farmers (Margetín, 2014). Goat's milk has multiple benefits. In comparison to cow's milk, goat's milk is considered as easier digestible. Moreover, in some patients has also lower allergenic potential (Spuergerin *et al.*, 1997). From another point of view, the disadvantage is that encephalitis can be transmitted through goat's milk (Máderová, 2005) and therefore it should not be consumed without heat treatment. The most often it is processed as drinking milk, for cheese-making (fresh, with mould, hard) or for fermented dairy beverages. During the process of their production there are almost entirely used commercially available cultures. It is a disadvantage because it reduces variability of available „wild“ lactic acid bacteria (LAB). However, goat's milk is an amazing reservoir of „wild“ LAB and many of them have unique properties (Guessas and Kihal, 2004). This study refers to recent studies that isolated, identified and characterized lactobacilli obtained from goat's milk (Kološta *et al.*, 2014; Klapáčová *et al.*, 2015). This study was focused on description of technologically significant properties (urease activity, proteolytic and lipolytic activity and production of exopolysaccharides), which will be used for production of safe and attractive products from goat's milk.

### Material and Methods

Urease activity was tested in a medium Urea that contained 2% of urea and indicator phenol red (MKB Test, Rosina, Slovakia), after 24h and 48 h of aerobic cultivation at 30°C and 37°C. We evaluated growth and colour change of medium (Lanyi, 1987). Lipolytic activity was tested in medium DEV Nutrient agar (MERCK, Darmstadt, Germany) where we added 1% tributyrin (98%) (Acros Organics, New Jersey, USA). Overnight cultures of strains (40µl) were applied on discs Rotilabo Test Leaves (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and they were aerobically cultivated during 4 days at 37°C. We evaluated formation of clarified zones (Havlová *et al.*, 1993). Production of exopolysaccharides (EPS) was tested on medium that contained saccharose, renewed skimmed dried milk and ruthenium red (Sigma-Aldrich, St.

Luis, USA). After inoculation of overnight cultures of strains, Petri dishes were aerobically cultivated 72 hours at 37°C. Production of EPS were evaluated according to colour of grown colonies (Stingele *et al.*, 1996).

### Results and Discussion

In previous studies, (Kološta *et al.*, 2014; Klapáčová *at al.*, 2015) were isolated and identified 3 strains of lactobacilli from goat's milk: *Lactobacillus paracasei* (21/L10), *Lactobacillus johnsonii* (KB2-1) and *Lactobacillus paraplantarum* (25/1L). These strains were characterized as homofermentative; with production of lactic acid, production of minimal quantities of acetaldehyde and no production of CO<sub>2</sub>. Strains 21L10 and 25/1L had lower lactase activity. They grew at 37°C and tolerated concentration of NaCl up to 5%, with exception of KB2-1. All the strains had low proteolytic activity. In this study, technological characteristics were complemented by other properties. In goat's milk, optimal concentration of urea is about 200 mg.l<sup>-1</sup> (Pazolla *et al.*, 2011). However, in case of poor nutrition or metabolic disorders, amount of urea can be higher. It has a negative impact on yield during process of cheese-making and activity of applied starters. If starters have an urease activity, what is standard in starters (Mora *et al.*, 2002), in that case, products of urea can inhibit their growth. Strains 21L10 and 25/1/L were capable to grow and produce organic acids even in conditions with higher amount of urea. Consequently, they did not have an urease activity considering colour change to yellow. The strain KB2-1 did not show any urease activity, nevertheless, in a test medium did not grow and there was not observed any change of colour. It is questionable, of course, if the reason is either higher concentration of urea or absence of certain growth factors. Neither growth nor urease activity depended on temperature of cultivation (30°C and 37°C). Lipolytic activity is decomposition of fats up to free fatty acids. They can undergo other changes that can result in adverse sensory properties (staling of fats) or on the contrary, attractive sensory properties (production of various aromatic substances as esters, ketones, lactones) – in goat's cheeses it is e.g. wax like taste (Singh and Cadwallader, 2009). In general, lipolytic activity in lactobacilli is low. According to API assay results (Kološta *et al.*, 2014), no one of the strains showed significant activity of lipase (C14), esterase lipase (C8) or esterase (C4). Moreover, no clarified zones were observed on the test medium with tributyrin. Based on these results, we can declare that the strains did not have any significant lipolytic activity. LAB, including lactobacilli can produce EPS. EPS had considerably variable quantity and structure. They are used as natural thickening agents in process of production of lactic acid beverages and they improve structure of cheeses. Their prebiotic effect is subject of researches (Badel *et al.*, 2011). All of examined strains grew on test medium and they formed pink colonies. Thus they can be considered as suspect ropy strains (Mora *et al.*, 2002).

### Acknowledgments

This study was supported by the projects: ITMS 26220220065 and ITMS 26220220152 which are co-funded from the European Regional Development Fund and grant KEGA No. 011UVLF-4/2012.

### References

- BADEL, S., BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no. 1, p. 54-66.
- GUESSAS, B.; KIHAL, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, no. 6, p. 339-342.
- HAVLOVÁ, J.; JIČÍNSKÁ, E.; HRABOVÁ, H. Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobku. 1993, Praha: ÚZPI, 243 pp.

KLAPÁČOVÁ, L.; SLOTTOVÁ, A.; BUJŇÁKOVÁ, D.; GREIF, G.; KMEŤ, V.; DRONČOVSKÝ, M.; GREIFOVÁ, M.; KOLOŠTA, M.; TOMÁŠKA, M.; DUDRÍKOVÁ, E. Vybrané technologické vlastnosti laktobacilov izolovaných z kozieho mlieka. In *Výsledky prehľadov a zborník prednášok konferencie Celostátní prehľadky sýru Mléko a sýry*. 2014. 2015 (accepted).

KOLOŠTA, M.; SLOTTOVÁ, A.; DRONČOVSKÝ, M.; KLAPÁČOVÁ, L.; KMEŤ, V.; BUJŇÁKOVÁ, D.; LAUKOVÁ, A.; GREIF, G.; GREIFOVÁ, M.; TOMÁŠKA, M. Selection of lactobacilli from ewe's and goat's milk for their further technological re-utilisation. *Potravinárstvo*, 2014, (accepted).

LANYI, B. Classical and rapid identification: methods for medically important bacteria. In *Methods in Microbiology*. 1987, Vol. 19, ed. Colwell, R.R. and Grigorova, R. New York: Academic Press. p. 1-67.

MÁDEROVÁ, E. Kliešťová encefalitída na Slovensku, *Via practica*, 2005, vol. 2, no. 1, p.51-54.

MARGETÍN, M. Chov oviec a kôz. 2014. Dostupné na internete: [www.chzvmos.sk/chov-oviec-koz.html](http://www.chzvmos.sk/chov-oviec-koz.html).

MORA, D.; FORTINA, M.G. ; PARINI, C.; RICCI, G.; GATTI, M.; GIRAFFA, G.; MANACHINI, P.L. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 93, no. 2, p. 278–287.

PAZZOLA, M.; DETTORI, M.L.; CARCANGIU, V.; LURIDIANA, S.; MURA, M.C; VACCA, G.M. Relationship between milk urea, blood plasma urea and body condition score in primiparous browsing goats with different milk yield level. *Archiv Tierzucht*, 2011, vol. 54, no. 5, p. 546-556.

SPUERGIN, P.; WALTER, M.; SCHILTZ, E.; DEICHTNANN, K.; FORSTER, J.; MUELLER, H. Allergenicity of  $\kappa$ -caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy*, 1997, vol. 52, no. 3, p. 293-298.

PAZZOLA, M.; DETTORI, M.L.; CARCANGIU, V.; LURIDIANA, S.; MURA, M.C; VACCA, G.M. Relationship between milk urea, blood plasma urea and body condition score in primiparous browsing goats with different milk yield level. *Archiv Tierzucht*, 2011, vol. 54, no. 5, p. 546-556.

SINGH, T.K.; CADWALLADER, K.R. (2009) Cheese, In *Dairy Processing and Quality Assurance*. ed. Chandan, R.C et al., 2009, New Jersey:Wiley-Blackwell, p. 273–308.

STINGELE, F.; NEESER, J.-R.; MOLLET, B. Identification and characterisation of the eps gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 6, 1680-1690.

**Contact address:** Lýdia Klapáčová, MVDr., University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, [klapacol@gmail.com](mailto:klapacol@gmail.com).

## Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from fruit, vegetable, water and environmental swabs in the Czech Republic

<sup>1,2</sup>Vojtkovská Hana, <sup>1,2</sup>Karpíšková Renáta, <sup>3</sup>Oriesková Mária, <sup>3</sup>Drahovská Hana

<sup>1</sup>Veterinary Research Institute, Department of Bacteriology, Brno

<sup>2</sup>University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Brno

<sup>3</sup>Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Bratislava

### Summary

The genus *Cronobacter*, a member of the family Enterobacteriaceae, comprises a group of opportunistic pathogens associated with serious infections in neonates. Although the outbreaks of *Cronobacter* spp. were associated with consumption of contaminated powdered infant formula, bacteria have been isolated from a wide range of foods and environments and their natural reservoir remains unknown. Tracing of *Cronobacter* spp. is therefore an important tool for epidemiological studies. The occurrence of *Cronobacter* in food of plant origin has been reported many times already, and probably reflects the natural habitat for the bacterium. In this study, 476 samples collected from 11 local farmers, including vegetable, fruit, water and environmental swabs, were analyzed for the presence of *Cronobacter* spp. by culture-based method. A total of 43 *Cronobacter* spp. strains obtained were identified on the species level by means of multilocus sequence typing (MLST) and further subtyped by applying PCR based O-antigen serotyping. The antimicrobial susceptibility of *Cronobacter* isolates was determined by standard disk diffusion method. Identification of *Cronobacter* strains potentially containing the thermotolerance island was performed by PCR targeting *thrI* gene. Culture-based method was also performed to indicate capsule-forming *Cronobacter* isolates.

**Keywords:** plant; MLST; thermotolerance island; resistance

### Introduction

*Cronobacter* spp. (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) are considered to be opportunistic pathogens, associated with severe and life-threatening cases of bacteraemia, necrotizing enterocolitis and meningitis in neonates and infants with fatality rates as high as 80%. Dried infant milk formula has been implicated as the vehicle of transmission in many clinical cases, however the primary reservoirs of these bacteria remain undefined due to their ubiquitous nature (Turcovsky *et al.*, 2010). Currently, seven species and three subspecies of the genus *Cronobacter* are described due to polyphasic taxonomic approach (Gajdosova *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012).

The presence of *Cronobacter* spp. in both fresh and dry foods of plant origin is related to the fact, that plant material represents natural habitat for these bacteria (Turcovsky *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2009). The ability to produce a yellow pigment, the formation of a gum-like extracellular polysaccharide (capsule), tolerance to low pH as well as their ability to resist desiccation during long dry periods contributes to their survival also under improper conditions (Schmid *et al.*, 2009; Orieskova *et al.*, 2013). Increased thermotolerance of some *Cronobacter* strains is facilitated by the unique genomic region (thermotolerance island), which is present in about 10% of *C. sakazakii* and *C. malonaticus* strains (Orieskova *et al.*, 2013).

Little information is available on the prevalence of these organisms in food products and environment in the Czech Republic. Therefore in this study, 476 samples of vegetable, fruit, water and environmental swabs collected from 11 local farmers in the Czech Republic, were analyzed for the presence of *Cronobacter* spp.

## Material and Methods

*Cronobacter* strains were isolated from samples analyzed within the surveillance program for safety of food of plant origin in the Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic in 2012 – 2013 (Table 1) using the two-step enrichment method consisting of pre-enrichment in buffered peptone water (BPW, Oxoid) and selective enrichment in *Cronobacter* Screening Broth (CSB, Oxoid). Presumptive *Cronobacter* strains were isolated as typical green-blue colonies grown on *Enterobacter sakazakii* Agar, Modified (ESIA, Fluka) or Druggan-Forsythe-Iversen agar (DFI, Oxoid). Identification of *Cronobacter* spp. was confirmed by in house developed real-time PCR system. Production of yellow pigment and capsule-forming colonies were tested on Luria-Bertani agar (LB, non-commercial) with addition of powdered infant formula. Tests for the oxidase, catalase and indol production were performed using conventional methods. The antimicrobial susceptibility of *Cronobacter* isolates was determined by standard disk diffusion method. The tested antimicrobial agents including zone diameter interpretive criteria are listed in Table 2.

Table 1: Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in analyzed sample categories.

Origin	Sample category	Number of analyzed samples	Number of positive samples	Species and serotypes	Number of <i>thrI</i> positive isolates
vegetable	carrot	118	19 (16.1%)	CS (O:1, O:2), CT (O:1, O:3), CU, CD, CZ, Ni	0
	cucumber	110	16 (14.5%)	CS (O:1, O:2, O:4), CD, CZ	0
	lettuce	90	1 (1.1%)	CT*	0
fruit	strawberry	40	1 (2.5%)	CS O:1	1
water	-	16	1 (6.3%)	CT O:1	0
env. swabs	-	102	5 (4.9%)	CS O:1, CT O:1	2

\* serotype unknown

CS = *Cronobacter sakazakii*, CT = *Cronobacter turicensis*, CU = *Cronobacter universalis*, CD = *Cronobacter dublinensis*, CZ = *Cronobacter zurichensis*, Ni = not identified

The bacterial DNA was isolated from overnight culture using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). The *Cronobacter* strains were identified on the species level by multilocus sequence typing method (MLST). PCR based O-antigen serotyping enabled further subtyping of *Cronobacter* strains and PCR targeting *thrI* gene identified isolates potentially containing the thermotolerance island.

## Results

Forty-three *Cronobacter* strains were isolated and further identified from 358 food, 102 environmental and 16 water samples, such that 43 samples (9.0%) were positive. The data documented occurrence and characterization of 43 *Cronobacter* isolates. Analyzed sample categories are listed in Table 1. All isolated strains, except four isolates resistant to sulphonamides and one intermediate resistant to gentamicin were sensitive to the 19 antimicrobial agents tested. The production of the typical yellow pigment was apparent in 88.4% tested *Cronobacter* isolates. The formation of capsule was observed in 81.4% of isolates.

Table 2: Antimicrobial agents and zone diameter interpretive criteria used for antimicrobial resistance testing.

Antimicrobial agent	Disk content ( $\mu\text{g}$ )	Zone diameter (mm)		
		R	I	S
Ampicilin	10	$\leq 13$	14 – 16	$\geq 17$
Amoxicillin/Clavulanic acid	30	$\leq 13$	14 – 17	$\geq 18$
Cefotaxime	30	$\leq 14$	15 – 22	$\geq 23$
Meropenem	10	$\leq 15$	16 – 21	$\geq 22$
Chloramphenicol	30	$\leq 12$	13 – 17	$\geq 18$
Streptomycin	10	$\leq 11$	(12 – 14)	$\geq 15$
Kanamycin	30	$\leq 13$	14 – 17	$\geq 18$
Gentamicin	10	$\leq 12$	13 – 14	$\geq 15$
Neomycin	30	$\leq 12$	13 – 16	$\geq 17$
Apramycin	15	$\leq 11$	12 – 14	$\geq 15$
Sulphonamides	300	$\leq 12$	13 – 16	$\geq 17$
Sulfomethoxazole/Trimetoprim	25	$\leq 10$	(11 – 15)	$\geq 16$
Trimetoprim	5	$\leq 10$	(11 – 15)	$\geq 16$
Tetracycline	30	$\leq 14$	15 – 18	$\geq 19$
Nalidixic acid	30	$\leq 13$	14 – 18	$\geq 19$
Ciprofloxacin	5	$\leq 15$	16 – 20	$\geq 21$
Enrofloxacin	5	$\leq 16$	17 – 19	$\geq 20$
Colistin	10	$\leq 8$	9 – 10	$\geq 11$
Aztreonam	30	$\leq 17$	18 – 20	$\geq 21$

## Discussion

Although outbreaks of *Cronobacter* spp. have been associated with the consumption of contaminated powdered infant formula, other so far unidentified environmental sources undoubtedly exist (FAO/WHO, 2008). *Cronobacter* spp. are frequently present in various foods, in particular fresh and dry foods of plant origin (Turcovsky *et al.*, 2010).

From 318 vegetable samples investigated in this study 36 (11.3%) were *Cronobacter* spp. positive. In other studies, the prevalence of these bacteria in vegetable ranged between 0 and 30% (Chon *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). The differences in bacteria prevalence may be due to the smaller number of samples analyzed, the source of samples or diverse food industry hygiene levels among particular countries (Li *et al.*, 2014). The lower prevalence of *Cronobacter* spp. was observed in strawberries and environmental samples collected on the farms (water and swabs) (Table 1).

Species identification of strains of the genus *Cronobacter* is of great importance for epidemiological studies. As in studies in other countries, most of the *Cronobacter* isolates (41.9%) were identified as *Cronobacter sakazakii* (Li *et al.*, 2014; Turcovsky *et al.*, 2010). Other identified *Cronobacter* species were *C. turicensis* (23.3%), *C. dublinensis* (18.6%), *C. universalis* (2.3%), and new epithet (Brady *et al.*, 2013), *C. zurichensis* (7.0%). The distribution of *Cronobacter* spp. serotypes is listed in Table 1.

Infections caused by *Cronobacter* species can be successfully treated with ampicillin-gentamicin or ampicillin plus chloramphenicol drug therapy (Li *et al.*, 2014). Although previous studies reported strains resistant to these antimicrobial agents (Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), all isolates in our study were susceptible to both ampicillin and chloramphenicol and only one displayed intermediate resistance to gentamicin. Four isolates were resistant to sulphonamides.

Increased thermotolerance of some *Cronobacter* strains is mediated by the presence of unique genomic island, while production of a bacterial capsule enables efficient survival in desiccated environment (Orieskova *et al.*, 2013). This thermotolerance island was detected in

*C. sakazakii* and *C. malonaticus* strains (Gajdosova *et al.*, 2011). PCR targeting *thrI* gene (one of conserved genes in the genomic region) identified three potentially thermoresistant isolates of *C. sakazakii* O:1. Additionally, 81.4% of *Cronobacter* isolates formed capsule and 88.4% typical yellow pigment, which corresponds with environmental origin of our strains.

## Conclusion

The wide spectrum of *Cronobacter* strains isolated from vegetable, fruit and related environment refers to diversity of representatives of this genus in the Czech Republic. Further isolation and characterization of *Cronobacter* spp. especially from food is of great importance for coming epidemiological studies.

## Acknowledgements

This study was financially supported by research project OneHealth LO1218 and Mykovir QJ1210114.

## References

- BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013, vol. 36, no. 5, p. 309-319.
- CHON, J. W.; SONG, K. Y.; KIM, S. Y.; HYEON, J. Y.; SEO, K. H. Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. *Journal of Food Science*. 2012, vol. 77, no. 7, p. M354-M358.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2008. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series No. 6. 59pp.
- GAJDOSOVA, J.; BENEDIKOVICOVA, K.; KAMODYOVA, N.; TOTHOVA, L.; KACLIKOVA, E.; STUHLIK, S.; TURNA, J.; DRAHOVSKA, H. Analysis of the DNA region mediating increased thermotolerance at 58°C in *Cronobacter* sp. and other enterobacterial strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011, vol. 100, no. 2, p. 279-289.
- LEE, Y. D.; PARK, J. H.; CHANG, H. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control*. 2012, vol. 24, no. 1-2, p. 225-230.
- LI, Y.; CHEN Q.; ZHAO, J.; JIANG, H.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*. 2014, vol. 37, p. 109-114.
- ORIESKOVA, M.; GAJDOSOVA, J.; OSLANECOVA, L.; ONDREICKOVA, K.; KACLIKOVA, E.; STUHLIK, S.; TURNA, J.; DRAHOVSKA, H. Function of thermotolerance genomic island in increased stress resistance of *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013, vol. 52, no. 1, p. 37-44.
- SCHMID, M.; IVERSEN, C.; GONTIA, I.; STEPHAN, R.; HOFMANN, A.; HARTMANN, A.; JHA, B.; EBERL, L.; RIEDEL, K.; LEHNER, A. Evidence for plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Research Microbiology*. 2009, vol. 160, no. 8, p. 608-614.
- TURCOVSKY, I.; KUNIKOVA, K.; DRAHOVSKA, H.; KACLIKOVA, E. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011, vol. 99, no. 2, p. 257-269.
- YAN, Q. Q.; CONDELL, O.; POWER, K.; BUTLER, F.; TALL, B. D.; FANNING, S. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, vol. 113, no. 1, p. 1-15.

**Contact address:** Hana Vojkovská, Ing., Veterinary Research Institute, Department of Bacteriology, Hudcova 70, 621 00 Brno, vojkovska@vri.cz.

## Identifikácia probiotických baktérií izolovaných zo pstruha dúhového Identification of probiotic bacteria isolated from rainbow trout

<sup>1</sup>Fečkaninová Adriána, <sup>1</sup>Popelka Peter, <sup>1</sup>Mudroňová Dagmar, <sup>1</sup>Koščová Jana,  
<sup>2</sup>Javorský Peter

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice  
<sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Slovenská akadémia vied, Košice

### Summary

Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. Numbers of lactic acid producing bacteria ( $11.05 \log_{10} \text{cfu/g}$ ), enterobacteria ( $7.30 \log_{10} \text{cfu/g}$ ) and total aerobic bacteria ( $6.29 \log_{10} \text{cfu/g}$ ) in intestines of rainbow trout. Then using the MALDI-TOF method were isolated lactic acid producing bacteria in each sample identified by the score and categories of consistency. Bacteria identified with the best scores were *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. fermentum* and *L. brevis*.

**Keywords:** maldi-tof; probiotics; rainbow trout

### Úvod

FAO/WHO (2002) definuje probiotiká ako biopreparáty obsahujúce živé mikroorganizmy, ktoré ak sú aplikované v adekvátnom množstve majú pozitívny vplyv na zdravie organizmu. V oblasti akvakultúry, Verschuer a kol. (2000) rozšíril pojem probiotiká na „živý mikrobiálny doplnok, ktorý má priaznivý vplyv na hostiteľa zaistením lepšieho využitia krmiva a zvýšenie jeho nutričnej hodnoty tým, že zvyšuje odozvu hostiteľa k ochoreniu a zlepšuje kvalitu jeho vonkajšieho prostredia“.

### Materiál a metódy

V pokuse bolo použitých 6 kusov pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) o hmotnosti  $180 \pm 20$  g získaných z rybochovného zariadenia firmy Rybárstvo Požehy s.r.o. Ryby boli kŕmené extrudovaným kompletným krmivom pre pstruhy (5 mm pelety) obsahujúcim rybiu múčku, rybí olej, obilniny, olejiny, vitamínovo-minerálny premix a antioxidanty. Pstruhy boli z miesta výlovu prepravené počas 4 hodín v živom stave do laboratória, následne usmrtené a odobrali sa vzorky črevného obsahu za účelom mikrobiologického vyšetrenia.

### Mikrobiologické vyšetrenie črevného obsahu a izolácia probiotických baktérií

Črevný obsah (0,5 alebo 1 g) bol riedený vo fyziologickom roztoku (desiatkové riedenie  $10^{-1}$  až  $10^{-6}$ ). Z riedení sa vzorky inokulovali na príslušné živné médiá (deMan, Rogosa a Sharpe agar - MRS, krvný agar - KA, ENDO agar) a inkubovali sa pri laboratórnej teplote aeróbne (KA, ENDO), anaeróbne, resp. mikroaerofilne (MRS). Následne po inkubácii boli stanovené počty celkových KMB (kyslomliečnych baktérií) (MRS), počty enterobaktérií (ENDO), celkové počty aeróbných baktérií (KA).

### Identifikácia probiotických baktérií

Metóda MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) predstavuje metódu hmotnostná spektrometria (MS), ktorá umožňuje presné meranie molekulovej hmotnosti širokej škály látok. Metóda podľa De Bruynea a kol. (2011) je vysoko spoľahlivá pre identifikáciu a presné taxonomické zatriedenie do príslušných rodov a druhov izolovaných mikroorganizmov (Tabuľka 1 a 2).



Tabuľka 1: Význam hodnôt skóre.

Rozsah	Popis	Symboly
2,300 ... 3,000	Vysoko pravdepodobná identifikácia druhu	(+++)
2,000 ... 2,299	Bezpečná identifikácia rodu, pravdepodobná identifikácia druhu	(++)
1,700 ... 1,999	Pravdepodobná identifikácia rodu	(+)
0,000 ... 1,699	Nie je spoľahlivá identifikácia	(-)

Tabuľka 2: Význam kategórií konzistencie (A - C).

Kategória	Popis
A	Druhovú konzistenciu: Najlepší nález bol klasifikovaný ako (+++). Ďalšie (++) nálezy sú rovnakého druhu ako prvý. Ďalšie (+) nálezy sú prinajmenšom rovnakého rodu ako prvý.
B	Rodovú konzistenciu: Najlepší nález bol klasifikovaný ako (+++; ++), alebo (+). Ďalšie (+++; ++), alebo (+) nálezy sú prinajmenšom rovnakého rodu ako prvý. Podmienky druhovej konzistencie nie sú splnené.
C	Nie je konzistencia: Nie je druhová ani rodová konzistencia.

### Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky budú spracované popisnou štatistikou a stanovením trendu vzostupu resp. poklesu sledovaných baktérií v programe GraphPad Prism verzia 5,00 (2007).

### Výsledky

Výsledky stanovenia počtu kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií (KMB), počtu enterobaktérií (ENDO) a počtu celkových aeróbných baktérií (KA) sú uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3: Počty kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií (KMB), enterobaktérií (ENDO) a celkových aeróbných baktérií (KA) v črevnom obsahu pstruha dúhového.

	KMB		ENDO		KA	
		log <sub>10</sub> cfu/g		log <sub>10</sub> cfu/g		log <sub>10</sub> cfu/g
1	1,2.10 <sup>11</sup>	11,18	2,6.10 <sup>6</sup>	6,96	2.10 <sup>3</sup>	3,69
2	1,4.10 <sup>11</sup>	11,34	4.10 <sup>5</sup>	5,39	3,75.10 <sup>5</sup>	5,32
3	2,7.10 <sup>10</sup>	10,99	2,1.10 <sup>8</sup>	8,74	3.10 <sup>8</sup>	8,10
4	1,7.10 <sup>11</sup>	11,53	7.10 <sup>8</sup>	8,95	1,1.10 <sup>7</sup>	7,10
5	1,2.10 <sup>11</sup>	11,18	1,8.10 <sup>6</sup>	6,59	8.10 <sup>6</sup>	6,08
6	8.10 <sup>10</sup>	10,08	3,2.10 <sup>7</sup>	7,16	4,2.10 <sup>7</sup>	7,44
Priemer ± SD		<b>11,05 ± 0,51</b>		<b>7,30 ± 1,35</b>		<b>6,29 ± 1,61</b>

V Tabuľke 4 sú uvedené výsledky identifikácie probiotických baktérií použitím MALDI-TOFu na základe skóre a kategórií konzistencie. Okrem probiotických baktérií uvedených v Tabuľke 4 boli identifikované so skóre (+++), (++) a (+) aj *Lactobacillus plantarum* spp. *argentoratensis* a *L. pentosus*.

Tabuľka 4: Identifikácia probiotických baktérií použitím MALDI-TOFu na základe skóre a kategórií konzistencie.

Vzorka	Najlepšie skóre	Skóre	Druhé najlepšie skóre	Skóre
1 (++) (B)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	2,127	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,088
2 (+++) (A)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,403	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,364
3 (++) (A)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,14	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,042
4 (+++) (A)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,337	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,326
5 (+) (B)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,964	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,93
6 (+++) (A)	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,35	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,283

### Diskusia

Na rozdiel od suchozemských zvierat, gastrointestinálna mikroflóra vodných druhov je závislá na vonkajšom prostredí. Väčšina baktérií sa v čreve nachádza v dôsledku konštantného príjmu vody a potravy (Martinez-Cruz a kol., 2012). Probiotiká sa používajú v akvakultúre k zvýšeniu rastu chovaných druhov. Používanie probiotík je aj alternatívou pre inhibíciu patogénov v akvakultúre. Robertson a kol. (2000) izolovali kmeň *Carnobacterium* sp. z čreva lososa a aplikovali ho pstruhovi dúhovému a lososovi obyčajnému, pričom demonštrovali *in vitro* antagonizmus proti rybím patogénom: *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela* a *Vibrio* sp. Štúdie naznačujú, že probiotiká majú priaznivý vplyv na tráviace procesy vodných živočíchov, v prípade pstruha dúhového boli pozitívne výsledky získané pri použití *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* a *Enterococcus faecium* (Merrifield a kol., 2010).

### Podakovanie

Práca bola spracovaná s podporou grantu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA 1/0067/13.

### Literatúra

- DE BRUYNEA, K. a kol.: Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34, s. 20-29.
- FAO/WHO, 2002. Joint working group report on rafting guidelines for the probiotics in food. London, Ontario, Canada, [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html)
- MARTÍNEZ, C. P. a kol. Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, doi:10.5402/2012/916845.
- MERRIFIELD, D. L. a kol. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16, s. 496–503.
- ROBERTSON, P. A. W. a kol. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 2000, 185, s. 235–243.
- VERSCHUERE, L. a kol. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, vol. 64, no. 4, s. 655-671.

**Kontaktná adresa:** Adriána Fečkaninová, Mgr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, [adriana.feckaninova@gmail.com](mailto:adriana.feckaninova@gmail.com).

## Stanovenie rezistencie druhovo identifikovaných izolátov stafylokokov z mäsa kráľika divého (*Oryctolagus cuniculus*) voči vybraným antibiotikám

### Resistance determination of species-identified staphylococcal isolates from the meat of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) to selected antibiotics

<sup>1</sup>Marušková Katarína, <sup>1</sup>Pipová Monika, <sup>1</sup>Jevinová Pavlína, <sup>2</sup>Kmet' Vladimír, <sup>1</sup>Regecová Ivana

<sup>1</sup>Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF v Košiciach

<sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

#### Summary

The aim of this study was to assess the resistance of species-identified coagulase-negative staphylococci to seven antibiotics (penicillin, tetracycline, erythromycin, oxacillin, ampicillin, gentamicin and ceftiofur) using the agar dilution method and the disc diffusion method according to Kirby-Bauer. Thirty-seven isolates of staphylococci were isolated from the meat of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Species identification with the help of MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonics Inc, USA) confirmed 17 strains as *S. warneri*, 10 strains as *S. epidermidis*, 5 strains as *S. xylosum*, 3 strains as *S. capitis*, 1 strain as *S. cohnii* subsp. *cohnii* and 1 strain as *Staph. pasteurii*. Resistance to ampicillin (26 strains), ceftiofur (26 strains), erythromycin (24 strains) and penicillin (22 strains) were observed most frequently among staphylococcal isolates. Simultaneous resistance to 2 – 4 antibiotics was detected in each of 37 staphylococcal isolates tested. The most common multiresistance was determined in strains of *S. warneri*.

**Keywords:** resistance; antibiotics; coagulase negative staphylococci

#### Úvod

V podmienkach oslabenej imunity môžu niektoré patogénne kmene stafylokokov spôsobiť vážne infekcie u ľudí a zvierat. Okrem koagulázo-pozitívneho druhu *Staphylococcus aureus* majú klinický význam aj niektoré z koagulázo-negatívnych stafylokokov (KNS), najmä *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* a *S. capitis* (Votava a kol., 2003). Cieľom práce bolo stanoviť rezistenciu identifikovaných druhov koagulázo-negatívnych izolátov stafylokokov z mäsa kráľika divého (*Oryctolagus cuniculus*) voči vybraným antibiotikám s použitím agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy.

#### Materiál a metodika

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie boli odobraté z chrbtovej a stehennej svaloviny kráľikov divých (*Oryctolagus cuniculus*) pochádzajúcich z farmového chovu Účelového zariadenia pre chov zveri a rýb v Rozhanovciach (SR). Kráľiky boli zabitú vykrvením. Základná suspenzia a ďalšie desaťnásobné riedenia sa pripravili podľa pokynov STN EN ISO 6887-2/O1. Z odobratých vzoriek boli stafylokoky izolované v zmysle pokynov STN EN ISO 6888-1/A1. Druhová identifikácia bola vykonaná použitím hmotnostnej spektrometrie proteínových profilov vyhodnocovaných systémom MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonics Inc, USA). Všetky izoláty stafylokokov boli podrobené skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúške (Staphylo PK, Imuna, SR) a testu na produkciu deoxyribonukleázy (DNázy) na DNázovom agare (Oxoid, Veľká Británia). Citlivosť jednotlivých izolátov stafylokokov na vybraných sedem antibiotík (penicilín, ampicilín, oxacilín, tetracyklín, erytromycín, gentamicín a ceftiofur) bola zisťovaná pomocou agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií stanovených CLSI (2012),

na základe ktorých boli jednotlivé izoláty zaradené medzi rezistentné (R), intermediárne citlivé (I) alebo citlivé (C).

### Výsledky a diskusia

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek z chrbtovej a stehennej svaloviny králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*) sa získalo 37 izolátov stafylokokov. Všetky izoláty boli na základe výsledkov skúmavkovej plazmokoagulázovej skúšky koaguláza-negatívne (KNS) a prítomnosť DN-ázy sa u nich nepotvrdila. Pomocou systému MALDI BioTyper™ bola u týchto izolátov vykonaná druhová identifikácia, na základe ktorej bolo identifikovaných 17 kmeňov *S. warneri*, 10 kmeňov *S. epidermidis*, 5 kmeňov *S. xylosus*, 3 kmene *S. capitis*, 1 kmeň *S. cohnii* subsp. *cohnii* a 1 kmeň *S. pasteurii*. Všetky kmene boli podrobené testovaniu citlivosti na vybrané antibiotiká pomocou agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy.

Vychádzajúc z dosiahnutých výsledkov (Tab. 1 a 2) bola u izolátov *S. warneri* a *S. xylosus* oboma metódami najčastejšie zaznamenaná rezistencia k ampicilínu, erytromycínu, penicilínu a cefoxitínu a u izolátov *S. epidermidis* rezistencia k erytromycínu a cefoxitínu. U kmeňov *S. capitis* bola najčastejšie potvrdená rezistencia k cefoxitínu, ampicilínu a penicilínu. Izoláty *S. cohnii* subsp. *cohnii* a *S. pasteurii* boli rezistentné na cefoxitín, ampicilín a penicilín.

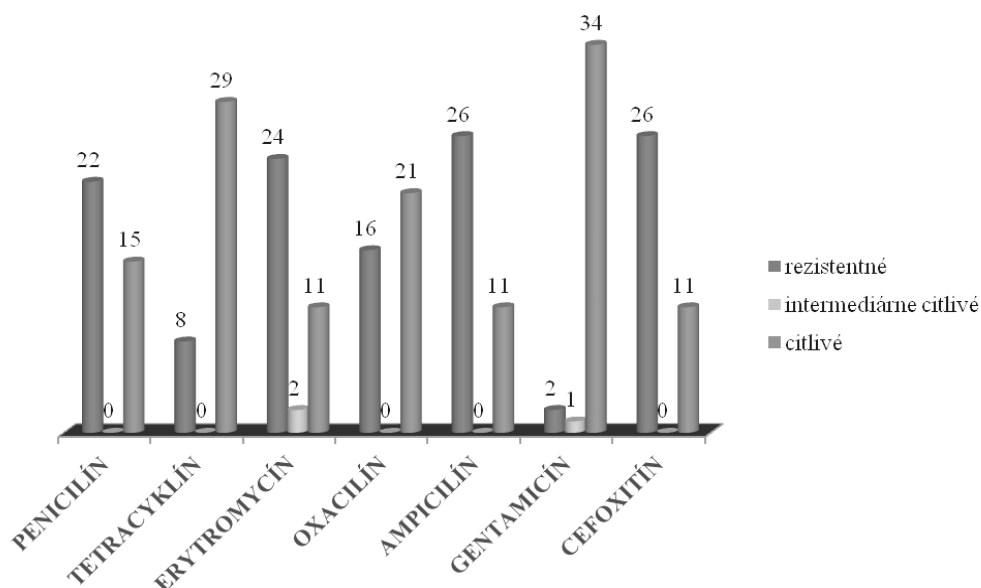
Tabuľka 1: Prehľad počtu rezistentných (R), intermediárne citlivých (I) a citlivých (C) izolátov stafylokokov z mäsa králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) na penicilín, tetracyklín, erytromycín a oxacilín.

Druh	Počet izolátov	Penicilín			Tetracyklín			Erytromycín			Oxacilín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S.warneri</i>	17	11	0	6	2	0	15	12	1	4	8	0	9
<i>S.epidermidis</i>	10	3	0	7	6	0	4	8	0	2	3	0	7
<i>S.xylosus</i>	5	4	0	1	0	0	5	3	0	2	4	0	1
<i>S.capitis</i>	3	2	0	1	0	0	3	1	0	2	0	0	3
<i>S.cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>S.pasteurii</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1

Tabuľka 2: Prehľad počtu rezistentných (R), intermediárne citlivých (I) a citlivých (C) izolátov stafylokokov z mäsa králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) na ampicilín, gentamicín a cefoxitín.

Druh	Počet izolátov	Ampicilín			Gentamicín			Cefoxitín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S.warneri</i>	17	15	0	2	0	0	17	11	0	6
<i>S.epidermidis</i>	10	3	0	7	2	0	8	6	0	4
<i>S.xylosus</i>	5	4	0	1	0	0	5	2	0	3
<i>S.capitis</i>	3	2	0	1	0	0	3	3	0	2
<i>S.cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>S.pasteurii</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

Z grafu 1 je zrejme, že z celkového počtu stafylokokových izolátov bola najčastejšie zaznamenaná rezistencia k ampicilínu (26 kmeňov), cefoxitínu (26 kmeňov), erytromycínu (24 kmeňov) a penicilínu (22 kmeňov). U všetkých 37 kmeňov bola preukázaná súčasná rezistencia na 2 – 4 testované antibiotiká. Multirezistencia bola najčastejšie potvrdená u kmeňov *S. warneri*.



Graf 1: Citlivosť izolátov stafylokokov z mäsa králika divého na vybrané antibiotiká.

Uvedené výsledky nie je možné porovnať s podobnými výsledkami iných autorov, pretože tieto v súčasnosti zatiaľ nie sú k dispozícii. Väčšina autorov vo svojich prácach týkajúcich sa stafylokokov izolovaných z mäsa králikov uvádza výsledky štúdia najvýznamnejšieho koaguláza-pozitívneho druhu *S. aureus* (Vancrayenest a kol, 2006; Simonová a kol, 2007).

### Záver

Zvýšená a neuvážená spotreba antibiotík, či využitie antimikrobiálnych látok vo výžive zvierat, pri produkcii rastlín, krmív a potravín spôsobujú nárast výskytu rezistentných baktérií, ktoré prechádzajú do organizmu ľudí priamo alebo nepriamo. Hlavným dôvodom monitorovania citlivosti baktérií z hľadiska zdravia ľudí je ochrana konzumentov pred rezistentnými mikroorganizmami.

### Literatúra

CLSI document M100-S22; CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement.. Wayne, PA, USA. 2012, 184 s.

STN EN ISO 6887-2/O1 Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 2: Špecifické pokyny na úpravu mäsa a mäsových výrobkov (ISO 6887-2: 2003).

STN EN ISO 6888-1/A1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov (*Staphylococcus aureus* a ďalšie druhy). Časť 1: Metóda s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média (ISO 6888-1: 1999/Amd 1: 2003).

SIMONOVÁ, M.; FOTTA, M.; LAUKOVÁ, A. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits. *Folia Microbiologica*. 2007, vol. 52, no.3, s. 291-296.

VANCRAYENEST, D. a kol. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J. Vet. Med.* 2006; 53: s. 418 – 422.

Votava, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptún, Brno, 2003, 495 s.

**Kontaktná adresa:** Katarína Marušková, RNDr., Katedra hygieny a technológie potravín UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, katarina.maruskova@gmail.com.

## **Chemical and microbiological parameters determining shelf-life of sausages with fish meat (*Cyprinus carpio* L.)**

**Kašpar Ladislav, Buchtová Hana, Hulánková Radka**

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

### **Summary**

*The aim of this study was to evaluate (in relation to the chemical parameters) the microbiological quality of sausages containing fish meat and stored in air or under vacuum at 4°C for 30 days. The sausages were prepared from carp meat (45%) and pork (55%) and thermally processed. Throughout the storage period samples from both fish and control sausages were analysed for Total Viable Count (TVC) and counts of *E. coli*, lactic acid bacteria and psychrotrophic bacteria. Whereas *E. coli* was not detected during the storage, all the other monitored groups of bacteria steadily increased in numbers towards the end of storage. There were no statistically significant differences between the groups of fish and control sausages or vacuum and air packaging, although the air-packed fish sausages showed the highest TVC. The results show that despite fish meat being known as highly sensitive to spoilage, the cooked fish sausages didn't show considerably higher microbial growth when compared to control. However, the fish sausages showed worse chemical parameters.*

**Keywords:** fish sausages; carp; *E. coli*; TVC; LAB; psychrotrophic

### **Introduction**

Fish consumption is not very high in the Czech Republic, which may be related at least partially to its specific smell and short shelf-life when compared to other meat. Spoilage of fish and fish products is a result of the production of off-odours and off-flavours mainly caused by bacterial metabolites (Gram and Huss, 1996). Fish meat is particularly sensitive to microbial spoilage due to its relatively high water content and high pH (Buchtová a Vorlová, 2001). Thermal processing is among the most often applied techniques for the production of safe and acceptable fish products extending at the same time their shelf-life. (Arvanitoyannis and Kotsanopoulos, 2012).

Since fish is a good source of protein and is a dietetic food, it is of importance for human consumption. Carp rank with the most frequently consumed freshwater fish making up almost 85% of the local commercial fish production. High dietetic value and organoleptic qualities of carp tissues result from their chemical composition, containing essential amino acids, polyunsaturated fatty acids and minerals like calcium and phosphorus (Buchtová a Vorlová, 2001).

Therefore, it is necessary to encourage the public to consume fish through extended activities and by producing attractive half-ready or ready products that save labour and time, have a longer shelf-life and can be found throughout the year (Arslan et al., 2001).

The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of sausages containing carp meat and stored in air or under vacuum at 4°C for 30 days.

### **Material and Methods**

Three batches of sausages were manufactured from carp meat (45%) and pork (50%) or from pork only (control), cooked (70°C/10min) and stored in air or vacuum-packed at 4°C for 30 days. The sausages were sampled after 1, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 and 30 days of storage. For microbiological examination, a sausage from each batch was taken on each sampling day. A representative sample of 10 g was aseptically removed into a sterile bag, homogenized for 2 minutes with 90 ml of saline and serially diluted. *E. coli* was determined according to EN ISO

16649-2, Total Viable Count was determined according to EN ISO 4833, lactic acid bacteria were determined in accordance with the ISO 15214 and psychrotrophic bacteria were determined according to EN ISO 17410. All the media were purchased from Merck, Germany. The bacterial counts were converted into log cfu/g and means and standard deviations were computed. Statistical analysis was performed using T test and ANOVA with the level of significance of 0.05, using software Statistica v. 7.1 (StatSoft, CZ).

### Results and Discussion

Whereas *E.coli* was not detected during the storage, all the other monitored groups of bacteria steadily increased in numbers towards the end of storage (Figure 1-3). There were no statistically significant differences between the groups of fish and control sausages or vacuum and air packaging. However, the air-packed sausages generally showed higher TVC towards the end of storage than the vacuum-packed ones and the fish sausages showed higher TVC than the control samples (Figure 1).

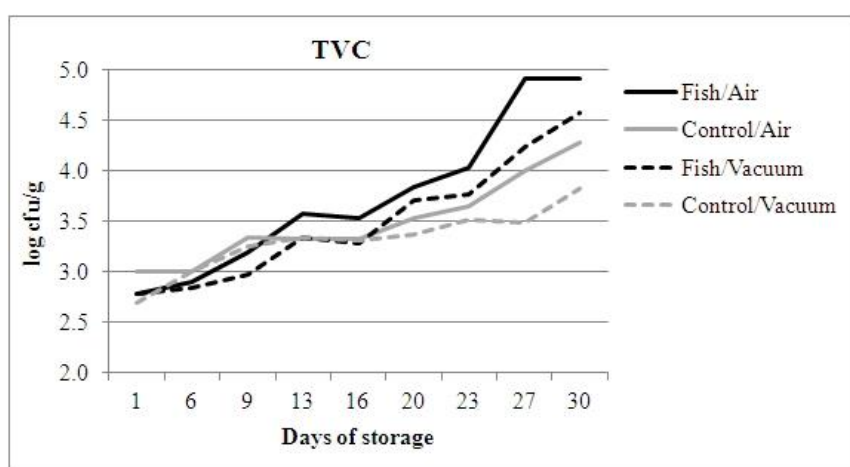


Figure 1: Total Viable Count in fish and control sausages stored under vacuum/air.

LAB have many times caused problems in the meat industry due to their high populations that can be multiplied under vacuum conditions (Arvanitoyannis and Kotsanopoulos, 2012). However, in our case there were no differences between air and vacuum stored sausages (Figure 2).

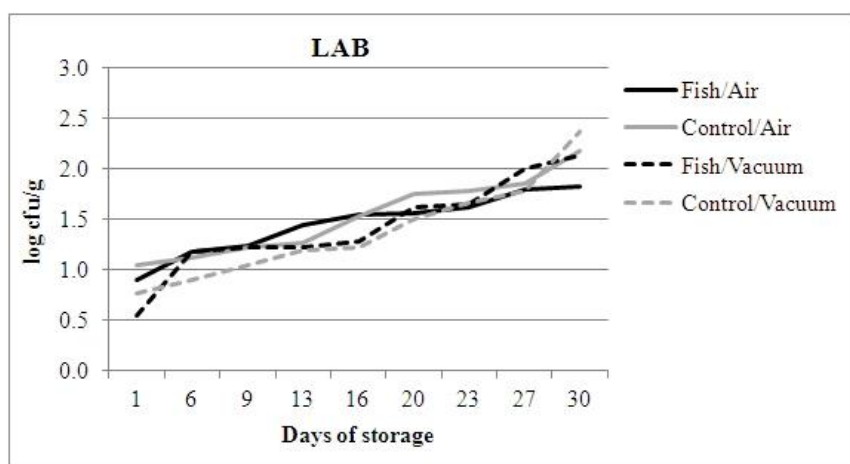


Figure 2: Lactic acid bacteria in fish and control sausages stored under vacuum/air.

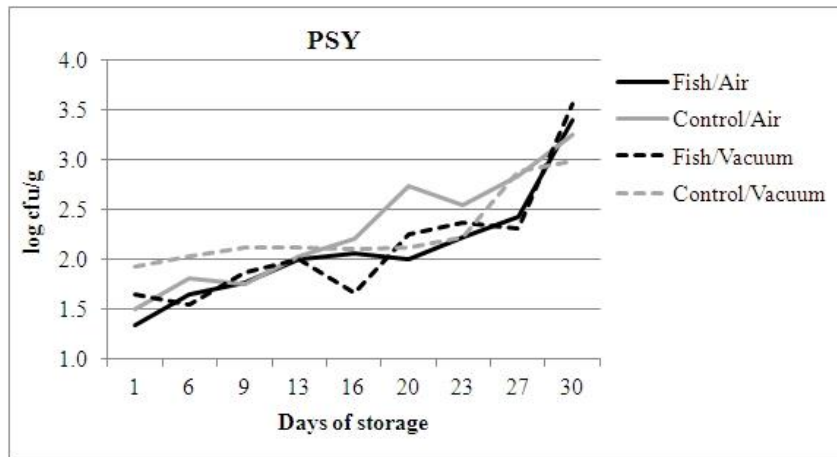


Figure 3: Psychrotrophic bacteria in fish and control sausages stored under vacuum/air.

The lack of marked differences between the experimental groups may be related to relatively low multiplication of the microorganisms, probably thanks to low water activity of the sausages (less than 0.94; data not shown). TVC and psychrotrophic bacteria increased by 1.1 – 2.1 log cfu/g during 30 days and LAB by 0.9 - 1.6 log cfu/g.

The results proved that despite fish meat being known as highly sensitive to spoilage, the cooked fish sausages may not necessarily show higher microbial growth when compared to control. On the other hand, both the proteolytic process and the creation of primary and secondary products of fat oxidation were increased in fish sausages.

#### Acknowledgement

The study was funded by Internal Grant Agency of VFU Brno, grant no. 3/2012/FVHE.

#### References

- ARSLAN, A., DINCOGLU, A.H., GONULALAN, Z. Fermented *Cyprinus carpio* L. sausage. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2001, vol. 25, p. 667-673.
- ARVANITOYANNIS, I.S., KOTSANOPOULOS, K.V. Smoking of fish and seafood: history, methods and effects on physical, nutritional and microbiological properties. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, vol. 5, p. 831-853.
- BUCHTOVÁ, H., VORLOVÁ, L. Jakostní a hygienické parametry požitelných částí kapra obecného (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). *Veterinářství*, 2001, vol. 51, p. 472-476.

**Contact address:** Ladislav Kašpar, MVDr., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie masa, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Česká Republika, kasparl@vfu.cz.



## Výskyt reziduí tetracyklinových antibiotik v syrovém kravském mléce

### Occurrence of the residues of tetracycline antibiotics in raw cow's milk

Kellnerová Eva, Navrátilová Pavlína, Borkovcová Ivana

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

*Ústav hygieny a technologie mléka*

#### **Summary**

*Tetracyclines belong to antimicrobials frequently used in the veterinary medicine. According to the OIE (World Organisation for Animal Health) are among the critically important antibiotics. The main objective of this study was to investigate the occurrence of residues of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in raw and pasteurized milk. Samples of ordinary raw milk assigned for the market were collected during the year 2013 from selected farms of the Czech Republic. Individual milk samples were extracted and purified using the technique of Mixed-Mode SPE and analyzed using HPLC/DAD.*

**Keywords:** *raw cow's milk; oxytetracycline; tetracycline; chlortetracycline*

#### **Úvod**

Tetracykliny se řadí mezi významná širokospektrální antibiotika používaná k léčení zvířat určených pro produkci potravin. Tetracyklinová antibiotika vykazují nízkou toxicitu, jsou dobře absorbována z trávicího traktu, proto je jejich používání ve veterinární medicíně relativně časté ve srovnání s jinými skupinami antibiotik. Četné studie popsaly vztah mezi dlouhodobým používáním subterapeutických dávek tetracyklinů a zvýšenou úrovní rezistentních bakterií střeva nebo patogenů (Michalova et al. 2004).

Pro ochranu zdraví spotřebitele stanovuje legislativa EU maximální limity reziduí (MRL) pro veterinární léčivé přípravky povolené k léčení potravinových zvířat. Přítomnost reziduí v syrovém kravském mléce v koncentracích vyšších, než jsou povolené MRL, může znamenat zdravotní riziko pro člověka (Botsoglou a Fletouris 2001). V legislativě ČR je stanovena hodnota maximálního limitu reziduí (MRL) pro tři nejčastěji používaná tetracyklinová antibiotika u laktujících dojníc. Hodnoty MRL pro tetracyklin (TTC), oxytetracyklin (OTC) a chlortetracyklin (CTC) v kravském, kozím i ovčím mléce jsou 100 µg.kg<sup>-1</sup> (Nařízení Komise (EU) č.37/2010). Cílem studie bylo sledovat výskyt reziduí TTC, OTC a CTC v syrovém a v pasterovaném mléce.

#### **Materiál a metody**

##### *Vzorky*

Vzorky syrového kravského, kozího i ovčího mléka byly získány na vybraných farmách v ČR, vzorky pasterovaného mléka byly zakoupeny v distribuční síti v průběhu roku 2013. Celkem bylo vyšetřeno 35 vzorků syrového kravského mléka, 12 vzorků pasterovaného kravského mléka, 4 vzorky ovčího a 4 vzorky kozího mléka.

##### *Příprava vzorku*

Před vlastní analýzou bylo provedeno zahřátí vzorku na 40 °C. Vzorky byly zchlazeny na teplotu 20 – 25 °C a odstředěny po dobu 10 minut za účelem odstranění tukové složky mléka. Vysrážení proteinové složky mléka bylo provedeno smícháním vzorku a McIlvaine pufru s přídavkem EDTA a následným odstředěním. Získaný supernatant byl upraven na pH 10 roztokem NaOH. Přechištění vzorku bylo zakončeno pomocí vakuové SPE techniky, s využitím Mixed-Mode Oasis MAX kolon (3 cc, 60 mg, Waters). Vzorek byl eluován směsí

45:55 acetonitrilu/75 mM kyseliny šťavelové. Extrakt se před analýzou rozředil vodou na objem 1,5 ml.

#### *Podmínky chromatografického stanovení*

Vzorky byly naměřeny na kapalinovém chromatografu Aliance 2695 s PDA detektorem 2996 (Waters, USA). Separace byla prováděna na koloně Nova-Pak C8, 4  $\mu\text{m}$ , 3,9 x 150 mm, detekce v UV oblasti při 355 nm. Použili jsme nelineární gradientové eluce, mobilní fázi A tvořila kyselina šťavelová, mobilní fázi B směs acetonitrilu a methanolu (1:1) s průtokem 0,8 ml/min. Teplota kolony byla 35 °C, velikost nástřiku vzorku 30  $\mu\text{l}$ .

#### *Validační parametry HPLC metody*

Kalibrace metody byla provedena analýzou matricových vzorků. Do vzorku syrového kravského mléka byly přidány standardy tetracyklinů OTC, TTC a CTC v koncentračním rozsahu 0,02 – 1,0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Vzorky byly analyzovány standardním postupem. V rámci validace metody byla vyhodnocena linearita, výtěžnost a opakovatelnost stanovení OTC, TTC a CTC (tabulka 1).

#### *Statistické hodnocení*

Získané výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny párovým *T-testem* ve statistickém programu STAT Plus (Unistat software, ver. 5.1; Unistat Ltd. 1998).

Tabulka 1: Parametry HPLC metody.

<b>Parametr</b>	<b>OTC</b>	<b>TTC</b>	<b>CTC</b>
<b>Výtěžnost (%)</b>	93,30	91,50	88,10
<b>RSD (%)</b>	5,10	11,70	9,90
<b>n</b>	12	12	12
<b>Opakovatelnost</b>			
<b>RSD (%)</b>	9,26	12,18	11,70
<b>n</b>	15	15	15

RSD = relativní standardní odchylka; n = počet měření

#### **Výsledky a diskuze**

Pomocí kalibračních vzorků byly nejprve stanoveny detekční limity pro jednotlivé analyty. Pro tetracyklin byl limit detekce zjištěn na úrovni 27  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , pro oxytetracyklin 15  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a pro chlortetracyklin 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Limity detekce metody jsou výrazně nižší než stanovené MRL. Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a č. 3. Ve vzorcích syrového a pasterovaného kravského mléka a syrového ovčího mléka nebyla detekována rezidua TTC, OTC ani CTC. Z výsledků získaných analýzou těchto vzorků vyplývá, že sledované analyty ze skupiny tetracyklinových antibiotik se v mléce nacházely buď ve velmi nízkých koncentracích pod detekčním limitem metody, nebo nebyly v mléce přítomny. Pouze u jediného vzorku syrového kozího mléka byla potvrzena rezidua CTC. Koncentrace CTC byla 329  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , hodnota překročila stanovený MRL pro CTC.

Mléko je důležitou surovinou živočišného původu, z toho důvodu, protože mléko a mléčné výrobky jsou významnou součástí výživy lidí všech věkových skupin. Proto je kontrola přítomnosti reziduí antimikrobiálních látek dlouhodobě významným hygienickým ukazatelem jakosti mléka. V ČR se procento pozitivních vzorků na přítomnost reziduí inhibičních látek (RIL) při kontrole jakosti nakupovaného mléka v centrálních laboratořích v posledním desetiletí pohybuje v rozmezí 0,12 – 0,31 %. Nálezy pozitivních vzorků potvrzují nezbytnost kontroly přítomnosti RIL v mléce.

Tabulka 2: Výsledky naměřených koncentrací TTC, OTC a CTC v syrovém mléce.

Typ mléka	Počet analyzovaných vzorků	Výsledky [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]					
		TTC	OTC	CTC			
				vz 1	vz 2	vz 3	vz 4
<b>Kozí</b>	4	-	-	-	329	-	-
<b>Ovčí</b>	4	-	-	-			
<b>Kravné</b>	35	-	-	-			

vz = vzorek

Tabulka 3: Výsledky naměřených koncentrací TTC, OTC a CTC v pasterovaném mléce.

Typ mléka	Počet analyzovaných vzorků	Výsledky [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]		
		TTC	OTC	CTC
<b>Kravné</b>	12	-	-	-

**Závěr**

Na základě výsledků studie je možné konstatovat, že v 98,2 % vzorků nebyla detekována rezidua vybraných tetracyklinových antibiotik. Výskyt reziduí CTC ve vzorku syrového kozího mléka v koncentraci  $329 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , která překračuje MRL ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) však ukazuje, že riziko výskytu reziduí antimikrobiálních látek v mléce v nadlimitních hodnotách je stále aktuální.

**Poděkování**

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV „KUS” QJ1230044.

**Literatura**

BOTSOGLU, N. A.; FLETOURIS, D. J. Drug residues in foods: pharmacology, food safety and analysis, 1st ed. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 1194. ISBN 0-8247-8959-8.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGLOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinary Medicine*. 2004, vol. 49, no. 3, p. 79 – 100.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu. *Úřední věstník*, L 15, 20.1.2010, s. 1-77.

**Kontaktní adresa:** Eva Kellnerová, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H13412@vfu.cz.

## Screening rezíduí kokcidiostatík v tkanivách brojlerových kurčiat

### Screening of coccidiostat residues in broiler chicken tissues

Poláková Zuzana, Kožárová Ivona, Gondová Zuzana

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

#### Summary

The good quality and safety of food are the main requirements of consumers. Food safety is influenced by several factors, such as the presence of residues of pharmacologically active substances. Safe food production is based on the analysis of these substances and the establishment of maximum residue limits. In the Slovak Republic, the determination of residues of pharmacologically active substances is carried out using the STAR method. It is a screening method for the determination of antibiotic residues, but due to the sensitivity of the test strain *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 it is also suitable for determining of coccidiostat residues in tissues and products of animal origin. The present work was focused on the screening of residues of salinomycin using the STAR method in tissues and blood serum of broiler chickens.

**Keywords:** screening methods; STAR Metod; residuem; coccidiostats

#### Úvod

Kokcidióza je závažné parazitárne ochorenie hydiny spôsobujúce veľké ekonomické straty v chove. Súčasná stratégia v kontrole kokcidiózy spočíva v aplikácii kokcidiostatík. Kokcidiostatiká sú farmakologicky aktívne látky, ktoré sa používajú ako krmné aditíva na prevenciu kokcidiózy u hydiny a králikov a pri liečbe kokcidiózy zvierat produkujúcich potraviny (Tkáčiková a kol., 2010; Tkáčiková a kol., 2012). Podávanie kokcidiostatík zvieratám produkujúcich potraviny môže viesť k výskytu rezíduí v ich tkanivách a následne predstavovať zdravotné riziko pre konzumenta.

Stanovenie rezíduí farmakologicky aktívnych látok pozostáva z dvoch krokov: skrining a konfirmácia (Kožárová a kol., 2011). Pre prvotný skrining rezíduí v tkanivách potravinových zvierat je v súčasnosti schválená metóda STAR. Na piatich Petriho miskách s agarovým médiom sa používajú testovacie kmene (*B. subtilis*, *K. rhizophila*, *B. cereus*, *E. coli*, *B. stearothermophilus*) s citlivosťou na aminoglykozidové, makrolidové, beta-laktámové a tetracyklínové antibiotiká, chinolóny a sulfónamidy (CH 12.19., 2006). Princípom metódy je inhibícia rastu testovacieho kmeňa tvorbou inhibičných zón. Keďže uvedená metóda je vyvinutá na stanovenie rezíduí veterinárnych liečiv v produktoch živočíšneho pôvodu, je ju možné, na základe predchádzajúcich štúdií (Kožárová a kol. 2008, Kožárová a kol. 2011), využiť aj na stanovenie rezíduí kokcidiostatík vďaka vysokej citlivosti a širokospektrálnosti testovacieho kmeňa *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149.

#### Materiál a metodika

Brojlerové kurčatá: Dvadsať kusov brojlerových kurčiat získaných zo slovenského chovu vo veku 35 dní kŕmených kŕmnou zmesou s prítomnosťou salinomycínu sodného bolo po uplynutí 1-dňovej ochrannej lehoty zabitých vykŕmením. Tkanivá a sérum zo šiestich náhodne vybraných kusov brojlerových kurčiat boli vyšetrené na prítomnosť rezíduí salinomycínu metódou STAR. Brojlerové kurčatá boli vo fáze výkrmu kŕmené kŕmnou zmesou DKAG-2 LUX (Barbara Sp. z. o. o., Poľsko) a počas ochrannej lehoty kŕmené kŕmnou zmesou DKAF LUX (Barbara Sp. z. o. o., Poľsko). Trom zo šiestich vyšetrených jedincov (č. 4, 5, 6) bola podávaná kŕmna zmes obohatená o humínové kyseliny. Vzorky tkanív a séra boli zabalené a skladované pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy. Sérum bolo získané centrifugáciou krvi odobratej pri vykŕvení.

STAR: Kultivačné médiá a testovacie kmene boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia), Difco (USA) a Českej zbierky mikroorganizmov (Česká republika) a pripravené podľa postupu metódy uvedenej v Zozname úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (CH 12.19., 2006) s nasledovnou koncentráciou spór v kultivačnom médiu: *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149  $5 \times 10^6$  spór.ml<sup>-1</sup> (trimetoprim 0,005 µg.ml<sup>-1</sup>), *B. subtilis* BGA  $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>, *E. coli* ATCC 11303  $10^5$  spór.ml<sup>-1</sup>, *K. rhizophila* ATCC 9341  $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup> a *B. cereus* ATCC 11778  $3 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>.

Vzorky svaloviny a orgánov boli získané z jednotlivých matric pomocou sterilného korkovrtu, narezané na plátky o hrúbke približne 2 mm a aplikované na povrch agaru v Petriho miske. Vzorky séra boli vyšetřované použitím filtračných diskov (9 mm, Whatman 1) napustených 30 µl séra a aplikovaných na povrch agaru v Petriho miske. Platne boli inkubované pri teplote  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (*K. rhizophila* ATCC 9341, *B. subtilis* BGA, *E. coli* ATCC 11303) a  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (*B. cereus* ATCC 11778) 16 – 18 hodín, a pri teplote  $55 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149) 12 – 15 hodín.

### Výsledky a diskusia

Veľkosť inhibičných zón bola meraná od okraja vzorky po vonkajší okraj inhibičnej zóny pomocou digitálneho posuvného meradla (Mitutoyo, Japonsko) s presnosťou na 0,1 mm. Za pozitívne boli považované vzorky, pri ktorých bola inhibičná zóna  $\geq 2$  mm a pri kmeni *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149  $\geq 4$  mm. Veľkosti nameraných inhibičných zón znázorňuje Tabuľka 1. Veľkosti inhibičných zón v mm sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) desiatich meraní jednej vzorky (Microsoft Office Excel 2007). Tabuľka 1 prezentuje inhibičné zóny namerané len na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149. Pri ostatných testovacích kmeňoch inhibičné zóny neboli zaznamenané.

Tabuľka 1: Veľkosti inhibičných zón (IZ  $\pm$  SD) a minimálne a maximálne inhibičné zóny produkované tkanivami a krvným sérom brojlerových kurčiat na platniach s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149.

Brojlerové kurčatá	Matrica	IZ (mm $\pm$ SD)	Min – Max (mm)
1	Prsná svalovina	3,83 $\pm$ 1,07	2,62 - 5,80
	Stehenná svalovina	5,07 $\pm$ 0,69	4,24 - 6,02
	Pečeň	9,97 $\pm$ 0,85	8,86 - 11,02
	Obličky	9,98 $\pm$ 1,76	8,07 - 13,28
	Srdce	6,27 $\pm$ 1,04	5,11 - 8,44
	Žalúdok	4,99 $\pm$ 1,45	3,55 - 7,46
	Koža a tuk	3,22 $\pm$ 0,84	2,19 - 4,48
	Krvné sérum	5,85 $\pm$ 1,57	3,55 - 8,08
2	Prsná svalovina	3,28 $\pm$ 1,41	1,79 - 5,52
	Stehenná svalovina	3,07 $\pm$ 0,76	2,06 - 4,18
	Pečeň	9,55 $\pm$ 1,51	7,23 - 12,03
	Obličky	7,43 $\pm$ 1,39	5,79 - 10,24
	Srdce	5,79 $\pm$ 0,91	4,83 - 7,06
	Žalúdok	6,02 $\pm$ 2,12	2,23 - 8,21
	Koža a tuk	4,67 $\pm$ 1,37	3,13 - 6,66
	Krvné sérum	8,43 $\pm$ 1,03	7,06 - 9,85
3	Prsná svalovina	3,38 $\pm$ 1,18	2,30 - 6,01
	Stehenná svalovina	3,56 $\pm$ 1,02	1,97 - 4,89
	Pečeň	9,76 $\pm$ 1,07	8,23 - 11,28
	Obličky	8,72 $\pm$ 1,74	6,08 - 11,03
	Srdce	5,79 $\pm$ 1,09	4,19 - 7,40
	Žalúdok	5,49 $\pm$ 0,92	4,25 - 7,25
	Koža a tuk	4,23 $\pm$ 1,23	2,51 - 6,52
	Krvné sérum	6,10 $\pm$ 1,67	4,26 - 8,38

Pokračovanie Tabuľky 1

4 (HK)	Prsná svalovina	3,50 ± 0,54	2,75 - 4,14
	Stehenná svalovina	2,98 ± 0,59	2,17 - 3,94
	Pečeň	7,72 ± 1,26	6,02 - 9,35
	Obličky	9,71 ± 0,46	9,11 - 10,55
	Srdce	6,13 ± 0,89	4,84 - 7,37
	Žalúdok	3,46 ± 0,63	2,30 - 4,16
	Koža a tuk	4,51 ± 1,70	2,06 - 7,17
	Krvné sérum	5,11 ± 1,38	3,17 - 7,34
5 (HK)	Prsná svalovina	3,75 ± 0,87	2,56 - 5,04
	Stehenná svalovina	2,41 ± 0,69	1,41 - 3,43
	Pečeň	10,07 ± 0,98	8,70 - 11,39
	Obličky	7,64 ± 0,84	6,40 - 8,88
	Srdce	4,95 ± 0,88	3,31 - 5,69
	Žalúdok	3,36 ± 0,63	2,36 - 4,16
	Koža a tuk	7,00 ± 1,07	4,95 - 8,27
	Krvné sérum	4,15 ± 0,72	3,01 - 5,22
6 (HK)	Prsná svalovina	4,37 ± 1,31	2,27 - 6,09
	Stehenná svalovina	3,66 ± 1,11	2,51 - 5,61
	Pečeň	11,04 ± 1,00	9,36 - 12,75
	Obličky	8,50 ± 1,09	7,08 - 10,06
	Srdce	8,47 ± 0,87	6,97 - 9,77
	Žalúdok	5,40 ± 1,05	4,19 - 7,04
	Koža a tuk	6,31 ± 2,35	3,51 - 9,49
	Krvné sérum	7,73 ± 0,79	6,51 - 8,95

Prítomnosť farmakologicky účinných látok v potravinách a produktoch živočíšneho pôvodu je v súčasnosti dôležitou témou zamestnávajúcou širokú verejnosť. Skrining rezíduí veterinárnych liečiv je dôležitý z pohľadu ochrany zdravia konzumentov. Metóda STAR umožňuje stanovenie nielen rezíduí antibiotík, ale vďaka širokospektrálnosti testovacieho kmeňa *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 je možné využiť aj na prvotný skrining rezíduí kokcidostatík v potravinách živočíšneho pôvodu.

### Podakovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom MŠ SR VEGA 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, Doplňok č. 1/2006, 38, 2006, str. 68 – 81.

KOŽÁROVÁ, I.; MAČANGA, J.; GOLDOVÁ, M.; MAJOR, P.; TKÁČIKOVÁ, S. Detection of maduramycin residues in the tissues of chickens and pheasants by the screening test for antibiotic residues (STAR). *Food additives and contaminants*. 2011, vol. 28, no. 5, str. 608 – 618.

KOŽÁROVÁ, I.; SÝKOROVÁ GOFFOVÁ, Z.; MÁTÉ, D. Detection of maduramycin residues in the tissues of broiler chickens by using the PREMI®TEST and the STAR. *Slovak Journal of Animal Science*. 2008, 41, str. 206.

TKÁČIKOVÁ, S.; KOŽÁROVÁ, I.; MAČANGA, J.; LEVKUT, M. Determination of lasalocid residues in the tissues of broiler chickens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food additives and contaminants*. 2012, vol. 29, no. 5, str. 761 – 769.

TKÁČIKOVÁ, S.; KOŽÁROVÁ, I.; MÁTÉ, D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramycin residues in the tissues of broiler chickens. *Food additives and contaminants*. 2010, vol. 27, no. 9, str. 1226 – 1232.

**Kontaktná adresa:** Zuzana Poláková, MVDr., Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, zuzutegdesova@gmail.com.

## Stanovenie salinomycínu v krmive pre hydinu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV detekciou

### Determination of salinomycin in poultry feed using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection

<sup>1</sup>Mad'arová Michaela, <sup>1</sup>Kožárová Ivona, <sup>2</sup>Kukura Vladimír

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Štátny veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín, Veterinárny a potravinový ústav v Košiciach

#### Summary

This study describes the determination of the polyether coccidiostat salinomycin in poultry feeds by high-performance liquid chromatography (HPLC) using pre-column derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent. Salinomycin was extracted from the poultry feeds with a mixture of metanol/water, filtered, derivatized and analyzed directly on a Nucleosil C<sub>18</sub> column (250 x 4.6 mm) with metanol/water/concentrated acetic acid (990/99/1 v/v/v) as a mobile phase. The separated salinomycin was detected on a Hewlett Packard 1050 series at a wavelength of 250 nm and 390 nm with UV detection. The recoveries of the salinomycin from the poultry feeds were 58 - 100 % in the concentration range of 0,5 – 25 mg.l<sup>-1</sup>. Salinomycin was detected in poultry feeds in the concentration range of 40 – 68 mg.kg<sup>-1</sup>. The results obtained were confirmed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

**Keywords:** salinomycin; feeds; HPLC; determination

#### Úvod

Salinomycín patrí medzi ionofórové kokcidiostatiká, ktoré sú prirodzene produkované fermentáciou mikroorganizmov *Streptomyces* spp. a *Actinomadura* spp. (Mad'arová a kol., 2013). Salinomycín vzniká fermentáciou *Streptomyces albus* spp. a pôsobí proti sporozoitom a včasným aj neskorším nepohlavným formám kokciidií v čreve brojlerových kurčiat (Váczi, 2008). Celosvetovo sa podáva hydine ako krmná doplnková látka určená vo výžive zvierat na prevenciu proti nákazlivej chorobe, tzv. kokcidióze (Dusi a kol., 1999). V súčasnosti je jeho použitie povolené nariadením Európskeho parlamentu a Rady č. 1831/2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat.

Salinomycín sa pridáva do medikovaného krmiva prevažne ako sodná soľ od 50 do 70 mg účinnej látky na kg v kompletnom krmive s obsahom vlhkosti 12 % v závislosti od živočíšneho druhu. Maximálny limit rezíduí v príslušných potravinách živočíšneho pôvodu je 5 µg.kg<sup>-1</sup> salinomycínu pre všetky čerstvé tkanivá (Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady č. 1831/2003).

Od skorých 70. rokov 20. storočia boli publikované niektoré screeningové a konfirmačné analytické metódy na stanovenie jedného alebo viacerých ionofórových kokcidiostatík v krmive. Väčšina konfirmačných metód je založená na kvapalinovej chromatografii. Najviac publikovaných metód popisuje stanovenie ionofórových kokcidiostatík pomocou post-kolónovej derivatizácie, zatiaľ čo metód na stanovenie týchto látok pomocou pred-kolónovej derivatizácie je menej (Dusi a kol., 1999).

Účelom našej štúdie bolo stanoviť koncentračnú hladinu salinomycínu v krmive komerčne vyrábanom pre hydinu použitím úradne schválenej metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (CH 6. 9., 2004) s prispôbením na naše laboratórne podmienky.

## **Materiál a metódy**

### ***Krmivo***

Na vyšetrenie bolo použitých deväť vzoriek krmív. Tri boli z Veterinárneho a potravinového ústavu v Košiciach, a šesť od firmy Handlowo-Produkcyjna "Barbara" Sp. Z o.o., De Heus a. s. (Poľská republika).

### ***Chemikálie***

Metanol HPLC grade (Fisher Chemical, Loughborough, Veľká Británia), deionizovaná voda (EASY Pure od Barnstead), kyselina trichlóroctová p. a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), 2,4-dinitrofenylhydrazín fluka (Fluka Chemika Buchs, Steinheim, Švajčiarsko), koncentrovaná kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) a štandard salinomycín sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

### ***Štandardy a pracovné roztoky štandardov***

Zásobný roztok salinomycínu bol pripravený o koncentrácií 1000 mg.l<sup>-1</sup> v metanole. Z neho boli následne nariadené pracovné roztoky salinomycínu o koncentrácií 100 mg.l<sup>-1</sup> - 0.05 mg.l<sup>-1</sup> metanolu.

### ***LC systém***

LC systém Hewlett Packard series 1050 pozostáva z autosamplera, degasera, kvartérnej pumpy, UV detektora s jednou vlnovou dĺžkou a softwera (Agilent Technologies 1990-2003 ChemStation Rev. A. 10.01 (1635).

Separácia analytu prebiehala na kolóne Nucleosil C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) pri laboratórnej teplote. Podmienky stanovenia - mobilná fáza: metanol/voda/koncentrovaná kyselina octová (990/99/1 v/v/v), prietok mobilnej fázy: 1 ml/min., injekovaný objem: 80 µl a UV detektor: vlnová dĺžka 250 nm a 390 nm.

### ***Príprava vzorky***

10 g vzorky bolo zhomogenizované a extrahované v 50 ml zmesi metanol/voda (9/1 v/v) na horizontálnej trepačke 60 minút. Extrakt bol prefiltrovaný cez filtračný papier. 700 µl prefiltrovaného extraktu bolo prenesených do vialky a pridaných 100 µl vodného roztoku kyseliny trichlóroctovej. Zmes bola dobre pretrepaná a nechaná 10 minút stáť pri laboratórnej teplote. Následne bolo pridaných 200 µl metanolickeho roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazínu. Zmes bola opäť dobre pretrepaná a zahrievaná 20 minút pri teplote 55°C. Vychladená zmes bola injekovaná do HPLC.

## **Výsledky a diskusia**

Salinomycín sa nevyznačuje UV absorbanciou, ani elektrochemickou a fluorescenčnou aktivitou v dôsledku absencie chromofóru, preto pred-kolónová alebo post-kolónová derivatizácia je potrebná pre zlepšenie jeho detekcie. Analýza UV aktívnych derivátov salinomycínu s pred-kolónovou derivatizáciou je možná pomocou viacerých derivatizačných činidiel. Použitie post-kolónovej derivatizácie je limitované úpravou konvenčného HPLC systému zapojením viacerých prístrojov, ako napr. externej pumpy, reaktora a ohrievača (Blazsek a kol., 2003).

Vzhľadom na naše laboratórne podmienky bol salinomycín v krmive stanovený pomocou 2,4-dinitrofenylhydrazínu, ako derivatizačného činidla na kvapalinovom chromatografe Hewlett Packard series 1050 s UV detektorom pri vlnovej dĺžke 250 nm a 390 nm, pričom vlnová dĺžka 250 nm bola použitá ako kvantifikačná z dôvodu vyššieho pomeru signál - šum a vlnová dĺžka 390 nm ako identifikačná.

Kalibračná krivka bola zostavená zo šiestich bodov v koncentračnom rozsahu od 0.5 - 25 mg.l<sup>-1</sup> s koreláciou ( $r = 0.99999$ ). Detekčný limit bol stanovený na úrovni 0.05 mg.kg<sup>-1</sup>.



V piatich testovaných vzorkách bol salinomycín detegovaný v koncentrácií 40 – 68 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabuľka 1). Deklarovaný obsah salinomycínu v krmive bol 70 mg.kg<sup>-1</sup>. Výťažnosť salinomycínu z krmiva bola 58 - 100 %. Získané výsledky boli potvrdené konfirmačnou metódou kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (CH 6.26.) na Veterinárnom a potravinovom ústave v Košiciach v koncentračnom rozsahu 1,3 – 69 mg.kg<sup>-1</sup>.

Tabuľka 1: Stanovená koncentračná hladina salinomycínu v krmive využitím HPLC-UV a LC-MS/MS.

Krmivo	HPLC-UV (250 nm)	HPLC-UV (390 nm)	LC-MS/MS
1	negatívna	negatívna	negatívna
2	68 mg.kg <sup>-1</sup>	62 mg.kg <sup>-1</sup>	52 mg.kg <sup>-1</sup>
3	negatívna	negatívna	negatívna
4	66 mg.kg <sup>-1</sup>	57 mg.kg <sup>-1</sup>	67 mg.kg <sup>-1</sup>
5	54 mg.kg <sup>-1</sup>	40 mg.kg <sup>-1</sup>	64 mg.kg <sup>-1</sup>
6	negatívna	negatívna	Narazín 1,3 mg.kg <sup>-1</sup> Nikarbazín 1,8mg.kg <sup>-1</sup>
7	46 mg.kg <sup>-1</sup>	54 mg.kg <sup>-1</sup>	66 mg.kg <sup>-1</sup>
8	48 mg.kg <sup>-1</sup>	55 mg.kg <sup>-1</sup>	69 mg.kg <sup>-1</sup>
9	negatívna	negatívna	negatívna

### Záver

Výsledky publikované v tejto štúdií ukázali, že táto metóda s modifikáciou na naše laboratórne podmienky môže byť použitá na rutinnú analýzu salinomycínu v krmive pre hydinu s dobrou výťažnosťou a s prijateľnou špecifitou a opakovateľnosťou merania.

### PodĎakovanie

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

### Literatúra

BLAZSEK, M.; SUROVCOVÁ, A. LC determination of salinomycin in fermentation broths and Premixes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, vol. 31, s. 291-298.

DUSI, G.; GAMBA, V. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*. 1999, vol. 835, s. 243–246.

CH 6. 9. Stanovenie monenzinu metódou HPLC. In: Zoznam úradných metód a metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, časť Chémia, *Vestník MP SR*, XXXVI, čiastka 1, 2004, s. 121-122.

CH 6.26. Stanovenie ionofórových a neionofórových kokcidiostatík v potravinách živočíšneho pôvodu a krmivách metódou LC/MS/MS.

[http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne\\_info/Chemicke\\_analyz.pdf](http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Chemicke_analyz.pdf)

MAĎAROVÁ, M.; KOŽÁROVÁ, I.; TKÁČIKOVÁ, S. Využitie HPLC metódy pri konfirmácii rezíduí kokcidiostatík v potravinových matriciach. *Slovenský veterinársky časopis*. 2013, vol. 38, no. 5-6, s. 223-225.

NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003 z 22. septembra 2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. In: *Úradný vestník Európskej únie* L 268/29. 2003, s. 1-15.

VÁCZI, P. Antiprotozoiká. In: Čonková E, a kol. *Veterinárska farmakológia*. I. diel. 1. vyd. Košice: Viena s.r.o., 2008, s. 132-43. ISBN 978–80–8077–102–7.

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

## Screening rezíduí antibiotík v živočíšnych matriciach s použitím mikrobiálnych inhibičných testov

### The screening of antibiotics residues in animal tissues using microbial inhibition tests

Gondová Zuzana, Kožárová Ivona, Poláková Zuzana

Ústav hygieny a technológie mäsa  
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

#### Summary

The aim of the study was to determine the presence of antibiotic residues in matrices of pigs, cattle and poultry using two microbial inhibition tests (MITs) - STAR (the screening test for the detection of antibiotics using five bacterial strains) and NAT (the Nouws Antibiotic Test). By STAR method were positive liver, kidney and muscle of pigs, cattle and poultry on plates with the test strain *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, *K. rhizophila* ATCC 9341 and *B. cereus* ATCC 11778, (possible presence of residues of  $\beta$ -lactams, macrolides, tetracyclines and sulphonamides). By NAT were positive kidney of cattle and pigs on the plate with the test strain *K. rhizophila* ATCC 9341 and *B. cereus* ATCC 11778, (possible presence of residues of  $\beta$ -lactams, macrolides and tetracyclines). More positive results in the STAR indicates the greater sensitivity of this method. By consensus of that inhibition test strains suggesting the presence of residues of beta-lactams, macrolides and tetracyclines in samples of kidney pigs and cattle.

**Keywords:** screening; antibiotics; residues; microbial inhibition tests

#### Úvod

Aplikácia antibiotík pri liečbe infekčných ochorení je súčasťou chovu hospodárskych zvierat. Z tejto praxe vyplýva prítomnosť rezíduí antibiotík živočíšnych produktoch, čo predstavuje riziko ohrozenia verejného zdravia. Z dôvodu neuváženej, nesprávneho podávania antibiotík potravinovým zvieratám, resp. nedodržania ochrannej lehoty, môžu byť rezíduá antibiotík prítomné v živočíšnych produktoch v množstvách presahujúcich stanovené maximálne limity (MRL). Kontrola rezíduí veterinárnych liekov v živých zvieratách a živočíšnych produktoch je v SR pokrytá zákonom NR SR č. 39/2007 Z. z. a nariadením vlády SR č. 320/2003 Z. z. Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí veterinárnych liekov v potravinách živočíšneho pôvodu musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie 2002/657/ES a stanovovať rezíduá na príslušnej úrovni (MRL). „Maximálny limit rezíduí“ - maximálna koncentrácia rezíduí farmakologicky účinnej látky, ktorú možno povoliť v potravinách živočíšneho pôvodu. V záujme ochrany verejného zdravia sú nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 stanovené MRL veterinárnych liečiv v potravinách živočíšneho pôvodu. Screening rezíduí antibiotík v živočíšnych produktoch je vykonávaný pomocou mikrobiálnych inhibičných testov, ktorých princípom je inhibícia rastu testovacieho kmeňa v prítomnosti inhibujúcej látky (rezídua), ktorá sa prejavuje tvorbou inhibičných zón (IZ), alebo zmena farby testovacieho agaru nie je pozorovaná. Pre prvotný screening rezíduí v tkanivách potravinových zvierat sú v súčasnosti príslušným orgánom schválené nasledovné úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín, a to platňová metóda STAR a liekovková metóda Premi<sup>®</sup>Test. STAR (CH 12.19, 2006) pozostáva z piatich testovacích platní, z ktorých každá je špecificky určená pre inú skupinu antibiotík: *B. subtilis* BGA - aminoglykozidy, *K. rhizophila* ATCC 9341 – makrolidy a beta-laktámy, *B. cereus* ATCC 11778 – tetracyklíny, *E. coli* ATCC 11303 – chinolóny a *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 – sulfónamidy a beta-laktámové antibiotiká. NAT (Pikkemaat a kol., 2008) predstavuje nový testovací systém rovnako pozostávajúci z piatich testovacích platní. Každá z platní je určená

na stanovenie určitej skupiny antibiotík: *B. cereus* ATCC 11778 – tetracyklíny, *Y. ruckeri* NCIM 13282 – chinolóny, *K. rhizophila* ATCC 9341 – beta-laktámy a makrolidy, *B. subtilis* BGA – aminoglykozidy, *B. pumilus* CN 607 – sulfónamidy. Na rozdiel od metódy STAR, NAT nepatrí medzi úradné metódy schválené na stanovenie rezíduí antibiotík v produktoch živočíšneho pôvodu. Predmetom práce bolo stanoviť a vzájomne porovnať citlivosť oboch metód na rezíduá antibiotík v pečeni, obličkách a svalovine ošípaných a hovädzieho dobytká. Vyšetrovaný materiál (pečeň a obličky) pochádzal zo zvierat zabitých na bitúnkoch a posúdených pri prehliadke *post mortem* úradným veterinárnym lekárom ako požívateľné pre ľudskú spotrebu a svalovina hovädzieho dobytká a ošípaných bola zakúpená v obchodnej sieti.

### Materiál a metodika

Testovacie kmene a kultivačné médiá boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia) a Difco (USA) a pripravené v súlade s postupom uvedeným v Zozname úradným metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív – STAR (CH 12.19, 2006) a pre NAT podľa Pikkemaat a i. (2008). Pri metóde STAR sme použili médium s *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 s koncentráciou  $5 \times 10^6$  spór.ml<sup>-1</sup>, *B. subtilis* BGA ( $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>), *K. rhizophila* ATCC 9341 ( $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>), *E. coli* ATCC 11303 ( $10^5$  spór.ml<sup>-1</sup>) a *B. cereus* ATCC 11778 ( $3 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>). Vzorky sme aplikovali na povrch agaru a inkubovali podľa uvedeného postupu. Pre NAT bolo použité médium s *K. rhizophila* ATCC 9341 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>), *B. subtilis* BGA ( $10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>), *B. cereus* ATCC 11778 ( $10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>), *Y. ruckeri* NCIM 13282 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) a *B. pumilus* CN 607 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>). Pri NAT sme použili sterilné papierové disky s Ø 12,7 mm (Schleicher&Schuell, A 2668 0127), nasiaknuté tkanivovou tekutinou vzoriek. Disky sme aplikovali do otvorov v agare s Ø 14 mm a doplnili platňovo špecifickými fosfátovými roztokmi (200 - 300 µl). Platne sme inkubovali podľa uvedeného postupu.

### Výsledky a diskusia

Veľkosť inhibičných zón (IZ) bola pri STAR meraná od okraja vyšetrovanej vzorky po vonkajší okraj IZ a pri NAT ako celý priemer IZ. Za pozitívne sme považovali vzorky, pri ktorých pri STAR bola prítomná inhibičná zóna  $\geq 2$  mm a pri NAT  $\geq 15$  mm. Veľkosti IZ sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) desiatich meraní jednej vzorky (Microsoft Office Excel 2007). Tabuľka 1 prezentuje pozitívne výsledky na platniach s testovacími kmeňmi *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, *K. rhizophila* ATCC 9341 a *B. cereus* ATCC 11778. Na platniach s testovacími kmeňmi *E. coli* ATCC 11303 a *B. subtilis* BGA a metódy STAR a *Y. ruckeri* NCIM 13282, *B. subtilis* BGA a *B. pumilus* CN 607 NAT nebola zaznamenaná tvorba IZ. Zhoda inhibície testovacích kmeňov predpokladá prítomnosť rezíduí beta-laktámov, makrolidov a tetracyklínov vo vyšetrovaných vzorkách.

Tabuľka 1: Veľkosti IZ  $\pm$  SD (mm) produkované vyšetrovanými matricami detegované STAR a NAT.

druh zvierat'a	matrica	STAR			NAT	
		<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	<i>B. cereus</i> ATCC 11778
hovädzí dobytok		2,29 $\pm$ 0,35	4,86 $\pm$ 0,97	-	-	-
	pečeň	3,21 $\pm$ 1,89	4,54 $\pm$ 0,77	-	-	-
		3,06 $\pm$ 0,78	4,05 $\pm$ 0,84	-	-	-
		3,44 $\pm$ 0,79	5,22 $\pm$ 1,87	-	-	-

Pokračovanie Tabuľky 1

	3,03 ± 0,97	5,57 ± 1,06	-	23,41 ± 0,92	-
	6,45 ± 0,34	7,26 ± 0,84	-	22,67 ± 0,10	-
oblička	2,76 ± 0,75	5,58 ± 0,67	-	18,79 ± 0,65	-
	2,24 ± 0,63	5,73 ± 1,23	-	17,28 ± 0,33	-
svalovina	3,17 ± 0,53	3,65 ± 0,68	-	-	-
	-	7,84 ± 1,06	3,58 ± 0,68	-	-
ošípané	2,88 ± 0,50	5,47 ± 0,94	-	-	-
pečeň	3,30 ± 0,67	5,36 ± 0,88	-	-	-
	3,35 ± 0,87	3,66 ± 0,56	-	16,98 ± 1,03	-
oblička	-	7,65 ± 2,13	-	-	-
	-	7,34 ± 0,69	-	-	-
	-	6,32 ± 1,06	9,65 ± 1,89	-	23,21 ± 0,72
svalovina	1,89 ± 0,38	5,30 ± 0,95	-	-	-
		4,27 ± 0,88			

Zhoda inhibície testovacích kmeňov predpokladá prítomnosť rezíduí beta-laktámov, makrolidov a tetracyklínov vo vyšetrovaných vzorkách.

### Záver

Z pohľadu ochrany verejného zdravia je veľmi dôležitý screening rezíduí antibiotík v živočíšnych produktoch, ako aj vývoj a validovanie nových metód detekcie antibiotík. Všetky vyšetrované vzorky, pri ktorých bola vytvorená IZ, považujeme za potenciálne pozitívne. Avšak, pre potvrdenie, resp. vylúčenie prítomnosti rezíduí antibiotík v potenciálne pozitívnych vzorkách je potrebné ďalšie vyšetrenie vzoriek schválenými konfirmačnými metódami, ktoré by prípadné rezíduá identifikovali a kvantifikovali.

### PodĎakovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom MŠ SR VEGA 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, Doplňok 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. 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. Zbierka zákonov č. 320/2003, čiastka 145, 2003, 2541 - 2585.

PIKKEMAAT, M. G., OOSTRA-VAN DIJK, S., SCHOUTEN, J., RAPALLINI, M., VAN EGMOND, H. J.: A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Control*, 19, 8, 2008, 781 - 789.

ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/ES, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. 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. Zbierka zákonov č. 39/2007, čiastka 28, 162 - 223.

**Kontaktná adresa:** Zuzana Gondová, MVDr., Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF Košice, Komenského 73, 04001 Košice, zuzana.gondov31mail.com.

## Classification of raw material and their effect on selected textural and colour properties of cooked ham

<sup>1</sup>Bednářová Martina, <sup>2</sup>Kameník Josef, <sup>2</sup>Saláková Alena, <sup>1</sup>Tremlová Bohuslava

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
<sup>1</sup>Vegetable Foodstuffs Hygiene and Technology, <sup>2</sup>Departement of Meat Hygiene and Technology

### Summary

This work deals the classification of raw material on the appearance of destructured zones and dark red zones ie. two-tone effect. In the last decades, destructured zones cause the major problem in cooked ham and this problem has a significant effect on the economics of cooked ham production. This defect is described as light, soft and exudative areas which are unsuitable for mechanical slicing after the heat treatment. For the production of highest quality of cooked hams the producers have to used only muscles of pork leg. In this study, two groups of cooked ham were evaluated. The first group of hams (SH) were produced from the *m. adductor* and *m. semimembranosus* and second group (TH) were produced from *M. adductor* only. Destructured and dark red zones were analyzed using image analysis on slices of hams. The average area of destructured zones in SH was 15.4 % and in TH was 14.1 % and these differences were not been statistically significant. Regarding the results of the appearance of dark zones (two-tone effect) in SH 5.6 % were significantly higher ( $p < 0.05$ ) with compared to TH (1.9%). From the results indicate that the classification of the raw material does not effect on the appearance of destructured zones but has effect the appearance of dark zones.

**Keywords:** destructured zones; muscle; pork meat; image analysis

### Introduction

Cooked hams categorized between meat products, which are popular in Europe and their consumption is around 4 kg per person per year (Talens *et al.*, 2013, Paelinck, H., and Szczepaniak, S., 2005). Czech legislation differentiates cooked hams in three groups of quality depend on contents of net muscle protein and the selected additives were prohibited. The designation “ham” is possible use for meat product produced from pork leg (Directive no. 326/2001). Pork leg consists of several anatomy differences muscles. For production of cooked ham the most frequently used muscles *Musculi adductor (AD)*, *semimembranosus (SM)* and *biceps femoris (BF)*. In literature is stated, that these muscles are the most affected by defects in quality meat (Bucko *et al.*, 2012; Hugenschmidt *et al.*, 2010; Laville *et al.*, 2005; Valous *et al.*, 2010; O’Neill *et al.*, 2003). Tens *et al.*, (2013) state, that final quality of product especially depend on used of raw material and technology (Talens *et al.*, 2013). The heat treatment influences structure of muscle proteins and it causes their denaturation. Katsaras and Budras, 1993 report, that all changes during heat treatment causes stability muscle tissue and enables slicing. The texture and colour of meat products are one of the most important properties for consumers. Recently, the defect which describes in cooked ham is soft, exudative and light zones called destructured zones (Balac, Bazin and Le Treut, 1998; Minvielle, Houix and Lebret, 2001; Laville *et al.*, 2003; Hugenschmidt *et al.*, 2010). Their appearance is reported from 1 to 20 percent and differ s in Europe countries (Pedrielli *et al.*, 2009). The partial aim of this research was evaluated effect of muscle classification for selected properties. In the slices of cooked ham was analyzed appearance of destructured and dark red zones using image analysis.

### Material and Methods

Material and methodology show in previous research, which we are realized in cooked ham. The material of this research was cooked hams produced direct in meat processing manufacture. Two groups of cooked hams were evaluated. The first group of ham – standard

ham (SH) was made from *musculi adductor* (AD) and *semimembranosus* (SM) by standard way and second group of ham – tested ham (TH) were made only from *musculus adductor*. This methodology results from previous research regarding to cooked hams. In 15 slices of SH and TH the number of destructured zones were calculated. The slices of cooked hams were taken a photos by camera Canon EOS 450 D (Canon, Tokyo, Japan) and following analyzed in program Adaptive Contrast Control Structure and Object Analyser version 6.1, Sofo – ACC (University of Technology, Brno, Czech Republic). Using ACC were analyzed destructured zones and dark red zones (two-tone effect).

### Results and Discussion

In table 1 is showed a part of the results deal with the research of quality of cooked ham. We were found from previous experiments, that anatomy different muscles have a distinct characteristics like as pH colour (lightness  $L^*$ ) or water holding capacity. It means, that individual muscles may have a different effect on the texture (the occurrence of destructured zones ) and colour ( dark red zones - called two-tone effect). Already, sensory analysis shows, that destructured zones were presented in each slice of cooked ham (SH, TH). In group SH was average number of destructured zones 3.87 and in group TH 3.07 in each slice and there was no statistically significant difference. Similar results were obtained in case total area (%), which occupied by destructured zones in each slice. Using image analysis were found, that average appearance of destructured zones was 15.4 % in SH and 14.1 % in TH, however without statistically significant difference again. The destructured zones cause a major problem during slicing due to low cohesiveness (Hugenschmidt 2010). The structure of cooked ham was crumbly and no compact (Laville et al., 2005). The appearance of destructured zones was negatively correlated with a high ultimate pH value and positively correlated with a high proportion of lean meat as well as a high slaughter weight of the animals (Minvielle et al., 2001). Chemical analyses conducted by Minvielle et al. (2001) showed that dry matter, protein and total collagen content of the raw meat were not affected by the defect, whereas glycolytic potential clearly was ( $P < 0.01$ ) and thermosoluble collagen content was slightly ( $P < 0.05$ ) higher in destructured zones. Lesiów and Xiong (2013) state, that appearance of destructured zones were connected with using low quality meat especially PSE (pork, soft, exudative). PSE zones the most commonly find in upper layer of AD and SM and present serious economic problem for manufacture of cooked ham (O’neill, 2003). PSE pork is a defective product resulting from both preslaughter and postmortem factors, for example, animal genetics, nutrition, season of the year, stress during animal transportation, and carcass processing and storage conditions (Lesiów and Xiong, 2013). Various authors have attempted to compare the functional properties of PSE pork and normal pork in a range of processed meat products. Muscles from PSE pigs had higher drip loss than normal muscles during chilling and absorbed more salt during immersion in brine, therefore, producing a poor quality cooked ham. The functional properties of processed meat products made from PSE pork are poorer than those made from normal pork. This may be due to the differences in biochemical and physical properties whereby myofibrillar proteins are denatured thus the PSE meat has a poor bind (Torley, D’Arcy and Trout, 2000).

Regarding to the presence of dark red zones i.e. the influence of muscles on two-tone effect, already using the sensory analysis, difference between SH and TH was observed. The results of image analysis confirmed the sensory analysis. The average appearance of dark red zones on slice was measured 5.58 for SH and 1.88 for TH and there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). These results indicate that the SM affects the variability of the colour in cooked ham. Lightness value ( $L^*$ ) in SM is lower than in AD (Scheier et al., 2013). This fact is reflected in the final product in a group of hams TH where SM was separated. In TH was

detected statistically significantly lower appearance of dark red zones and two-tone effect was more considerable in hams made from standard raw materials.

Table 1: Appearance of destructured zones and dark red zones in cooked hams.

	STANDARD HAM (SH)	TESTED HAM (TH)	p-value
Number of evaluated slices	15	15	
Mean number of destructured zones	3.87	3.07	-
Mean area of destructured zones [%]	15.4	14.1	-
Mean area of dark red zones [%]	5.58	1.88	p<0.05

## Conclusion

The results of this study show that in hams made from the *musculus adductor* and *musculus semimembranosus* was detected higher appearance of dark red zones compared to ham made from the *musculus adductor*. The classification of muscle does not affect the appearance of destructured zones in cooked hams. In this work was confirmed, that the appearance of destructured zones is a major problem in cooked ham. Damaged structure of cooked ham was detected around 15 per cent.

## References

- BALAC, D., BAZIN, C., & LE TREUT, Y. Research of the factors able to influence the appearance of the syndrome of structureless hams. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 1998, vol. 48, no. 7, p. 45-52.
- BUCKO, O., PETRÁK, J., VAVRIŠÍNOVÁ, K., HAŠČÍK, P., DEBRECENI, O. Chemical composition and quality characteristics of pork in selected muscles. In: *EAAP Bratislava 2012*, p. 14-14.
- HUGENSCHMIDT, G, et al. The effects of early post-mortem pH and ultimate pH on level and amount of destructured zones in cooked cured hams. *Meat science*, 2010, vol. 85, no. 4, p. 632-639.
- KATSARAS, Konstantin; BUDRAS, Klaus-Dieter. The relationship of the microstructure of cooked ham to its properties and quality. *LWT-Food Science and Technology*, 1993, vol. 26, no. 3, p. 229-234.
- LAVILLE, Elisabeth, et al. Characterisation of PSE zones in *semimembranosus* pig muscle. *Meat science*, 2005, vol. 70, no. 1, p. 167-172.
- LESIÓW, Tomasz; XIONG, Youling L. A simple, reliable and reproductive method to obtain experimental pale, soft and exudative (PSE) pork. *Meat science*, 2013, vol. 93, no. 3, p. 489-494.
- MINVIELLE, B; HOUIX, Yannick; LEBRET, Bénédicte. Viandes déstructurées. *Facteurs de risque. Caractérisation colorimétrique, biochimique et histologique. Techni Porc*, 2001, vol. 24, p. 21-28.
- O'NEILL, D. J., et al. Effects of PSE on the quality of cooked hams. *Meat science*, 2003, vol. 64, no. 2, p. 113-118.
- PAELINCK, Hubert; SZCZEPANIAK, Slawomir. New strategies for the preservation of cooked ham. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 2005, 14.1: 37.
- Pedrielli, R. (2009). Personal communication.
- SCHEIER, Rico, et al. Hand-held Raman system for an early postmortem detection of pH and drip loss of pork meat. In: *Proceedings 59th International Congress of Meat Science and Technology, Izmir, Turkey*. 2013.
- TALENS, P, et al. Prediction of water and protein contents and quality classification of Spanish cooked ham using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 2013, vol. 117 no.3, p. 272-280.
- TORLEY, Peter J.; D'ARCY, Bruce R.; TROUT, Graham R. The effect of ionic strength, polyphosphates type, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. *Meat science*, 2000, 55.4: 451-462.
- VALOUS, Nektarios A., et al. The use of lacunarity for visual texture characterization of pre-sliced cooked pork ham surface intensities. *Food research international*, 2010, vol. 43, no. 1, p. 387-395.

**Contact address:** Martina Bednářová, Ing. Mgr., Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, eliasova.martinka@seznam.cz.

## Zastoupení DBP a DEHP v obalech masných výrobků Representation of DBP and DEHP in packaging meat products

<sup>1</sup>Bogdanovičová Soňa, <sup>1</sup>Jarošová Alžbeta, <sup>2</sup>Kameník Josef

<sup>1</sup>Ústav technologie potravin, AF, MENDELU, Zemědělská 1, 613 00 Brno

<sup>2</sup>Ústav hygieny a technologie masa, FVHE, VFU, Palackého 1/3, 612 42 Brno

### Summary

The study is focused on the volume di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in the packaging, which we are using on the packing meat products. We analyzed 30 samples packaging. From every samples we were collected samples about size 10 cm<sup>2</sup>. The assessment DBP and DEHP was done using high performance liquid chromatography (HPLC) with a column Zorbax Eclipse C8 and UV detection at a wavelength of 224 nm. The concentrations of phthalates was ranged from 1.19 to 349.41 µg.dm<sup>-2</sup>. We can be stated that the detected content PAE is in accordance with the limits referred in Regulation No 10/2011. The results of this study does not constitute a serious health risk consumer.

**Keywords:** di-n-butyl phthalate; di-2-ethylhexyl phthalate; packaging; meat product

### Úvod

Ftaláty (PAE) jsou estery kyseliny ftalové (1,2-benzendikarboxylové) používající se převážně jako plastifikátory neboli změkčovadla při výrobě plastických hmot. V materiálu nejsou pevně vázány kovalentní vazbou, proto se pomalu uvolňují do okolního prostředí tčkaním, vyluhováním, nebo migrací (Wormuth et al., 2006). Potraviny a suroviny mohou být kontaminovány z přírodního prostředí, prostřednictvím plastových zařízení používaných při zpracování, nebo migrací z obalového materiálu (Corea-Tellez et al., 2008). Hlavním zdrojem kontaminace potravin jsou materiály, se kterými přichází potraviny do styku (Wagner a Oehlmann, 2009). Balení potravin je jedním z nejdůležitějších procesů pro udržení trvanlivosti, transportovatelnosti a distribuce potravin (Otgonzul, 2010). Je však nutné vnímat možnou migraci látek, v našem případě ftalátů, z obalů do potravin. K expozici člověka ftalátům může dojít orálně, inhalačně, dermální absorpcí nebo parenterální aplikací (Cory-Slechta, 2008). Expozice těmito látkami znamená možné ohrožení lidského zdraví. Při chronickém příjmu vykazují ftaláty teratogenní a karcinogenní účinky a mohou ovlivnit i reprodukční schopnost organismu. Některé ftaláty jsou považovány za vývojově toxické a látky poškozující reprodukci (Witassek et al., 2011).

### Materiál a metody

Obaly masných výrobků byly zajištěny ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno a analyzovány na Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně. Z každého obalu (n=30) byl odebrán vzorek o velikosti 10 cm<sup>2</sup>. Všechny vzorky byly analyzovány duplicitně, tudíž bylo provedeno 60 analýz.

Vzorky byly louhovány ve směsi rozpouštědel n-hexan:dichlormethan (1:1) po dobu 72 hodin a následně třikrát extrahovány (60, 30, 30 minut). Spojené extrakční podíly byly přefiltrovány, odpařeny na rotační vakuové odparce a dosušeny dusíkem. Poté byl extrakt převeden pomocí hexanu (5 ml) do vialek a odstředěn. Vrchní část extraktu (1,5 ml) byla odebrána a dosušena dusíkem. Vzorky se opět odstředily, odebrala se vrchní vrstva extraktu (1,5 ml), dosušila se dusíkem a následně se vialky doplnily acetonitrem na objem 1 ml. Ftaláty se stanovily metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 224 nm, kolonou Zorbax Eclipse C8. Nástřik vzorků na koloně byl v množství 10 µl. Výsledné koncentrace byly vypočítané na základě kalibrační křivky v software Agilent Chemstation for



LC and LC/MS systems. Rozsah kalibrační křivky byl u DBP od 1,06  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  do 106,00  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  a u DEHP od 1,01  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  do 100,50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Korelační koeficient byl pro DBP 0,9999 a pro DEHP rovněž 0,9999. Limit detekce byl pro DBP 0,05  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  a pro DEHP 0,11  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . V konečné fázi byly výsledky statisticky zpracovány.

### Výsledky

Koncentrace sledovaných ftalátů (DBP+DEHP) jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g.dm}^{-2}$  plochy vzorku a jsou uvedeny v Tabulce 1. Námi zjištěné hodnoty ftalátů se pohybovaly v rozmezí 1,19 do 349,41  $\mu\text{g.dm}^{-2}$ .

Tabulka 1: Průměrné koncentrace DBP+DEHP v obalech masných výrobků vyjádřené v  $\mu\text{g.dm}^{-2}$ .

číslo vzorku	DBP+DEHP ( $\mu\text{g.dm}^{-2}$ )	číslo vzorku	DBP+DEHP ( $\mu\text{g.dm}^{-2}$ )
1	1,70	16	7,13
2	1,19	17	8,97
3	2,60	18	349,41
4	2,28	19	3,93
5	193,54	20	18,37
6	5,31	21	7,66
7	6,05	22	11,01
8	26,96	23	6,07
9	16,56	24	5,85
10	48,40	25	69,88
11	11,76	26	2,70
12	48,97	27	13,52
13	11,29	28	14,70
14	15,34	29	23,81
15	6,70	30	26,99

### Diskuze

Hlavním cílem práce bylo stanovit obsah PAE v obalech, které se používají na balení masných výrobků. Námi zjištěné koncentrace sledovaných ftalátů se pohybovaly v rozmezí 1,19 do 349,41  $\mu\text{g.dm}^{-2}$  a dle Nařízení č. 10/2011 nepřesahují nejvyšší přípustné množství migrace látek z obalů do potravin. I studie jiných autorů prokazují přítomnost ftalátů ve zkoumaných obalových materiálech.

Ndhkala et al. (2012) provedl studii, při které docházelo ke stanovení obsahu esterů kyseliny ftalové v lécích zabalených do plastových materiálů. V jednom z populárních výrobků bylo izolováno 43,3  $\text{mg.kg}^{-1}$  DEHP. Pacienti, kteří užívají doporučenou denní dávku tohoto přípravku, přijímají 7,8 mg DEHP denně. Někteří lidé tyto dávky nedodržují a užívají větší množství, než je doporučeno. Hromadění DEHP v tělech pacientů je tedy na alarmující úrovni. Ftaláty se do analyzovaných přípravků dostávají z plastových obalů a v průběhu výroby.

Migrace ftalátů z obalu do potravin je obecně ovlivněna mnoha faktory, jako je např. druh polymerního materiálu, druh potravin, teplota, délka kontaktu a jiné.

ShuangLing a KangQuan (2009) zjistili, že migrace DEHP z PVC fólie do masa se zvyšovala s rostoucí teplotou a časem. Maximální migrace byla při 90 °C a 30 minutách působení

(75,12 mg.dm<sup>-2</sup>). Celkový migrační limit (10 mg.dm<sup>-2</sup>) byl překročen při všech sledovaných kombinacích času a teploty, kromě kombinace 10 °C a <41 hodin, kde migraci nepozorovali.

### Závěr

Ftaláty působí negativně na lidské zdraví, proto je nezbytné jejich průnik do prostředí regulovat a expozici snižovat. Jednou z cest postupného snižování rizika PAE je prosazovat náhrady toxických ftalatů jinými zdravotně nezávadnými látkami. Jsou to např. citráty a benzoáty, které by měly být používány zvláště při výrobě materiálů používaných v zemědělství, potravinářství a zdravotnictví.

Námi zjištěná koncentrace PAE v obalech masných výrobků je v souladu s limitem uvedeným v Nařízení komise (EU) č. 10/2011, které definuje, že plasty a plastové výrobky nesmí do potravin uvolňovat svoje složky v množství větším než 10 mg.dm<sup>-2</sup> povrchu materiálu nebo výrobku. Tento limit však zahrnuje i jiné ftaláty a mnoho jiných látek, které jsou schopny uvolnit se z materiálu a migrovat tak do potravin. Námi zjištěná nejvyšší koncentrace DBP+DEHP je 349,41 µg.dm<sup>-2</sup>. Můžeme tedy konstatovat, že zjištěné koncentrace DBP+DEHP ve sledovaných obalech nepředstavují pro spotřebitele závažné zdravotní riziko.

### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Interní grantové agentury Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně projekt IP 10/2014.

### Literatura

COREA-TELLEZ, K.S.; BUSTAMANTE-MONTES, P.; GARCIA-FABILA, M.; HERNANDEZ-VALERO, M.A.; VAZQUEZ-MORENO, F. Estimated risks of water and saliva contamination by phthalate diffusion from plasticized polyvinyl chloride. *J Environ Health*. 2008, vol. 71, 3, s. 34-39.

CORY-SLECHTA, D. Phthalates and Cumulative Risk Assessment The Task Ahead. *Committee on the Health Risks of Phthalates, National Research Council*. 2008, 208 s. ISBN 0-309-12842-0.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 10/2011 o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami.

NDHLALA, A.R.; NCUBE, B.; VAN STANDEN, J. Ensuring quality in herbal medicines: Toxic phthalates in plastic-packaged commercial herbal products. *South African Journal of Botany*. 2012, s. 60-66.

OTGONZUL, O. Bioactive polymeric systems for food and medical packaging applications. *Zlín: Tomas Bata University*. 2010, 128 s. ISBN 978-80-7318-963-1.

SHUANGLING, Z.; KANGQUAN, G. Migration amount of Di-2-ethylhexyl phthalate from food-grade PVC film into meat at three temperatures. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. 2009, vol. 25, s. 291-293.

WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut. Res*. 2009, vol. 16, s. 278-286.

WITASSEK, M.; KOCH, H.M; ANGERER, J.; BRUNING, T. Assessing exposure to phthalates-the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*. 2011, vol. 55, 1, s. 7-31.

WORMUTH, M.; SCHERINGER, M.; VOLLENWEIDER, M.; HUNGERBÜHLER, K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal*. 2006, vol. 26, 3, s. 803-824.

**Kontaktní adresa:** Soňa Bogdanovičová, Ing., Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, sona.bogdanovicova@mendelu.cz.

## Vliv doby skladování na reologické vlastnosti vaječných tekutin

### The influence of storage time on the rheological properties of the egg liquids

<sup>1</sup>Strnková Jana, <sup>1</sup>Nedomová Šárka, <sup>2</sup>Buchar Jaroslav, <sup>2</sup>Kumbár Vojtěch

<sup>1</sup>Ústav technologie potravin, Mendelova univerzita, Brno

<sup>2</sup>Ústav techniky a automobilové dopravy, Mendelova univerzita, Brno

#### Summary

The rheological behaviour of egg yolk after different storage periods was investigated using rotational viscometer. It was found that yolk samples exhibited shear-thinning and thixotropic behaviour. The shear-thinning behaviour was fitted well into simple models. The time-dependant viscosity decreased rapidly with time and at lower shear rates reached an equilibrium stage. The time-dependant viscosity was also found to decrease with storage time. The experiment on the non destructive impact on the eggshell shows a significant damping of the stress wave during its propagation around eggshell. This damping decreases with the time of eggs storing. The performed experiments suggest the possibility of non destructive evaluation of the egg quality during its storage.

**Keywords:** egg; rheological properties; storage; impact loading

#### Úvod

Kvalita vajec během skladování je většinou sledována pomocí stanovení tzv. Haughových jednotek. Jak se ukázalo v práci Severa *et al.* (2010), intenzita těchto změn může být popsána pomocí reologických vlastností vaječných tekutin. Změny reologických vlastností vaječných tekutin se pak uplatňují při dynamickém namáhání vajec, kdy dochází k interakci mezi vaječnou kapalinou a skořápkou. Problematikou vlivu délky skladování na vibrační vlastnosti vajec při rázovém zatěžování se zabývá naše práce Strnková *et al.* (2013). V rámci dané etapy jsme se zaměřili na další analýzu těchto jevů, a to na základě hodnocení reologických vlastností vaječných tekutin a kvantifikací útlumu vlny napětí vznikající ve vaječné skořápce při nedestruktivním rázu.

#### Materiál a metody

Pro experiment byla zvolena vejce nosnic *Hisex Brown* z klecového chovu, která byla odebrána v 37. týdnu snášky. Vejce byla skladována při teplotě 8 °C po dobu 0, 1, 2, 3, 4, 5 a 6 týdnů. Po uplynutí doby skladování byly z vajec připraveny vzorky žloutků, bílků a melanže. Viskozita byla měřena při teplotě 8 °C pomocí rotačního viskozimetru *Anton Paar DV-3 P*. Byly vyhodnocovány jak tokové křivky, tzn. závislost smykového napětí na rychlosti deformace, tak i závislost viskozity na čase pro konstantní hodnotu rychlosti deformace.

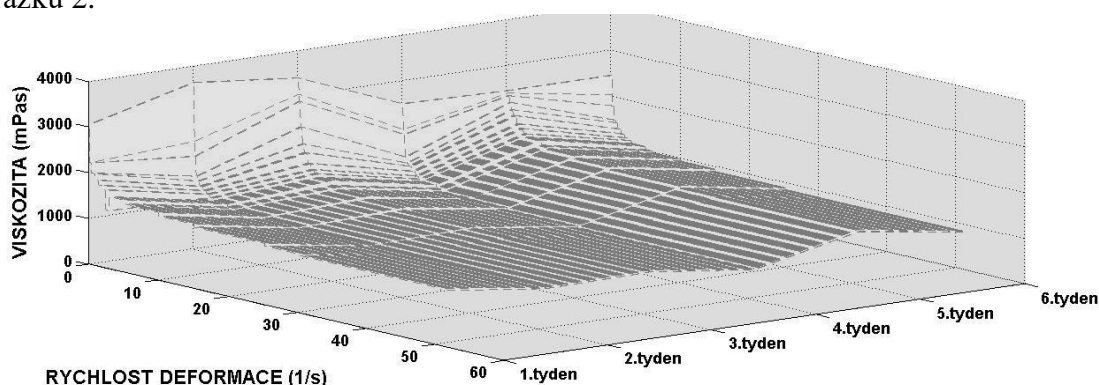
Rázové zařízení bylo provedeno pomocí metody popsané v práci Strnková *et al.* (2013). Vejce byla zatěžována dopadem razníku na tupý konec, tzn. na oblast vzduchové bubliny, a to z výšky 10 mm. Výchylka skořápky byla snímána ve třech bodech podél poledníku. Bod A byl vzdálen 5 mm, bod B byl vzdálen 20 mm a bod C 35 mm od místa dopadu razníku.

#### Výsledky a diskuze

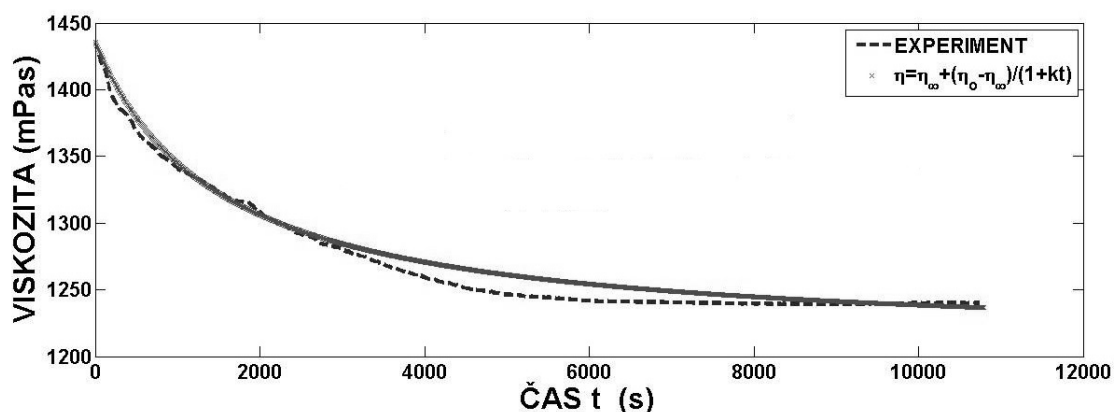
Výsledky reologických testů ukazují, že vaječné tekutiny vykazují výrazně neneutronovské chování, tzn., že závislost smykového napětí na rychlosti deformace, je nelineární. Reologické vlastnosti jsou pak vyjádřeny pomocí tzv. zdánlivé viskozity dané poměrem smykového napětí a rychlosti deformace. Příklad této závislosti je uveden na obrázku 1.

Je zřejmé, že viskozita klesá s rychlostí deformace a je rovněž závislá na době skladování, kdy se nejdříve zvyšuje, pak klesá. Vezmeme-li jednu rychlost deformace a sledujeme

závislost viskozity na čase, pak zjišťujeme, že viskozita s časem klesá, jak znázorňuje příklad na obrázku 2.



Obrázek 1: Závislost viskozity na době skladování a na rychlosti deformace u žloutků.



Obrázek 2: Vliv času na viskozitu čerstvého žloutku.

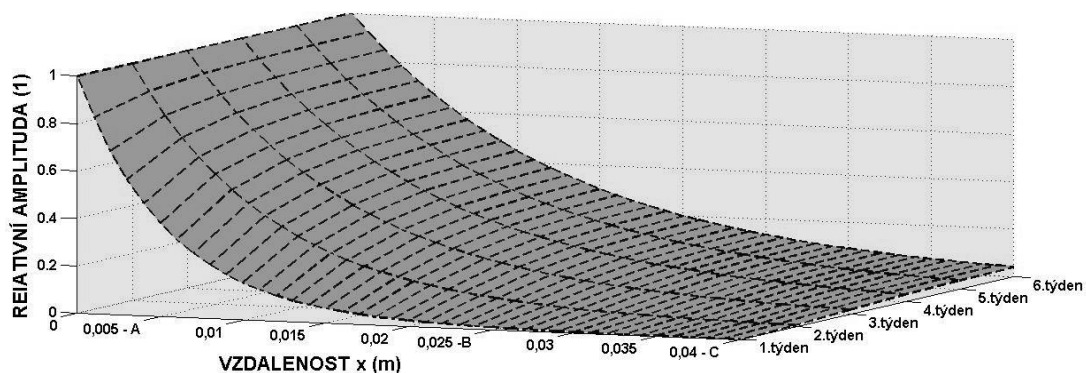
Tento jev nazýváme tixotropií. Danou časovou závislost je možné popsat pomocí řady modelů (Abu-Jdayl, 2003). Použitý model je znázorněn na Obr. 2. Obdobné chování bylo zjištěno pro bílek a melanz.

Jak již bylo uvedeno v práci Strnková *et al.* (2013), vlastnosti vaječných tekutin ovlivňují šíření vlny napětí ve skořápce. Dochází k útlumu vlny, kdy pokles amplitudy ve směru šíření je popsán veličinou:  $e^{-\alpha x}$ , kde  $\alpha$  je koeficient útlumu. Ukazuje se, že útlum klesá s dobou skladování. Hodnoty koeficientu útlumu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Koeficienty útlumu.

Doba skladování	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden
Útlum $\alpha$ ( $m^{-1}$ )	186,3	120,8	97,31	86,14	82,11	80,26

Útlum amplitudy výchylky je znázorněn na obrázku 3. Jde o relativní výchylku vztaženou na výchylku v místě nárazu – A, B, C jsou body, ve kterých byla výchylka měřena.



Obrázek 3: Útlum vlny napětí ve směru šíření v závislosti na době skladování.

### Závěr

Byl prokázán vliv doby skladování na reologické vlastnosti vaječných tekutin. Ukazuje se, že reologické vlastnosti ovlivňují útlum vlny napětí, která vzniká v důsledku nedestruktivního rázu. Tento útlum je jednoznačnou, a to klesající funkcí doby skladování. V návaznosti na dřívější poznatky se tak ukazuje možnost spolehlivého nedestruktivního hodnocení délky skladování.

### Poděkování

Studie byla podpořena projektem Interní grantové agentury AF MENDELU č. IP 17/2014.

### Literatura

ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. *Journal of Food Engineering*. 2003, vol. 57, no. 1, s. 97–102.

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.

STRNKOVÁ, J.; NEDOMOVÁ, Š.; BUCHAR, J. Nedestruktivní hodnocení kvality vajec v průběhu jejich skladování. In *XV. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2013, s. 71–73.

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

## Možnosť náhrady fosforečnanov amarantovou múkou pri výrobe jemne mletých mäsových výrobkov

### Possible replacement of phosphates by amaranth flour in minced meat batters production

Plšková Mária, Gál Robert, Buňka František

*Ústav technológie potravín, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně*

#### Summary

*The aim of this experimental work was to observe technological properties of minced meat products prepared with amaranth flour as a complete or partial replacement of phosphates. Meat batters were made from mechanically deboned poultry meat, nitrite salting mixture, water, amaranth flour and  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . The influence of additive substances on hardness, cooking loss and water holding capacity of meat batters was observed.*

**Keywords:** meat batters; phosphates; amaranth flour

#### Úvod

Hľadanie náhrady fosforečnanov pri výrobe mäsových výrobkov vyplýva z potreby odstránenia nadmerného príjmu fosforu v bežnej ľudskej výžive. Použitie alternatívnych prídavných látok pri spracovaní mäsa a výrobe mäsových výrobkov je predmetom niekoľkých vedeckých štúdií. Aplikovaná bola napríklad transglutamináza (Ferreira, et al., 2012), výťažok z koreňa zázvoru (Pawar, et al. 2007), hráškový a kukuričný škrob (Pietrasik, et al., 2012). Škrob, obsiahnutý v semenách amarantu, má v porovnaní s inými cereáliami nízky obsah amylozy, čo umožňuje jeho vysokú bobtnavosť. Zároveň sa s klesajúcim obsahom amylozy zvyšuje schopnosť škrobu viazať vodu (Hrabák, 2013). Vlákna amarantu má vysokú viskozitu a pri spracovaní mäsa môže plniť úlohu aditíva typu hydrokoloidu (Ostoja, et al., 2002). Cieľom experimentálnej práce bolo sledovať vplyv prídavku amarantovej múky samostatne a v kombinácii s dihydrogéndifosforečnanom sodným ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) na tvrdosť, straty varením a väznosť vody jemne mletých mäsových výrobkov. Dihydrogéndifosforečnan sodný bol zvolený vzhľadom na jeho pozitívny vplyv na väznosť vody vo výrobkoch (Jokl, 2012, Long, 2012).

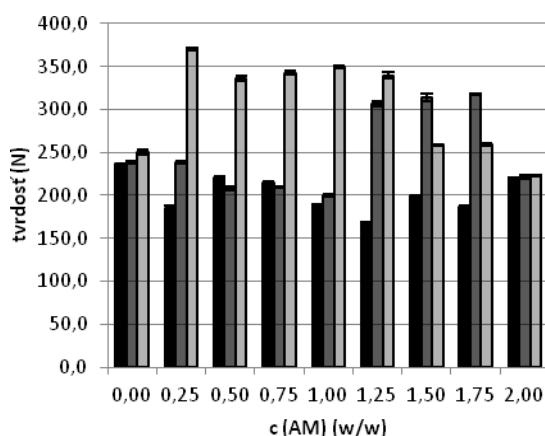
#### Materiál a metódy

V laboratórnych podmienkach Ústavu technológie potravín UTB ve Zlíně boli zo strojne oddeleného hydínového mäsa, dusitanovej soliacej zmesi a chladenej vody (4 – 6 °C) vyrobené tri série jemne mletých mäsových výrobkov, označených podľa prítomnosti prídavných látok ako A, B a C, kde A = receptúra s obsahom amarantovej múky v koncentračnej rade od 0,00 do 2,00 % (w/w) s krokom 0,25 % (w/w) bez prítomnosti fosforečnanu; B = receptúra s konštantným obsahom  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  0,20 % (w/w) vyjadrených ako obsah  $\text{P}_2\text{O}_5$  a prídavkom amarantovej múky v rovnakej koncentračnej rade ako (A); C = receptúra s konštantným obsahom  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  0,40 % (w/w) vyjadrených ako obsah  $\text{P}_2\text{O}_5$  a prídavkom amarantovej múky v rovnakej koncentračnej rade ako (A). Suroviny boli homogenizované v prístroji Vorwerk Thermomix TM31 (Vorwerk, Nemecko). Zmes bola následne naplnená do sklenených obalov a tepelne ošetrená v konvektomate pri teplote 70 °C v jadre výrobku po dobu 10 minút. Stanovenie strát varením bolo vykonané zo surového diela (Marcos, et al., 2010), stanovenie väznosti vody po 24 hodinách skladovania výrobku pri chladiarenských teplotách (4 – 6 °C) (Villamonte, et al., 2013), tvrdosť výrobku bola stanovená po 7 dňoch skladovania výrobku pri chladiarenských teplotách (4 – 6 °C) (Caine, et

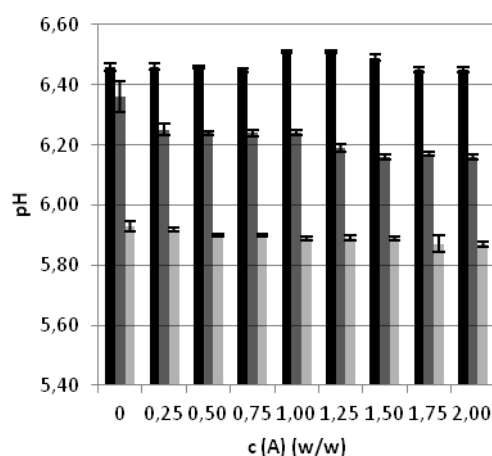
al., 2003). Pre informáciu o vnútornom prostredí výrobku bolo po 7 – dňovom skladovaní vykonané meranie pH pomocou vpichového pH metra (pH Spear Food Testing, Eutech Instruments).

### Výsledky a diskusia

Namerané údaje sú uvedené ako závislosti zmien meraných vlastností na meniacej sa koncentrácii amarantovej múky v grafoch 1, 2, 3 a 4. Jednotlivé dátové rady sú uvedené zľava doprava v poradí (A), (B) a (C).



Graf 1: Závislosť tvrdosti výrobkov na koncentrácii amarantovej múky.

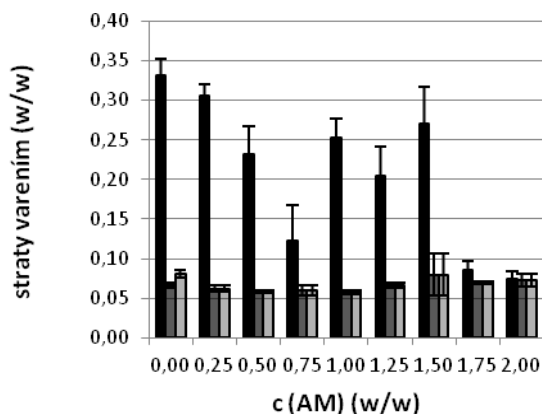


Graf 2: Závislosť pH výrobkov na koncentrácii amarantovej múky.

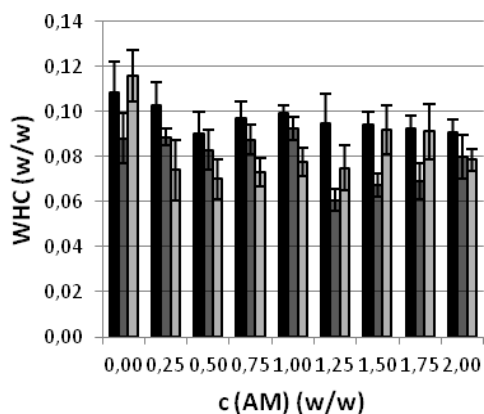
Vplyv koncentrácie amarantovej múky na tvrdosť výrobku je nelineárna (graf č. 1). Hodnoty tvrdosti dosahujú najvyšších hodnôt pri obsahu amarantovej múky (AM) 0,50 % (w/w) a 2,00 % (w/w). Minimálna tvrdosť výrobku bola dosiahnutá pri koncentrácii AM 1,25 % (w/w). Je zrejmy vplyv fosforečnanu na tvrdosť výrobku. Celková tvrdosť výrobku narastá so zvyšujúcou sa koncentráciou fosforečnanu v receptúre a to od 168 N – 220 N pre (A) cez 200 N – 318 N pre (B) po 222 N – 369 N pre (C).

Bolo pozorované celkové zníženie hodnôt pH vo výrobku (graf č. 2), a to od 6,45 – 6,51 pre (A) cez 6,16 – 6,25 pre (B) po 5,87 – 5,92 pre (C). Použitý dihydrogéndifosforečnan sodný je z chemického hľadiska považovaný za kyslú látku, schopnú odštiepiť protóny a tak prispieť k zníženiu hodnoty pH prostredia.

Straty varením (cooking loss – CL) sú pri produkcii mäsových výrobkov významným technologickým parametrom vzhľadom na potrebu udržať vodu v systéme a zabrániť nadmernému úniku „šťavy“ spolu s chuťovými látkami, tukom a ďalšími pri tepelnom opracovaní. Boli stanovené ako hmotnostný zlomok vylúčiteľného kvapalného podielu z navážky vzorky. Z grafu č. 3 je zrejmé, že straty varením pre výrobky (A) sa pohybujú od 7,39 % po 30,53 %. Priebeh krivky je nelineárny s výskytom lokálnych maxim a minim. Z predošlého výskumu (Jokl, 2012, Long, 2012) je zrejmé, že mleté mäsové výrobky s obsahom dihydrogéndifosforečnanu sodného vykazujú nízke straty varením. Po prídavku fosforečnanu do receptúry dochádza k prudkému zníženiu celkových strát varením (graf č. 3) a to na 5,80 % - 7,99 % pre (B) a 6,50 % – 7,59 % pre (C). Malé rozpätie týchto hodnôt naznačuje, že v prítomnosti fosforečnanu má zvyšujúca sa koncentrácia amarantovej múky vo výrobku len zanedbateľný vplyv na straty varením.



Graf 3: Závislosť strát varením u výrobkov na koncentrácii amarantovej múky



Graf 4: Závislosť väznosti vody na koncentrácii amarantovej múky

Vodoväzné schopnosti mäsa a mäsových výrobkov sú okrem strát varením charakterizované ďalším parametrom, a to väznosťou vody (water holding capacity – WHC). Prítomnosť fosforečnanu sa prejavila znížením celkových hodnôt WHC, ktorých intervaly boli 9,04 % - 10,29 % (A), 6,08 % - 9,26 % (B) a 7,01 % - 9,20 % (C).

### Záver

Výsledky práce uvádzajú vplyv prídavku amarantovej múky samostatne alebo v kombinácii s dihydrogéndifosforečnanom sodným na technologické vlastnosti jemne mletých mäsových výrobkov.

### Literatúra

Literatúra je dostupná u autorov.

**Kontaktná adresa:** Mária Plšková, Ing., Ústav technológie potravín, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Růmy 4046, 760 01 Zlín, Česká Republika, m4\_plskova@ft.utb.cz.



## Impact of vacuum frying on quality of potato crisps and frying oil

Bělková Beverly, Čápková Helena, Hradecký Jaromír, Hajšlová Jana

*Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Food Analysis and Nutrition, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic*

### Summary

*In the presented project, vacuum frying, as a new strategy for processing and preparing “healthier” crisps, was studied. Two potato varieties (Saturna and Impala) were sliced and fried in rapeseed oil under vacuum at a temperature of 125 °C and under atmospheric pressure at 165 °C. The content of acrylamide (processing contaminant) and alkylpyrazine (providing specific flavor to fried snacks) was determined in the fried crisps. The quality of the frying oil was analyzed for oxidized triacylglycerols, triacylglycerol polymers and oxidized fatty acids. The obtained results showed that vacuum frying significantly reduced acrylamide formation in potato crisps (by 96 – 98 %). Another benefit was the reduced oxidation of the frying oil. The taste of vacuum and conventional fried crisps was evaluated by assessors, who preferred conventional fried potato crisps since they better matched their expectation associated with this type of snack, some of them appreciated “potato-like” flavor dominating in vacuum fried crisps.*

**Keywords:** *vacuum frying; acrylamide; alkylpyrazine; oxidized triacylglycerols; triacylglycerol polymers; oxidized fatty acids*

### Introduction

Deep fat frying is a very common and popular process to prepare e.g. crispy and flavored potato crisps. However, during frying, potato crisps undergo many chemical reactions including Maillard reaction resulting, besides of flavor compounds origination (e.g. alkylpyrazines, also in formation of acrylamide, potential human carcinogen (Group 2A) (IARC 1994), formed during the reaction of amino acid asparagine and reducing sugars (glucose, fructose) as crucial precursors. In addition, the frying oil, which is absorbed by potato slices, is affected by many chemical reactions like oxidation, polymerization, hydrolysis etc. Some of these originated compounds may reduce the nutritional value of the final product or even pose health hazard to consumers (Choe 2007). Many approach to mitigate acrylamide, influence the nutrition value, taste, color and texture of the final product. Besides that their applications were very time consuming and expensive. To minimize the extent of undesirable thermally induced reactions, a new and unique technology vacuum deep-fat frying process represents a conceivable option as it enables frying at lower temperatures, thus improving the fried product safety and quality. This work was undertaken with the aim of investigating the safety and sensory quality of the potato crisps fried under vacuum and atmospheric pressure.

### Material and Methods

#### *Acrylamide content*

Homogenized fried potato crisps were treated by the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safety method (QuEChERS). For acrylamide quantification an isotope dilution technique (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-acrylamide as an internal standard) was employed. The samples were analyzed by HPLC/(+)-ESI-MS/MS.

#### *Volatile alkylpyrazines*

The alkylpyrazine content was determined applying the Head Space SPME-MS.

### ***Determination of oxidized oil samples applying DART-HRMS***

The oil samples were measured applying DART-orbitrap MS. Polar compounds were extracted by diluting an oil sample with a mixture of methanol:water and manually shaken. Non-polar compounds were extracted by diluting the oil sample with toluene.

### ***Determination of triacylglycerol (TAG) polymers***

The oil sample was diluted with tetrahydrofuran and desiccated with anhydrous sodium sulphate and analyzed applying HP-SEC-RID.

## **Results and discussion**

### ***Optimizing frying conditions***

The first part of the research was focused on optimizing vacuum and conventional frying conditions. The more the frying lasts the more moisture evaporates and the activation energy rapidly increases for acrylamide formation. Therefore a lower temperature (125 °C) was tested under vacuum conditions and subsequently compared with the acrylamide content and moisture content (should be less than 2% to avoid microbiological spoilage) in conventionally fried potato crisps processed at 165 °C (**Figure 1** and **Figure 2**). The sugar and asparagine content was analyzed in both varieties (Saturna: 2.6 g/kg asparagine, 2.0 g/kg glucose, 1.3 g/kg fructose; Impala: 0.7 g/kg asparagine, 2.0 g/kg glucose, 2.1 g/kg fructose).

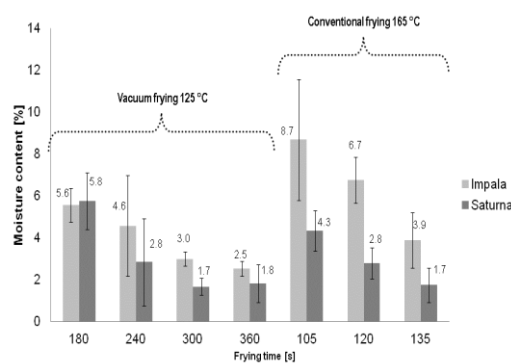
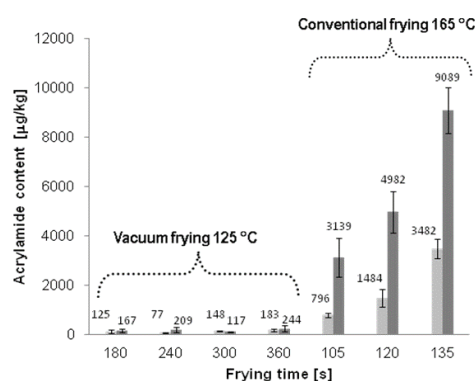


Figure 1: Acrylamide content in potato crisps fried under two different conditions.

Figure 2: Moisture content in potato crisps fried under two different conditions.

All potato crisps fried under both different conditions were yellow golden, crispy and suitable to consume. Without any pre-treatments, the acrylamide content was possible to reduce by 96 to 98 %, respectively. It seems that vacuum frying can be used for any type of potato variety, no matter what amount of reducing sugar and asparagine content the variety has. Ehling et al. (2005) described, that volatile products of Maillard reaction like alkylpyrazines correlate with acrylamide formation. This explains the differences observed in vacuum and conventionally fried potato crisps. The samples were tested for the presence of 13 alkylpyrazines. The total alkylpyrazine content in vacuum fried potato crisps (fried for 240 and 360 s) ranged from 21 to 284 µg/kg. Alkylpyrazines were not detected in 180 s vacuum fried crisps. Conventionally fried crisps contained from 1698 to 75482 µg/kg. The amount of alkylpyrazines strongly depends on the reducing sugar and asparagine content and the frying conditions. Sensory evaluation of both types of crisps was done by 23 assessors. More preferred were conventionally fried crisps due to their significant flavor. This finding should not be a disadvantage as consumers get used to new healthier products.

### **Investigation of the oil bath**

The frying oil was totally heated for 17 hours under both frying conditions. Protonated molecular triacylglycerol (TAG) ions  $[M+NH_4]^+$  were observed in the region  $m/z$  840-940. New signals were observed in the range  $m/z$  910-940. Their mass differed in  $\Delta m/z$  16,  $\Delta m/z$  32. These ions could apparently be linked to TAGs oxidation products. Ion  $m/z$  902.82 corresponded to non-oxidized triolein (OOO), specific TAG in rapeseed oil. The increase of ion mass to  $m/z$  918.81 and  $m/z$  934.80 corresponded to the incorporation of one or two atoms of oxygen into the TAG molecule. Analogy determined was present linoleyldiolein (LOO,  $m/z$  900.80), palmityldiolein (POO,  $m/z$  876.80) and dipalmitylein (PPO,  $m/z$  850.79). No oxidized TAGs were observed in the fresh oil.

**TAG polymers** are degradation products of frying. The limit of TAG polymers (12-13%) is considered as limiting in frying oils (Firestone 2004). This limit was not exceeded in the vacuum heated oil even after 17 hours. The limit was exceeded in the conventionally heated oil already after 11.5 hours.

### **Conclusion**

The results showed that vacuum frying significantly reduced acrylamide formation in potato crisps, typically by 96 – 98 % as compared to conventional processing. The other benefit of this approach was the reduced oxidation of the frying oil i.e. reduced content of undesirable transformation products moreover the respective oil bath could be used for more frying cycles. It should be noted, however, that due to the lower temperature employed, the profile of flavor compounds is changed as well. The taste of vacuum and conventional fried potato crisps was also evaluated by a 23-member panel. Although most of assessors preferred conventional fried potato crisps since they better matched their expectation associated with this type of snack, some of them appreciated “potato-like” flavor dominating in vacuum fried crisps (reduction of Maillard reaction, resulted in a limited formation of alkylpyrazines).

### **Acknowledgement**

Finacial support from specific university research (MSMT No 20/2014). Special acknowledgement to Assoc. Prof. Zuzana Réblová.

### **References**

- CHOE, E.; MIN, D.B. Chemistry of Deep-Fat Frying oils. *Journal of Food Science*. 2007, vol. 72, No. 5, R77-R86.
- EHLING, S.; SHIBAMOTO, T. Correlation of acrylamide generation in thermally processed model systems of asparagine and glucose with color formation, amounts of pyrazines formed, and antioxidative properties of extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 4813-4819.
- International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals*. United Kingdom, 1994, vol. 60, 389 – 433. ISBN 9283212606.
- FIRESTONE, D. (2004). Regulatory requirements in the frying industry. *Frying Technology and Practices*, Gupta, M.K., Warner, K. White, P.J., eds., Champaign, IL: AOCS Press, 2004, 200-216. ISBN 978-1-893997-31-8.

**Contact address:** Beverly Bělková, Ing., Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 – Dejvice, belkova@vscht.cz.

## Senzorická kvalita biologicky kypřeného bezlepkového pečiva

### Sensory quality of biologically leavened gluten-free bread

Masaříková Lucie, Kulhanová Soňa, Dvořák Marek, Burešová Iva

Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

#### Summary

*The aim of this study was to evaluate the sensory quality of gluten-free bread made from five gluten-free flours (amaranth, chickpea, quinoa, buckwheat and rice). The appearance and color of the crust; appearance, texture and color crumb, elasticity of crumb, porosity of crumb, taste and smell, intensity of odor and unpleasant taste and overall impression of the submitted samples were investigated. The overall impression of amaranth bread was evaluated as the worst of all tested samples because of the strong odors and unpleasant taste. Conversely, rice bread and buckwheat bread were evaluated as the best of all tested gluten-free samples in the overall impression and preference test.*

**Keywords:** gluten-free; bread; sensory quality

#### Úvod

Biologicky kypřené pečivo je nedílnou součástí jídelníčku. Základní surovinou pro tyto výrobky jsou obiloviny, zejména pšenice a žito. Kvalita biologicky kypřeného pečiva závisí na množství a kvalitě lepkových bílkovin, které po smíchání s vodou vytváří v průběhu hnětení těsta gelovitou strukturu (lepek). Lepek může díky svým unikátním viskoelastickým vlastnostem zadržovat kypřící plyny uvolňované kvasinkami, což je základem pro dosažení typické pórovité textury biologicky kypřeného pečiva (Burešová a Lorencová 2013). Některým konzumentům však mohou lepkové bílkoviny způsobovat zdravotní komplikace a tito lidé jsou odkázáni na konzumaci bezlepkových potravin. Vzhledem k rostoucímu počtu konzumentů trpících lepkovou intolerancí celosvětově roste poptávka po bezlepkových pekařských výrobcích. Intenzivně se proto hledá látka, která je schopna funkční vlastnosti lepku nahradit (Anton a Artfield 2008, Dvořáková et al. 2012). Základními surovinami pro výrobu biologicky kypřeného bezlepkového pečiva jsou obiloviny jako proso, kukuřice, rýže a čirok, a dále pseudocereálie jako je pohanka, amarant a merlík. Využívají se také luštěniny, např. cizrna, fazole, hrách a čočka (Gallagher et al. 2004).

Cílem práce bylo vyhodnotit senzorickou kvalitu biologicky kypřeného bezlepkového pečiva připraveného z amarantové, cizrnové, merlíkové, pohankové a rýžové mouky. Jako kontrolní vzorek bylo použito pšeničné pečivo vyrobené standardizovaným postupem.

#### Materiál a metody

Amarantová mouka byla zakoupena od společnosti Josef Vince Jihlava, cizrnová a rýžová mouka byla dodána společností Natura Hustopeče, merlíková mouka od společnosti ASO zdravý život Hranice. Pohanková mouka byla dodána Pohankovým mlýnem Zdeněk Šmajstrla Frenštát pod Radhoštěm. Jako kontrola byla použita pšeničná mouka hladká světlá T530 od společnosti Penam, a.s., Mlýn Kroměříž.

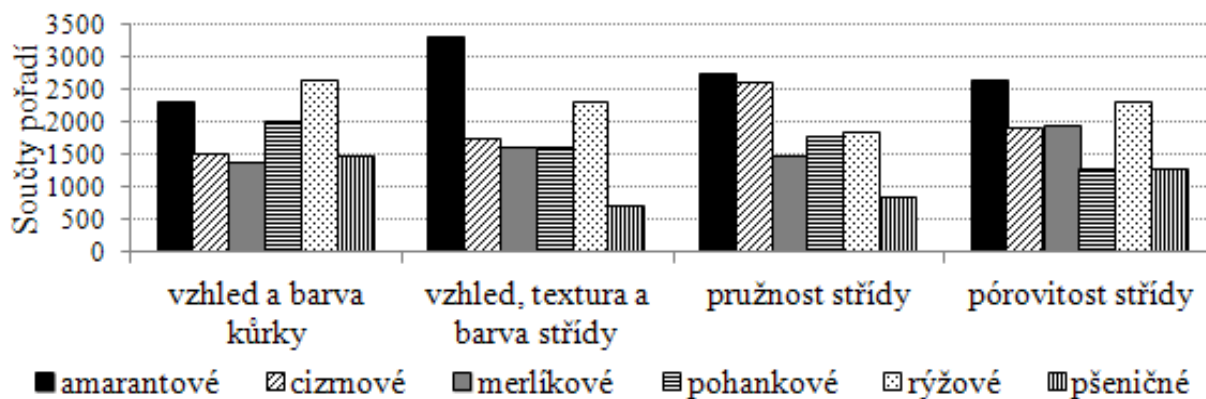
Modelové vzorky biologicky kypřeného bezlepkového pečiva byly připraveny v laboratorních podmínkách. Sypké recepturní složky (mouka 300 g, sůl 1,5%, řepný cukr 1,86 % a kyselina askorbová 0,005 %) byly smíchány s vodou podle farinografické vaznosti a šlehány v mixéru (Spar Food Machinery MFG, Co., Ltd. Taiwan) po dobu  $3 \pm 1$  min. Poté bylo přidáno aktivované sušené droždí (Lesaffre, Francie) a těsto bylo šleháno dalších  $6 \pm 1$  min. Těsto bylo nadávkováno do formiček a ponecháno fermentovat  $20 \pm 1$  min při teplotě  $30 \pm 2$  °C a relativní vlhkosti  $85 \pm 5$  %. Vykyнутé těsto bylo pečeno při teplotě  $180 \pm 5$  °C v zapařeném

horkovzdušné peci po dobu  $20 \pm 1$  min. Senzorická analýza byla provedena  $20 \pm 4$  h od upečení. Kontrolní pšeničné pečivo bylo vyrobeno podle metodiky ICC standardu č. 131.

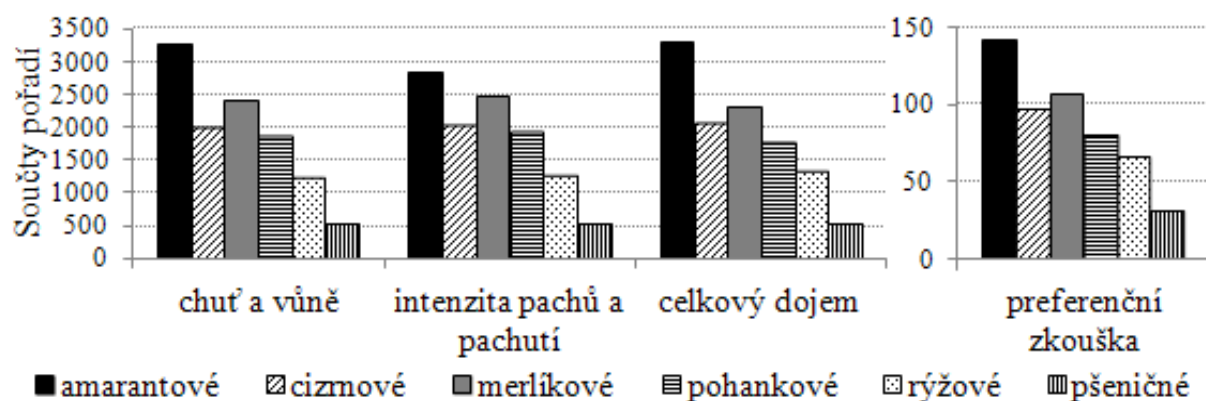
Při sensorické analýze pečiva byl posuzován vzhled a barva kůrky; vzhled, textura a barva střídy; pružnost střídy; pórovitost střídy; chuť a vůně; intenzita pachů a pachutí a celkový dojem předložených vzorků. Pečivo bylo hodnoceno podle pětibodové hédonické ordinální stupnice druhého druhu (stupeň 1: vynikající, stupeň 5: nevyhovující). Pomocí pořadové preferenční zkoušky byly vzorky seřazeny hodnotiteli od nejvíce preferovaného k nejméně preferovanému. Hodnocení bylo provedeno 25 hodnotiteli na úrovni vybraný posuzovatel dle ČSN ISO 8586-1. Statistické vyhodnocení sensorické analýzy jednotlivých sledovaných parametrů pečiva bylo provedeno Kruskal-Wallisovým testem a pořadová preferenční zkouška byla vyhodnocena Friedmanovým testem. Oba testy byly provedeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### Výsledky a diskuze

Výsledky sensorické analýzy pečiva prokázaly, že hodnotitelé s 95% spolehlivostí našli statisticky významné rozdíly mezi hodnocenými vzorky pečiva (Obrázek 1, 2). Čím vyšší byla hodnota součtu pořadí, tím hůře byl daný parametr hodnocen.



Obrázek 1: Součty pořadí pro vzhled a barvu kůrky; vzhled, texturu a barvu střídy; pružnost střídy a pórovitost střídy.



Obrázek 2: Součty pořadí pro chuť a vůni; intenzitu pachů a pachutí; celkový dojem a pořadovou preferenční zkoušku.

Amarantové pečivo bylo hodnotiteli negativně hodnoceno téměř ve všech sledovaných parametrech. Jeho sensorickou kvalitu snížily především silné pachy a pachutí způsobené přítomností hořkých antinutričních látek (např. saponinů, fenolů, taninu a dalších)

(Palombini et al. 2013). Amarant proto nevyhovuje jako samostatná surovina pro výrobu pečiva, ale lze předpokládat jeho uplatnění ve směsích s bezlepkovou moukou nevýrazné chuti a vůně. Cizrnová a merlíková mouka je také méně vhodná, především kvůli horšímu hodnocení parametrů chuti a vůně a intenzitě pachů a pachutí, zvláště v případě merlíkového pečiva, kde je hořká chuť způsobena přítomnými saponiny. Nicméně, přídatek cizrnové a merlíkové mouky může zlepšit texturní vlastnosti a zvýšit nutriční hodnoty bezlepkového pečiva (Palombini et al. 2013, Yamsaengsung et al. 2012).

Nejvhodnější surovinou pro výrobu bezlepkového pečiva byla vyhodnocena rýžová mouka. Ačkoliv rýžové pečivo bylo negativně hodnoceno v parametrech kůrky a střídy, v parametrech chuti a vůně a intenzitě pachů a pachutí se jako jediné z bezlepkových vzorků přiblížilo kvalitě pšeničného pečiva. Předností pečiva vyrobeného z rýžové mouky je především neutrální chuť a vůně bez výrazných pachů a pachutí (Torbica et al. 2010). Další vhodnou surovinou je pohanková mouka, která byla pozitivně hodnocena v parametrech střídy, chuti a vůně. Pohanková mouka v kombinaci s rýžovou moukou je velmi vhodnou směsí pro výrobu bezlepkového pečiva (Torbica et al. 2010).

### **Závěr**

Výsledky sensorické analýzy prokázaly, že amarantová mouka není vhodná jako samostatná surovina pro výrobu bezlepkového pečiva. Naopak velmi vhodnými surovinami jsou rýžová a pohanková mouka. Pro zlepšení texturních a nutričních vlastností bezlepkového pečiva je vhodný přídatek cizrnové a merlíkové mouky.

### **Poděkování**

Práce byla provedena za podpory interního grantu UTB ve Zlíně č. IGA/FT/2014/001 financovaného z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu.

### **Literatura**

ANTON, A.A.; ARTFIELD, S.D. Hydrocolloids in gluten-free breads: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008, vol. 59, no. 1, s. 11-23.

BUREŠOVÁ, I.; LORENCOVÁ, E. *Výroba potravin rostlinného původu: zpracování obilovin*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2013. 302 s. ISBN 978-80-7454-278-7.

DVOŘÁKOVÁ, P.; BUREŠOVÁ, I.; KRÁČMAR, S. Textural properties of bread formulations based on buckwheat and rye flour. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2012, vol. 60, no. 5, s. 61-68.

GALLAGHER, E.; GORMLEY, T.R.; ARENDT, E.K. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science Technology*, 2004, vol. 15, no. 3, 143-152.

PALOMBINI, S.V.; CLAUS, T.; MARUYAMA, S.A.; GOHARA, A.K.; SOUZA, A.H.P.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V.; GOMES, S.T.M.; MATSUSHITA, M. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2013, vol. 33, no. 2, s. 339-344.

TORBICA, A.; HADNAĐEV, M.; DAPČEVIĆ, T. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*. 2010, vol. 24, no. 6-7, s. 626-632.

YAMSAENGSUNG, R.; BERGHOFER, E.; SCHOENLECHNER, R. Physical properties and sensory acceptability of cookies made from chickpea addition to white wheat or whole wheat flour compared to gluten-free amaranth or buckwheat flour. *International Journal of Food Science*. 2012, vol. 47, no. 10, s. 2221-2227.

**Kontaktní adresa:** Lucie Masaříková, Ing., Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, lmasarikova@ft.utb.cz.

## The development of image analysis methods for the evaluation of selected quality parameters of food animal origin

<sup>1</sup>Čáslavková Petra, <sup>1</sup>Pospiech Matěj, <sup>2</sup>Štarha Pavel, <sup>1</sup>Kameník Josef, <sup>1</sup>Saláková Alena, <sup>1</sup>Tremlová Bohuslava, <sup>1</sup>Řezáčová Lukášková Zuzana

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické, Brno

### Summary

*In the evaluation of quality parameters of food is most commonly used still method sensory analysis. For obtaining objective results is necessary to have well trained team of evaluators, but there is still the possibility of mistakes from subjective perception. New innovation in the evaluation of food is the modern method of image analysis. This method use typical colour descriptor for recognizing colour and shape of food products like sensory analysis but also using this method is very useful for assessment the quality of technology used in production of food, for evaluation of influence the raw materials on the texture and colour of food. Advantage of this method is the high degree of objectivity, elimination mistakes from subjective and high speed of each analysis. Development and application image analysis in this study was directed to the evaluation of the structure of meat products. Image analysis was developed also for evaluating the color and texture of bread. Adaptive Contrast Control Program Structure and Object Analyser version 6.1 was counted size of the fat parts divided into three categories: category 1 (up to 1,5 mm), category 2 (1,5 - 3 mm) and category 3 (3-6 mm). From this categories was specified fat size coefficient (FS). Fat size coefficient was used for distinguish two different technologies for preparing dry fermented meta product Poličan. Based on the FS coefficient was detected statistically significant difference between producers ( $p < 0,05$ ).*

**Keywords:** computer vision; food quality; fat; food structure

### Introduction

Quality is a key factor for modern food industry because the high-quality of product is the basis for access in today's highly competitive market. To satisfy the increased awareness, sophistication and greater expectation of consumers, it is necessary to improve quality evaluation of food products (Brosnan, 2002). As a rapid, economic, consistent and even more accurate and objective inspection tool, image analysis methods have been used increasingly in the food industry for quality evaluation purposes (Sun, 2000). Image analysis (computer vision) is included between instrumental methods, which have admittedly many advantages including repeatability and reproducibility, simple and fully automated process, high speed of one analysis, simple interpreting of results and low cost for one analysis in large group of samples analyzed (Ingr, 1997). In the methods of image analysis is the image perceived by special algorithms, which are used to classify and measure selected objects (Brosnan, 2002). The process of image analysis depends on the selected parameter of object which is the subject of interest (Lukáš, 2008).

Johnston (2000) states that using the colours as a descriptors can be the structure of the meat product successfully evaluate. Verifying the applicability of image analysis for analysis of fat in meat and carcasses were also examined by the authors McDonald and Chen (1990), Gerrard et al. (1996), and Chmiel Dasiewicz (2009), and Chmiel et al. (2011). Image analysis was also an effective tool for evaluating fresh pork colour, for poultry classification, practical for beef grading, classify beef carcass in the slaughter industry (Cheng-Jin Du, 2006). Stien, (2007) states using image analysis for sorting salmon fillets by quality could involve quantifying characteristics such as fat content, shape and colour. Texture is a rich source of visual information and is a key component in image analysis (Nektarios, 2010).

The aim of this study is to introduce the development and implementation of this method in practical use in the evaluation of food of animal origin. Practical use of image analysis and the results are demonstrated on the assessment of structure mosaic dry fermented meat products Poličan. There was monitored the fact, if is it possible by this method distinguish two different production technologies for dry fermented meat products Poličan. The size of fat part in the picture was used as a criteria for assessing the structure of mosaic dry fermented meat products Poličan.

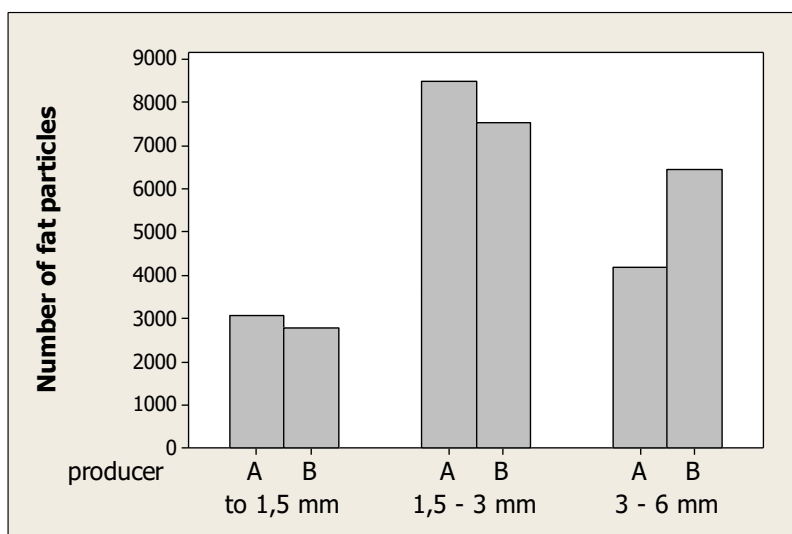
### Materials and Methods

The subject of the evaluation were two groups of products dry fermented meat products Poličan which were bought in the supermarket. In the first group (group A), the products were produced with the technology of bowl cutter, in the second group (group B) were products produced using meat cutting head with stuffer. Since each producer were evaluated 3 batches. Samples for the analysis structure of the mosaic were sliced in the circular shape and converted into digital form using a Canon EOS 450D with constant light intensity 1060 lx (lux). The digital images of Poličan were processed and analyzed by the program Adaptive Contrast Control Structure and Object Analyser version 6.1 (ACC Sofo, 2002). Image analysis included reducing the image size from 100 % to 50%. Median filter was used for better distinguish the boundaries of the fat particles since background of image. The image segmentation labeled fatty part of the picture and after segmentation was made a mathematical decomposition of conjunct objects.

Adaptive Contrast Control Program Structure and Object Analyser version 6.1 (ACC Sofo, 2002) counted size of the fat parts. The sizes of fat particles were divided into three categories: category 1 (up to 1,5 mm), category 2 (1,5 - 3 mm) and category 3 (3-6 mm). The results were processed in Minitab. For statistical evaluation was used Mann-Whitney test for the detection of the difference between the applied technology by producers.

### Results and Discussion

Important fact in the production of dry fermented meat products Poličan is size of the fat particles in the range 1,5 - 3 mm. For this purpose was calculated coefficient FS (fat size), which can determine whether exist the difference between the manufacturers in this category. FS coefficient was calculated based from the total number of fat particles for each category. The division into categories and the total number of fat particles is shown below in Graph 1.



Graph 1: Total number of fat particles for the producers.



Based on the FS coefficient was detected statistically significant difference between producers ( $p < 0,05$ ). Using image analysis was possible to distinguish from one another two different technologies. The criterion of the size of the fat particles were chosen with regard to the structure of the mosaic, where is this size very advisable.

### Conlusions

As part of this work has been used image analysis in order to determine whether can be used image analysis to assess the production technology dry fermented meat product Poličan.

For this purpose were selected samples which representing two different technologies for the finalisation the mosaic dry fermented meat product Poličan (technology of bowl cutter and cutting head with stuffer). In this study was created FS (fat size coefficient) that takes into account the size of the fat particles of 1,5 - 3 mm, which is a desirable for high quality of mosaic. This coefficient was used to assess these two technologies. Using Mann-Whitney test was determined statistically significant difference between the products of groups A and B. Using image analysis was verified for further study in this topic.

### References

BROSNAN, T., SUN, DW. Inspection and grading of agricultural and food products by computer vision system a review. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2002, vol. 36, p. 193-213.

GERRARD, D.E.,GAO, X., TAN, J. Beef marbling and colour score determination by image processing. *Journal of Food Science*, 1996, vol. 61, p. 145–148.

CHENG – JIN, D., SUN, DW. Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *Journal of Food Engineering*, 2006, vol. 72, p. 39–55.

CHMIEL, M., DASIEWICZ, K. The use of digital image analysis to estimate fat content in beef trimmings. *Technological Progress in Food Processing*, 2009, vol. 19. no. 34, p. 61-64.

CHMIEL,M., SLOWINSKI, M., DASIEWICZ K. Application of computer vision systems for estimation of fat content in poultry meat. 2011, *Food Control*, vol. 22, p. 1424-1427.

INGR, I., POKORNÝ, J., VALENTOVÁ, H. . *Senzorická analýza potravin*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1997, vol. 201, p. 78, 87.

JOHSTON, IA., ALDERSON, R., SANDHAM, C., DINGWALL, A., MITCHELL, D., SELKIRK, C., NICKELL, D., BAKER, R., ROBERTSON, B., WHYTE, D., SPRINGATE, J. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Aquaculture*, 2000, vol. 189, no. 3–4, p. 335–349.

LUKÁŠ, J. *et al. Výzkumný ústav rostlinné výroby: Metodika pro útvary státní správy*. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, 2008.

MCDONALD, T., CHEN, Y.R. Separating connected muscle tissues in images of beef carcass ribeyes Transactions of the ASAE, 1990, vol. 33, p. 2059–2065.

NEKTARIOS, AV., SUN, DW., ALLEN, P., MENDOZA, F. The use of lacunarity for visual texture characterization of pre-sliced cooked pork ham surface intensities. *Food Research International*, 2010, vol. 43, p. 387–395.

STIEN, LH., KIESSLING, A., MANNE, F. Rapid estimation of fat content in salmon fillets by colour image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, vol. 20, p. 73–79.

SUN, CJ. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends Food Sci*, 2004, vol. 15 (5), p. 230 – 249.

**Contact address:** Petra Čáslavková, Mgr., Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, petra.caslavkova@seznam.cz.

# SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat  
a hygiena vegetábilí*



## **Zastoupení skupin mastných kyselin v celých tělech bažantů v průběhu jejich růstu**

### **Presence of fatty acid groups in whole bodies of pheasants in the course of their growth**

**Jakešová Petra, Zapletal David**

*Ústav zootechniky a zoohygieny, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

#### **Summary**

*The objective of our work was to evaluate the effect of the age of pheasant chicks (*Phasianus colchicus*) on contents of groups of fatty acids in whole pheasant bodies fattened up to the age of 118 days. In the course of the experiment, the required number of pheasants was randomly selected for analysis in regular 10-day intervals. After one-day fasting, pheasants were stunned and thereafter their whole bodies were homogenized. Samples were analyzed for the content of fatty acids using a gas chromatograph GC 2010. The age of pheasant chicks had a significant effect on the content of fatty acids. Significant changes in the proportion of fatty acid groups were recorded mainly at 20, 40 and 60 days of age. By 20 days of age the proportion of monounsaturated fatty acids decreased considerably in relation to the increase in polyunsaturated fatty acids content. From day 40, the monounsaturated fatty acids content increased gradually till the end of fattening, whereas the reverse trend occurred in the saturated fatty acids content in this period.*

**Keywords:** pheasants; fatty acids; intensive rearing; 10-day period

#### **Úvod**

Maso volně žijících zvířat je vhodným zdrojem bílkovin, mastných kyselin (FA), vitamínů a stopových prvků (Nuernberg et al. 2009). Bažantí maso představuje, zejména díky vysokému obsahu některých proteinů a nízkému obsahu tuku s vyšším zastoupením esenciálních mastných kyselin, velmi ceněnou potravinu, která díky své nutriční hodnotě předčí i maso brojlerových kuřat (Straková et al. 2006). Problematikou vlivu věku na stravitelnost mastných kyselin u brojlerových kuřat se zabývali Zelenka et al. (2003). Tito autoři došli k závěru, že vlastní věk kuřat hrál velmi vysoce průkaznou roli ve stravitelnosti nasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a také polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Obsahem FA se také zabývali Poureslami et al. (2010). Tito autoři zjistili, že vliv věku na zastoupení mastných kyselin u brojlerových kuřat byl nepatrný. Cíleným hodnocením obsahu FA v těle bažantů v průběhu růstu se však doposud v dostupné literatuře nikdo exaktně nezabýval.

Proto cílem naší práce bylo zhodnotit vliv věku bažantích kuřat na zastoupení skupin FA v celých tělech bažantů vykrmovaných do věku 118 dnů.

#### **Materiál a metody**

Pokus probíhal v akreditované experimentální stáji Ústavu výživy zvířat a Ústavu zootechniky a zoohygieny FVHE VFU Brno, kde byla bažantí kuřata ustájena na hluboké podestýlce s kontrolovaným režimem prostředí. V experimentu bylo použito 232 kuřat bažanta obecného (*Phasianus colchicus*). Bažanti byli umístěni do ustájovacích boxů (plocha 7 m<sup>2</sup>), ve kterých byly po dobu prvních 14 dnů umístěny ochranné kruhy. Teplotní režim byl na začátku experimentu 31 °C, postupně docházelo ke snižování teploty o 2 °C týdně až na teplotu 21 °C. Světelný režim byl po celou dobu výkrmu neměnný - 23 hodin světla a 1 hodina tmy. V průběhu celého výkrmu byla bažantům podávána *ad libitum* voda a krmné

směsi. Celkem byly použity 3 kompletní krmné směsi (KS), a to kompletní krmná směs KSs do 15. dne věku, KSg do 30. dne věku a KSf do konce výkrmu (118. den).

V průběhu experimentu byl v desetidenních intervalech (1., 10., 20., 31., 40., 49., 60., 70., 80., 90., 101., 110. a 118. den věku) náhodně vybrán požadovaný počet bažantů. V rámci odběru č. 1 až 4, bylo z celkového počtu bažantů kuřat získáno vždy 5 vzorků k analýzám. Konkrétně bylo použito u 1. odběru (1. den věku) 75 kuřat, u 2. odběru (10. den věku) 40 kuřat, u 3. odběru (20. den věku) 25 kuřat a u 4. odběru (31. den věku) 10 kuřat. V 5. odběru (40. den věku) bylo použito 10 bažantů po 1 individuálním vzorku. Od 6. odběru (49. den věku) pak došlo k získání 9 individuálních vzorků.

Po jednodenním vyláčení byli bažanti omráčeni úderem do hlavy a usmrceni vykrcením. Následně byla celá těla bažantů včetně peří, kůže, vnitřností, kostí a krve homogenizována. Tuk byl před vlastní analýzou vyextrahován ze vzorku pomocí rozpouštědla. Poté byla provedena transesterifikace FA ve vzorku. FA byly převedeny na methylestery a byly stanoveny na plynovém chromatografu GC-2010. Jako mobilní fáze byl použit nosný plyn He<sub>2</sub> a stacionární fází byl polyethylenglykol. Hodnoty byly přepočítány na obsah FA ve vzorku v %.

## Výsledky a diskuze

Vliv věku na zastoupení skupin FA v celých tělech bažantů je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Průměrný obsah jednotlivých skupin FA v celém těle bažantů s ohledem na jejich věk (%).

Skupina	Věk (dny)													P
	1	10	20	31	40	49	60	70	80	90	101	110	118	
SFA	35,81	34,13	39,67	36,12	37,89	36,96	32,66	32,65	32,21	31,39	33,12	32,89	34,09	**
MUFA	50,97	36,41	21,57	36,84	35,50	34,43	37,39	38,59	41,10	42,75	45,05	45,45	45,77	**
PUFA	13,20	29,49	38,76	27,05	26,61	28,61	29,95	28,76	26,69	25,86	21,83	21,66	20,13	**
PUFA/SFA	0,37	0,86	0,98	0,75	0,70	0,78	0,92	0,88	0,83	0,83	0,66	0,66	0,59	**
n6	12,38	25,98	31,70	24,56	24,35	25,94	26,30	25,64	23,77	22,95	19,47	19,20	17,92	**
n3	0,82	3,51	7,06	2,49	2,27	2,68	3,65	3,12	2,92	2,90	2,36	2,46	2,21	**
n6/n3	15,20	7,44	4,50	9,90	10,83	10,06	7,36	8,30	8,19	7,92	8,25	7,81	8,13	**

\*\* :  $P < 0,01$ .

Z výsledků naší práce je patrné, že významné změny v zastoupení skupin FA byly zaznamenány ve 20., 40. a 60. dni věku bažantů kuřat. Do 20. dne věku se podíl MUFA výrazně snížil, což současně souviselo s výrazným zvýšením obsahu PUFA, přičemž velmi výrazně se pak snížil poměr n6/n3. Mimoto, obsah SFA se zvýšil pouze nepatrně a od 20. do 40. dne byl pak téměř vyrovnaný. U obsahu MUFA došlo oproti předchozímu období ke zvýšení, což naopak vyvolalo snížení zastoupení PUFA s tím, že poměr n6/n3 se výrazně zvýšil. Od 40. dne se obsah MUFA postupně zvyšoval až do konce výkrmu, přičemž opačný trend nastal v zastoupení SFA (s výjimkou v 118. dnu). V případě obsahu PUFA, došlo k zvýšení jejího obsahu od 40. do 60. dne, s následným neustálým pozvolným poklesem až ke konci výkrmu. Poměr n6/n3 pak mírně klesal k 60. dni a poté se již výrazně neměnil. Komprda et al. (2002) hodnotili vliv věku na obsah FA v krutím mase v období od 70. do

175. dne věku. Tito autoři zjistili, že vlivem věku se obsah MUFA zvýšil a naopak obsah PUFA snížil, což koresponduje s výsledky našeho experimentu. Podobně Poureslami et al. (2010) uvádějí, že s věkem se snižoval obsah n3 a n6 PUFA v různých částech těla brojlerových kuřat. Na druhou stranu, Baeza et al. (2000) zjistili, že věk neměl vliv na obsah SFA a MUFA v kachním mase do 90. dne věku. Hodnocením stravitelnosti FA při výkrmu brojlerových kuřat do 42. dne věku se zabývali Zelenka et al. (2003). Tito autoři zjistili, že stravitelnosti všech SFA a MUFA (s výjimkou C20:1 n-9) se průkazně snižovaly od 9. do 42. dne života, přičemž stravitelnost PUFA byla v tomto období vyšší než u SFA i MUFA. Tato zjištění do jisté míry korespondují s našimi výsledky obsahu FA do 20. dne věku bažantích kuřat.

### **Závěr**

Věk bažantích kuřat měl signifikantní vliv na obsah všech FA. Z výsledků naší studie je zřejmé, že významné změny v zastoupení skupin FA byly zaznamenány ve 20., 40. a 60. dni věku bažantích kuřat. Do 20. dne věku se podíl MUFA výrazně snížil, což současně souviselo s výrazným zvýšením obsahu PUFA. U obsahu MUFA došlo oproti předchozímu období ke zvýšení, což naopak vyvolalo snížení zastoupení PUFA. Od 40. dne se obsah MUFA postupně zvyšoval až do konce výkrmu, když opačný trend nastal v zastoupení SFA. Výsledky ukazují na rozdílnou schopnost bažantů využívat FA během jejich růstu.

### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno 31/2013/FVHE.

### **Literatura**

BAEZA, E.; SALICHON, M. R.; MARCHE, G.; WACRENIER, N.; DOMINGUEZ, B.; CULIOLI, J. Effects of age and sex on the structural, chemical and technological characteristics of mule duck meat. *British Poultry Science*. 2000, vol. 41, s. 300-307.

KOMPRDA, T.; ŠARMANOVÁ, I.; ZELENKA, J.; BAKAJ, P.; FIALOVÁ, M.; FAJMONOVÁ, E. Effect of sex and age on cholesterol and fatty acid content in turkey meat. *Archiv für Geflügelkunde*. 2002, vol. 66, no. 6, s. 263-273.

NUERNBERG, K.; NUMBERG, G.; DANNENBERGER, D. Nutrient and lipid composition of muscle in wild animals. *Fleischwirtschaft*, 2009, vol. 89, s. 99-102.

POURESLAMI, R.; RAES, K.; HUYGHEBAERT, G.; DE SMET, S. Effects of diet, age and gender on the polyunsaturated fatty acid composition of broiler anatomical compartments. *British Poultry science*. 2010, vol. 51, no. 1, s. 81-91.

STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P., VITULA, F., VEČEREK, V. Differences in the amino acid composition of muscles from pheasant and broiler chickens. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal Breeding*, 2006, vol. 49, s. 508-514.

ZELENKA, J.; FAJMONOVÁ, E.; KLADROBA, D. Effect of age on digestibility of fatty acids in chickens. *Czech Journal of Animal Science*. 2003, vol. 48, no. 8, s. 315-320.

**Kontaktní adresa:** Petra Jakešová, Mgr., Ústav zootechniky a zoohygieny, FHVE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, jakesovap@vfu.cz.

# **SEKCE 3**

*Veterinární ekologie*





## 17 $\beta$ -estradiolem modifikované liposomy jako nanotransportér pro antisense terapii ER+ rakoviny prsu – *in vitro* studie s MCF-7 nádorovou linií

### 17 $\beta$ -estradiol doped liposomes as novel delivery system for antisense therapy of ER+ breast cancer – *in vitro* study on MCF-7 cell line

<sup>1,2</sup>Heger Zbyněk, <sup>2,3</sup>Masařík Michal, <sup>2</sup>Beklová Miroslava, <sup>1,2</sup>Zitka Ondřej,  
<sup>2</sup>Adam Vojtěch, <sup>2</sup>Kizek René

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut, Brno

<sup>3</sup>Fakulta medicíny, Masarykova univerzita, Brno

#### Summary

The present study shows the proposal and application of delivery system for antisense oligonucleotides against mRNA encoding estrogen receptor proteins  $\alpha$  and  $\beta$ . The delivery system composed of cationic liposome envelope carries 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) in its structure. Using MCF-7 cells, it was revealed that the treatment with liposomes may decrease MCF-7 proliferation. Using qRT-PCR it was shown that *MT1A*, *Nf- $\kappa$ B1*, *K-ras*, but not *TFF1* genes may be down-regulated using  $E_2$ -based liposomes. Further indicators of oxidative stress (metallothionein, glutathione, malondialdehyde) were determined to obtain the information about treatment efficiency. Based on obtained data, we suggest that  $E_2$ -based liposomes offer sufficient transfer efficiency (concentrations of ASOs 1; and 10  $\mu$ M), and, moreover, due to affection of *Nf- $\kappa$ B1*, *MT* and *GSH* the tumorous cells can be chemosensitized to increase the treatment success rates.

**Keywords:** estrogen receptor; glutathione; liposome; delivery; malondialdehyde; metallothionein

#### Úvod

Častá resistance nádorových buněk či vysoká toxicita léčiv, rapidně snižující jejich terapeutický index vede k hledání dalších potencionálních zbraní, efektivních v léčbě maligních tumorů [1]. Antisense oligonukleotidy (ASOs) down-regulují expresi cílové molekuly tvorbou duplexu s její kódující mRNA. Ačkoliv ASOs vykazují velký aplikační potenciál, hlavní problém nastává při jejich transportu. ASOs jsou snadno degradovány všudypřítomnými nukleázami a jejich fyzikálně-chemická povaha znesnadňuje průchod membránami [2]. Tato studie zaměřena na syntézu a aplikaci kationických liposomů, nesoucích 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) ve své lipidové dvojvrstvě. Liposomy obsahovaly antisense sekvence proti transkripčním faktorům 17 $\beta$ -estradiolu - estrogen receptoru  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) a  $\beta$  (ER $\beta$ ). Pro pozorování vlivu ASOs na proliferaci, genovou expresi a genezi indikátorů oxidačního stresu byla zvolena buněčná linie MCF-7.

#### Materiál a metody

##### *Antisense oligonukleotidy*

Ve studii byly použity ASOs (ER $\alpha$ : 5'- GACCATGACCATGACCCT-3'; ER $\beta$ : 5'- TGTGCCTGGCTAGAGATC-3'), pořízeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

##### *Syntéza liposomů*

100 mg cholesterolu, 100 mg sodné soli 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-rac-(1-glycerolu) a 100 mg fosfatidylcholinu bylo rozpuštěno v 4.5 ml chloroformu. Po odpaření chloroformu se vytvořil tenký lipidový povlak. Pro enkapsulaci byly použity 2 ml směsi 17 $\beta$ -estradiolu (7 pg.ml<sup>-1</sup>) a ASOs (1  $\mu$ M). Po homogenizaci a zahřátí byly vzorky filtrovány v Britton-Robinsonově pufru (pH = 10) pomocí Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA, USA).

### Izolace RNA a qRT-PCR genů *MT1A*, *K-Ras*, *Nf-κB1* a *TFF1*

Pro izolaci RNA byl použit High pure total-RNA isolation kit (Roche, Basel Switzerland). Transkripce RNA (600 ng) byla provedena pomocí cDNA synthesis kitu (Roche, Basel, Switzerland). Připravená cDNA 20 μl byla analyzována na LightCycler 480 real-time PCR (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Pro q-PCR byly vybrány geny *MT1A*, *K-Ras*, *Nf-κB1* a *TFF1*. Pro standardizaci byl determinován také gen pro *β-actin*.

### Proliferační analýza (real-time cell-based assay)

Real-time cell-based assay xCELLigence (Roche and ACEA, San Diego, CA, USA) byl použit pro evaluaci antiproliferačních účinků ASOs v liposomech. Impedanční experimenty probíhaly 65 hodin a výsledky byly vyjádřeny jako životaschopnost MCF-7 buněk v čase.

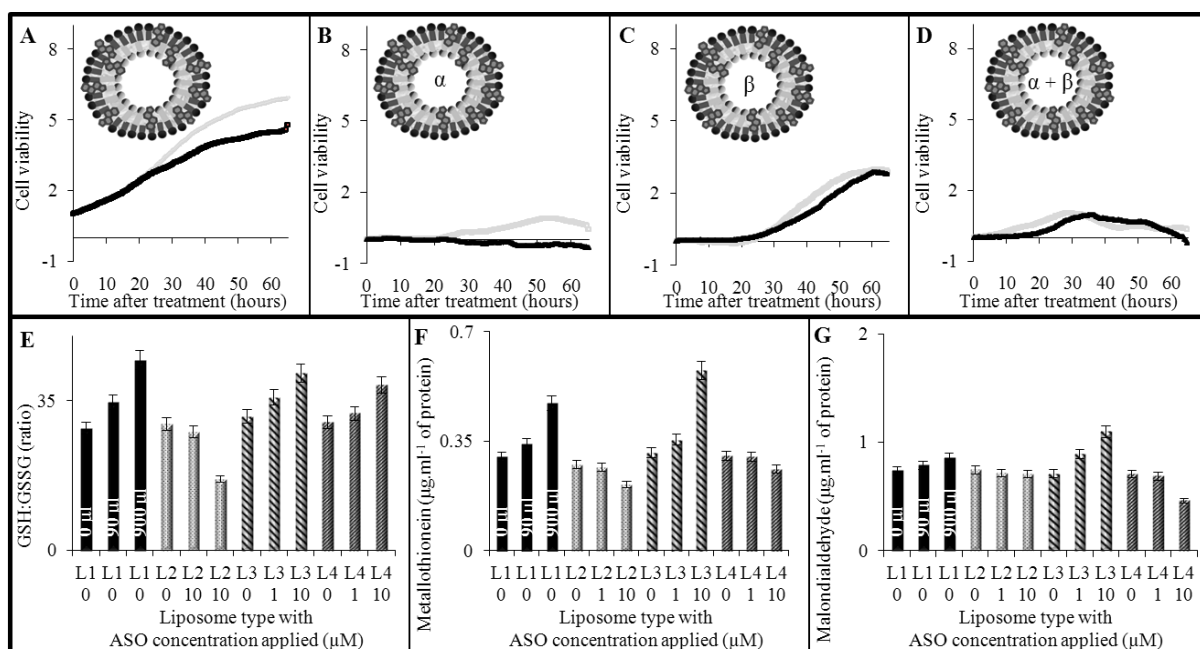
### Analýza indikátorů oxidativního stresu

Oxidativní stres byl determinován v MCF-7 buňkách po aplikaci liposomů. Analyzován byl metalothionein pomocí diferenční pulzní voltametrie (Metrohm, Herissau, Switzerland), malondialdehyd pomocí spektrofotometru BS-400 (Mindray, Shenzhen, China) a také glutathiony (oxidovaný a redukovaný) pomocí HPLC-ED (ESA, Chelmsford, MA, USA).

## Výsledky

### Antiproliferační účinky ASOs v liposomech

Jak lze vidět na Obrázku 1A kontrolní liposom, neobsahující ASOs způsoboval zvýšení proliferace MCF-7, a to díky přítomnosti E<sub>2</sub> v lipidovém obalu. Nejvyšší antiproliferační efekt byl pozorován u ASOs proti ERα (Obr. 1B). ASOs proti ERβ neměli žádný efekt (Obr. 1C). Směs (0.5 + 0.5 μM a 5 + 5 μM) obou a ASOs překvapivě způsobil snížení proliferací vlastností MCF-7.



Obrázek 1: Efekt ASOs (1 μM – šedá křivka, 10 μM – černá křivka) enkapsulovaných v liposomech na MCF-7, vyjádřený jako antiproliferační efekt (A) liposomů bez ASOs (L1); (B) liposomů s ASOs ERα (L2); (C) s ASOs Erβ (L3) a (D) s ERα i β (L4). Vyjádření efektu ASOs na (E) poměr glutathionů, (F) na hladinu metalothioneinu a (G) na hladinu malondialdehydu. Číslo uvedené pod typem liposomu vyjadřuje koncentraci RNA obsažené v transportéru. U L1 žádná RNA obsažena není, proto byl použit adekvátní objem liposomů (0; 90; 900 μl), standardizován na obsah E<sub>2</sub> v membráně.

*Efekt antisense terapie na hladinu indikátorů oxidativního stresu*

V souladu s výsledky antiproliferační aktivity, nejvyšší efekt byl pozorován u liposomu L2 (ASOs ER $\alpha$ ). Jak lze vidět, liposomy L2 způsobovaly pokles poměru GSH:GSSG (Obr. 1E), pokles hladiny metalothioneinu (Obr. 1F), v závislosti na dávce ASOs (10  $\mu$ M ASOs způsobila pokles hladiny metalothioneinu o 0.95  $\mu$ g na 1 ml celkového proteinu). Dále byl také pozorován pozitivní efekt na hladinu malondialdehydu (Obr. 1G). Liposom L1, stejně tak jako liposom L3 působil spíše jako iniciátor vzniku oxidativního stresu. Aplikace liposomu L4 vykazovala klesající trend při analýze metalothioneinu (Obr. 1F) a malondialdehydu (Obr. 1G). Na poměr glutathionů neměla aplikace L4 pozitivní vliv.

*Efekt antisense terapie na genovou expresi*

Genová exprese kvantitativně potvrdila pozitivní efekt liposomu L2 (ASOs ER $\alpha$ ), kde se zvyšující se koncentrací byl zaznamenán pokles všech genů (*MT1A*, *Nf- $\kappa$ B1*, *K-ras*), kromě *TFF1*. Po použití L2 (ASOs ER $\beta$ ) byla pozorována over-exprese všech genů, stejně jako při aplikaci kontrolního liposomu L1. Liposom L4 měl jen malý efekt na regulaci vybraných genů.

**Diskuze**

Aplikace liposomů bez ASOs (L1) způsobuje jak nárůst proliferace, zvýšení oxidativního stresu, tak nežádoucí over-expresi protoonkogenů a transkripčních faktorů. Tento jev je způsoben samotnou přítomností E<sub>2</sub>, který jako ligand ER proteinů spouští jejich aktivitu [3]. Bylo ukázáno, že přítomnost E<sub>2</sub> zefektivňuje vstup ASOs do buněk pravděpodobně interakcí s membránou, čímž jsou narušeny její vlastnosti. Navíc bylo ukázáno, že ASOs ER $\alpha$  mají velký potenciál působit antiproliferativně, snižovat expresi genů i hladinu oxidačního stresu. Role proteinů ER $\beta$  v rozvoji rakoviny je stále ještě otázkou. Ukazuje se, že tyto proteiny jsou pravděpodobně důležité signální molekuly inhibující proliferaci a spouštějící apoptózu. Naše výsledky blokace ER $\beta$  ukazují, že tvorba duplexu s jejich mRNA vede ke zvýšení proliferace, exprese genů a tvorby oxidačního stresu. Proto lze říct, že hladina ER $\beta$  je pro regulaci nádorových dějů zásadní a inhibice je nutná jen v případě ER $\alpha$ . Dalším benefitem plynoucím z aplikace ASOs ER $\alpha$  je, že jsou schopny chemosensitizovat nádor díky snížení hladiny GSH, metalothioneinu a genu *Nf- $\kappa$ B1*, tvořící resistenci proti cytostatikům.

**Závěr**

Námi připravené liposomy mohou sloužit jako vhodný transportérový systém, využitelný pro antisense aplikace. Z výsledků vyplývá, že transfekce probíhá u nízkých koncentrací ASOs. Navíc byla námi navržena sekvence (ASOs ER $\alpha$ ), která vykazuje velmi pozitivní efekt na buněčnou linii MCF-7.

**Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 4/2013/FVHE.

**Literatura**

- [1] HEGER, Z.; CERNEI, Z.; KUDR, J.; GUMULEC, J.; BLAZKOVA, I.; ZITKA, O.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. A Novel Insight into the Cardiotoxicity of Antineoplastic Drug Doxorubicin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, vol. 14, no. 11, s. 21629-21646.
- [2] SKOBLOV, M. Y. Prospects of antisense therapy technologies. *Molecular Biology*. 2009, vol. 43, no. 6, s. 917-929.
- [3] LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004, vol. 83, no. 3, s. 249-289.

**Kontaktní adresa:** Zbyněk Heger, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42, Brno, heger@mendelu.cz.

## Wastewater as source of musk fragrances

<sup>1</sup>Komárková Petra, <sup>1,2</sup>Vávrová Milada

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno

### Summary

*This study was focused on determination of selected musk compounds in real samples of wastewater (influent and effluent) from wastewater treatment plant (WWTP) Brno-Modřice (Czech Republic). Four representatives of linear musk compounds (dihydromyrcenol, cyclohexylethylacetate, arofir, cyclacet/jasmocyclen) were selected for the monitoring. At first, optimization of selected method was performed and then this method was used for the determination. Analytes were isolated from samples by solid-phase microextraction (SPME). The identification and quantification of analytes was carried out by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS).*

**Keywords:** musk compounds; wastewater; SPME; GC-MS

### Introduction

Musk compounds, as a new type of emerging contaminants, are widely used as fragrance additives in a vast array of scented consumer products, including perfumes, lotions, soaps, shampoos, deodorants, air fresheners and cleaning products. After usage, about 77 % of synthetic musks are drained into the sewer system and followed enter the wastewater treatment plants (WWTPs). Without complete removal, the synthetic musk compounds in WWTPs contaminate the environment with the discharge of effluents into lakes and rivers (Hu et al., 2011).

In wastewater treatment processes, sorption and biodegradation play a considerable role in the removal of synthetic musk compounds. The reported removal efficiencies are in range from 50 to 90 %, because the synthetic musk compounds concentrations can vary widely, depending on the size of the treatment plant, the size of the population served, the types of waste (domestic, industrial, commercial) and the treatment methods employed (Lee et al., 2010).

Due to their extensive use, musk compounds have become ubiquitous in the environment, and they are prevalent in surface water, raw sewage, sewage effluents, sludge, suspended particulate matter and sediment. Synthetic musks have also been measured in biota living in contaminated aquatic environment (Shek et al., 2008). Synthetic musks are lipophilic, persistent chemicals, bioaccumulate in the aquatic environment and can be detected (in low concentrations) in indoor air and dust. Synthetic musks are found in human adipose tissue, breast milk and blood (Hutter et al., 2009).

### Material and Methods

For this study four musk compounds belong to the group of linear musk compounds were chosen: dihydromyrcenol, cyclohexylethylacetate, arofir, cyclacet/jasmocyclen.

Concentrations of selected musk compounds were measured in the influent and effluent of wastewater treatment plant Brno-Modřice. Real wastewater samples were taken in September 2013. Each sample was obtained as a mixed 24 hour sample. In total, 10 mixed samples from the influent and 10 mixed samples from the effluent were analysed.

The SPME fibres used were coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) at 65 µm film thickness and housed in manual holder. Vials of total volume 22 mL were used for SPME extraction, in each always 3 g of NaCl were placed in advance and 14 mL

of undiluted and non-filtered sample of wastewater were added afterwards. A head-space (HS-SPME) mode was used for extraction. Samples were immersed into the water bath at 65 °C for 5 min to equilibrate before SPME insertion. The samples were maintained under controlled agitation with an electromagnetic stirrer (900 rpm). Vapour adsorption time was 30 min. After the exposure time, the fibre was inserted into the GC injector for analysis. For quantification, the standard addition method was used.

GC conditions were as follows: injector in splitless mode at 250 °C; constant flow rate of carrier gas (He) 0.8 mL.min<sup>-1</sup>, oven temperature program: 3 min at 50 °C, first ramp 15 °C.min<sup>-1</sup> to 110 °C, second ramp 5 °C.min<sup>-1</sup> to 165 °C, 9 min at 165 °C, third ramp 30 °C.min<sup>-1</sup> to 280 °C, 1 min at 280 °C. The total analysis time for one GC run was 32 min. The ion source and quadrupole temperatures were kept at 230 °C and 150 °C respectively. Quantification was carried out under following conditions: electron ionisation at 70 eV, selected ion monitoring mode: m/z 59 (123) for dihydromyrcenol, m/z 81 (110) for cyclohexylethylacetate, m/z 71 (183) for arofir, m/z 66 (192) for cyclacet/jasmocyclen.

### Results and Discussion

In the first phase of the study, analytical procedure for determination of linear musk compounds in wastewater samples was optimized. Repeatability of the used method was calculated for individual musk compounds and expressed as a relative standard deviation (RSD). The values of RSD, LOD and LOQ for all monitored analytes are shown in Table 1.

Table 1: Characterization of SPME method coupled with GC-MS.

Analyte	RSD [%]	LOD [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]
Dihydromyrcenol	2.28	0.0018	0.0061
Cyclohexylethylacetate	1.69	0.0004	0.0014
Arofir	2.50	0.0005	0.0018
Cyclacet/Jasmocyclen	9.57	0.0002	0.0008

All four target analytes were found in the influent and also in the effluent from WWTP Brno-Modřice. Dihydromyrcenol showed the highest concentrations in the influent, 174.6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  on average.

Table 2: Minimum and maximum values of concentrations of the studied musk compounds.

Analyte	Influent [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]		Effluent [ $\mu\text{g.L}^{-1}$ ]	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Dihydromyrcenol	63.16	312.0	0.051	0.102
Cyclohexylethylacetate	0.035	0.205	0.007	0.022
Arofir	0.221	1.848	0.025	0.043
Cyclacet/Jasmocyclen	0.136	0.501	0.018	0.118

Ratio of particular analyte concentrations at sewage treatment plant effluent and influent determine the removal efficiency of this compound during wastewater cleaning process. Satisfactory removal efficiencies of linear musks (from 70.09 to 99.94 %) could be due

to the good biodegradability of these compounds. For that reason, we can claim that linear musk compounds will continue to replace more problematic nitro and polycyclic musk compounds significantly.

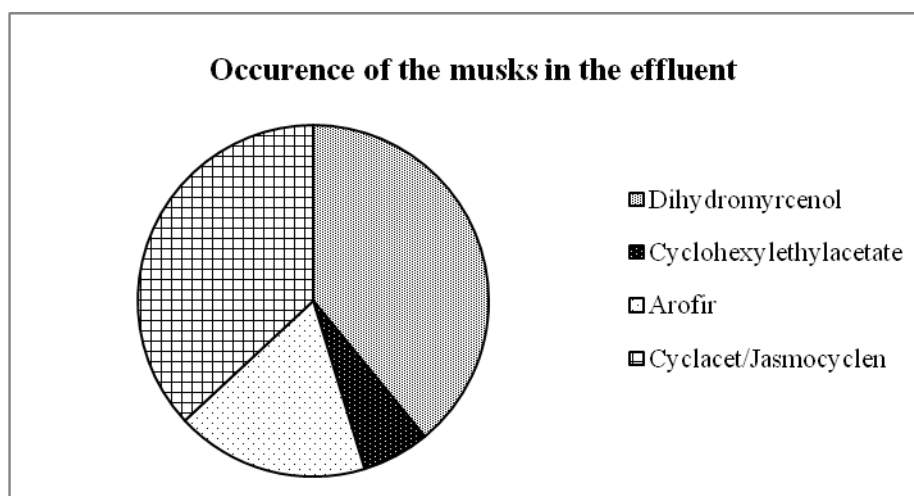


Figure 1: Proportional representation of studied linear musk compounds in the effluent from WWTP Brno-Modřice.

### Conclusion

In this study, we evaluated the influence of the WWTP Brno-Modřice on water ecosystem. We were focused on linear musk compounds which belong to relatively new persistent organic pollutants. This study confirms that SPME coupled with GC-MS system is a very sensitive method which can determine the presence of musks in wastewater at very low concentration levels. The values of the overall removal efficiencies of synthetic musks from the wastewater in the WWTP show that effluent from WWTP is the primary source of musk compounds in the environment.

### Acknowledgements

The study was prepared with the financial support of the project IGA VFU Brno No. 21/2013/FVHE.

### References

- HU, Z.; SHI, Y.; CAI, Y. Concentrations, distribution and bioaccumulation of synthetic musks in the Haihe River of China. *Chemosphere*. 2011, vol. 84, pp. 1630-1635.
- HUTTER, H. P.; WALLNER, P.; MOSHAMMER, H.; HARTL, W.; SATTELBERGER, R.; LORBEER, G.; KUNDI, M. Synthetic musks in blood of healthy young adults: Relationship to cosmetics use. *Science of the Total Environment*. 2009, vol. 407, pp. 4821-4825.
- LEE, I. S.; LEE, S. H.; OH, J. E. Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Research*. 2010, vol. 44, pp. 214-222.
- SHEK, W. M.; MURPHY, M. B.; LAM, J. C. W.; LAM, P. K. S. Polycyclic musks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) from Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. 2008, vol. 57, pp. 373-380.

**Contact address:** Petra Komárková, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H11470@vfu.cz.

## Occurrence of selected bisphenols in surface water

<sup>1</sup>Tesařová Simona, <sup>1,2</sup>Vávrová Milada, <sup>1</sup>Charvátová Michaela

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Brno University of Technology

### Summary

*Bisphenols are frequently monitored residues of polycarbonate plastics and epoxide resins not only in the environment. The most observed representative of this group is bisphenol A (BPA). These substances are monitored worldwide in various environmental compartments, especially in aquatic. The study follows the previous work was focused on the optimization of direct solid phase microextraction (SPME) as isolation methods for the determination of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F by using gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and application of this method for analysis of selected bisphenols in surface water. Three methods with specific conditions separately for each analyte were optimized. Samples collected from selected rivers and smaller watercourses in the Czech Republic were subsequently analysed by using of optimized methods.*

**Keywords:** bisphenol A; bisphenol A diglycidyl ether; bisphenol F; solid phase microextraction; gas chromatography; mass spectrometry

### Introduction

Bisphenols belongs to the hydroxy group of phenols. Bisphenols are used to the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins therefore belong to the significant residues of these materials in the environment. These substances are monitored worldwide in various parts of the environment, especially in water. Among the most frequently observed bisphenols we can include bisphenol A, bisphenol F and their derivatives, and currently also bisphenol S (Liao et al., 2012).

Bisphenol A has been found in a range of objects that we are constantly surrounded in everyday life. Bisphenol A is content of polycarbonate plastics, so we can encounter it in many products such as plastic car interiors, plastic dish for food storage, in baby bottles in past and many other plastic products. It is also used in epoxy resins as an antioxidant, so it can be found on the surface layers of cans. According to the results of many studies that have shown carcinogenic, mutagenic and endocrine effects of this substance, as well as the legislative restrictions BPA began to be replaced by like substances such as bisphenol F and bisphenol S. These analytes are getting into the environment from all of these materials and the most affected environmental components are surface waters (Ji et al., 2013, Liao et al., 2012, Murray et al., 2007, Vandenberg et al., 2007).

The aim of this work was optimize isolation method using direct solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F. These optimized methods were validated and subsequently used for the determination of selected analytes in rivers and smaller watercourses at different locations in the Czech Republic.

### Material and Methods

The study was focused on the optimization of individual SPME isolation methods for the determination of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol A diglycidyl ether using GC-MS and application of this method on analysis of selected bisphenols in surface waters in the Czech Republic. In order to achieve an overall monitoring, 27 samples from surface flows in

several cities and towns were collected from the whole country. Overview of samples and observed concentration of selected analytes in these samples are listed in Table 1.

It has been shown from previous work that each of bisphenols had variable response to various parameters, therefore the SPME such isolation method chosen for subsequent analysis by GC-MS has been optimized for each of the selected analytes. In total, three methods were optimized. SPME has been always carried out under the same conditions, see previous work (Tesařová, 2011). Following effects were monitored: type of fiber, mixing the sample before sorption and during the sorption, actual mixing time, time of sorption, heating of the sample, pH adjustment, addition of NaCl and derivatization.

Two standard solutions with concentration of 10 µg/ml and 100 µg/ml were prepared for analysis of selected analytes in surface water. From the standard solutions were prepared buffer solutions for BPA, BPF and BADGE in the following concentrations: 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 381 ng/ml and 500 ng/ml.

The analysis was carried out after isolation of the sample using SPME on the gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies, USA), column DB-5MS (20 m x 0.180 mm x 0.18 m) and using the mass spectrometry detector 5973N (Agilent Technologies, USA). Conditions of chromatographic analysis were preserved as in the previous experiments: 150°C for 2 min, 30°C/min to 270°C, hold 6 minutes, 10°C/min to 290°C, hold for 2 minutes, the total time of analysis was 16 minutes. Flow rate of carrier gas (helium) was set at 1.1 ml/min. Inlet technique was splitless, fiber were inserted into the injection port tempered to 260°C. The temperature of the ion source and the transfer line was 230°C. Setting regime was the SIM mode - scanning for ions BPA 228 m/z, BPF 200 m/z, BADGE 325 m/z.

## Results and Discussion

In this work there were optimized three SPME methods for the isolation of BPA, BPF and BADGE from surface water samples for subsequent determination by GC-MS. Optimized methods have the following parameters:

- BPA: 85 µm polyacrylate fiber (PA), 5 min pre-mixing of the sample, 20 min sorption under constant mixing;
- BPF: 85 µm polyacrylate fiber (PA), 10 min pre-mixing of the sample, 30 min sorption under constant mixing;
- BADGE: 65 µm polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB), 15 min pre-mixing of the sample, 20 min sorption under constant mixing.

Heating of the sample, adjustment of the pH, acidification or derivatisation was not included as steps in optimized SPME even when some parameters had slightly positive effect on the sorption of the analyte. It was found that heating to 50°C and addition of NaCl was positively influenced by the sorption of analytes BPA and BADGE, acidification had a positive effect also for the analysis of BPA. However these modifications of the samples did not show significantly better response were not used in optimized method due to possible error and damage of the fibres.

Evaluation of the BPA, BPF and BADGE concentration in selected samples was carried out using seven-point calibration curves of the concentration range of 25-500 ng/ml.

Table 1 summarizes the results of 27 surface water samples in which has been used the optimized direct SPME for the isolation of the analyte from the matrix for subsequent analysis by GC-MS. The basic metrological parameters of the SPME-GC-MS are shown in Table 2.

It was found that higher concentrations of bisphenol A contained samples from major rivers of big cities but also small streams in villages where it is not established a comprehensive



sewerage system. Generally can be said that in this experiment (unlike previous) were found higher concentrations of bisphenol A in real water samples than concentrations of bisphenol F or bisphenol A diglycidyl ether. Despite the fact, all of determined values of selected bisphenols analyzed in water samples were very low.

Table 1: Concentrations of BPA, BPF and BADGE [ng/ml] in surface water samples.

Sample	BPA	BPF	BADGE	Sample	BPA	BPF	BADGE
Bečva	1.9615	0.7671	<LOQ	Mirotavka	2.4554	0.9488	45.1420
Berounka	1.5401	0.9936	<LOQ	Morava	1.1000	0.4985	<LOQ
Bystřice	1.3510	1.1145	<LOQ	Olbramovický potok	1.0623	4.1270	<LOD
Dyje	2.3200	0.9653	71,0459	Oslava	1.6683	0.7082	<LOQ
Hloučela	1.5823	1.4894	140,2776	Otava	29.9247	<LOQ	<LOQ
Jevišovka	2.5962	0.9297	84,8416	Rokytná	0.9377	1.9239	<LOQ
Jičínka	2.5164	0.6425	<LOQ	Romže	1.9552	1.4465	98.0045
Jihlava	0.9978	0.5117	<LOQ	Sázava	2.6679	1.2532	164,7049
Kopřivnička	1.7087	0.5977	<LOQ	Skalice	12.7593	<LOQ	<LOQ
Křepický potok	2.0574	2.7358	<LOQ	Svitava	1.2712	0.8340	<LOQ
Leskava	1.1475	0.7788	<LOQ	Svratka	1.1188	0.4723	<LOQ
Litava	1.0327	<LOQ	<LOQ	Šatava	1.0542	<LOQ	<LOD
Lomnice	13.3949	0.4279	<LOQ	Vltava	10.2510	41.2667	<LOQ
Lubina	1.1475	0.6020	<LOQ				

Table 2: The basic metrological parameters of the SPME-GC-MS.

Analyte	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	RSD [%]
BPA	0.1506	0.5020	8.2994
BPF	0.1215	0.4050	6.1171
BADGE	9.9987	33.3291	17.5942

## Conclusion

In previous work, when has been optimized one SPME method for the isolation of selected bisphenols in water samples, it was found that each of the analytes has a variable response to the monitored parameters of the method (Tesařová, 2012). Therefore it were optimized separate SPME methods for the isolation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol A diglycidyl ether in surface waters in this work. For optimized methods were found repeatability ranged from 6 to 17%. Optimized methods were used for monitoring of selected analytes in surface flowing water in the Czech Republic. Selected bisphenols were measured in the following concentration ranges: BPA 0.9377 to 29.9247 ng/ml, BPF 0.3561 to 41.2667 ng/ml and BADGE from not detectable amount to 164.7049 ng/ml.

## Acknowledgement

The study was financially supported by the Czech Ministry of Education research plan No. MSM 6215712402.

## References

Literature is available at the author.

**Contact address:** Simona Tesařová, Mgr., Ústav veterinární ekologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H12027@vfu.cz.

## **Lead poisoning in avian embryos and the use of ethylenediaminetetraacetic acid in therapy**

**Hrubá Hana, Mikšíková Miroslava, Ondráček Karel, Osičková Jitka,  
Kováčová Veronika, Pikula Jiří, Band'ouchová Hana**

*Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceuticals Sciences Brno*

### **Summary**

*Lead is an environmental contaminant and a common cause of poisoning of birds. Endangered groups are primarily predators and avian scavengers which are at risk after consuming food contaminated by lead bullets. Despite of relative insolubility, lead is partially absorbed in the digestive system due to gastric acids. Outcome of chronic poisoning are nonspecific symptoms. The ethylenediaminetetraacetic acid is often used during the treatment of lead poisoning as one of the major chelating agents.*

**Keywords:** *lead; ethylenediaminetetraacetic acid; heavy metals; avian embryo; birds*

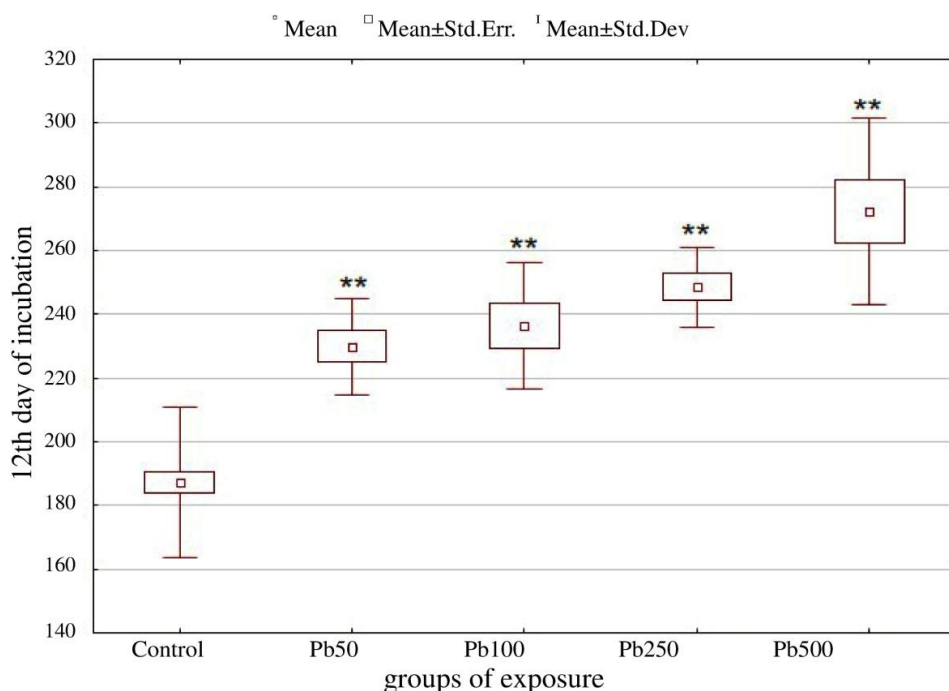
### **Introduction**

Environmental pollutants and pesticides may have negative effects on reproduction of birds due to physiological processes at many levels (Damkova et al. 2009). The main representatives of heavy metals which might be found in egg contents are lead, cadmium, mercury, selenium, manganese and chromium (Burger, 1994). Lead is a major environmental contaminant and a common cause of poisoning of birds. Endangered groups are primarily predators and avian scavengers which are at risk after consuming food contaminated by lead bullets (Pain et al. 2007). Despite of relative insolubility lead is partially absorbed in the digestive system due to gastric acids, which results in formation of chronic poisoning with nonspecific symptoms (Thompson, 2007). The ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is often used in the therapy of lead poisoning as one of the major chelating agents which creates a stable complexes with metals soluble in water, which are then excreted in the urine.

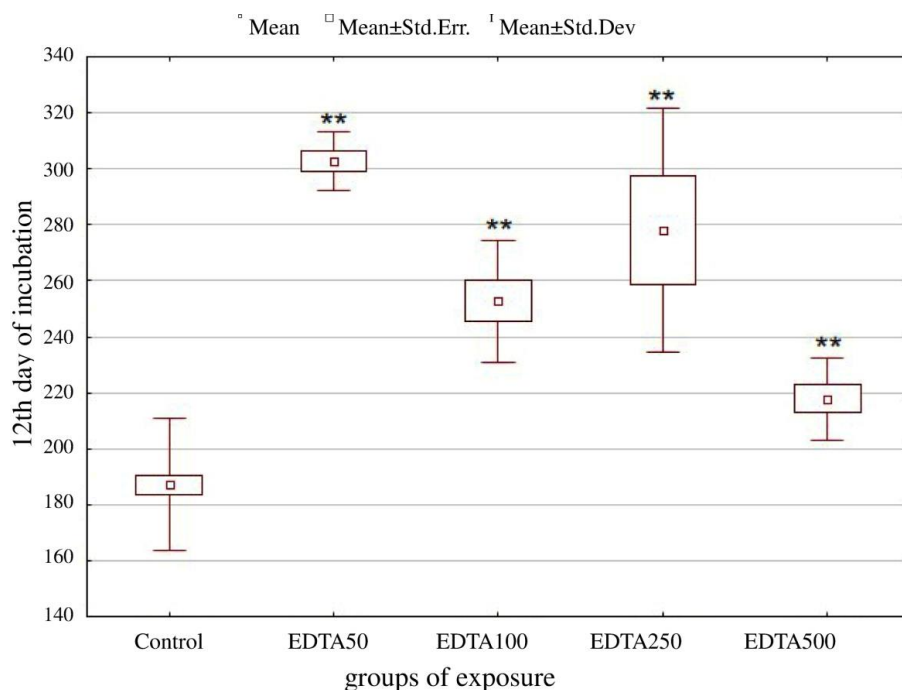
### **Materials and Methods**

The fertilized eggs of chickens which indicated development were included to the experiment. For the experimental purposes, the eggs were divided into seven experimental groups including control group. The first experimental group was administered a solution of lead ions in four concentrations into the eggs. The second experimental group was administered a solution of lead ions bound to the liposome in five different concentrations, on the third experimental group was performed an application of ethylenediaminetetraacetic acid in four concentrations. The fourth control group remained always non-drug, fifth control group was administered a physiological saline which was used as diluent medium. The eggshell of the sixth control group was drilled and the egg undergone a simulation application of toxicant into the egg. The seventh group was subject to application of both investigated substances lead and EDTA. The eggs were candled to control the development and the heart rate of the developing chickens was monitored (monitor Buddy Egg, Avitronics) on a daily basis. Concentrations of applied substances (lead, CaNa<sub>2</sub>EDTA), antioxidants, and oxidative stress parameters were measured. Figures of hematocrit and hemoglobin as also selected biomarkers of lead poisoning (heavy metals) were observed in blood samples. Simultaneously were taken samples for histopathology.

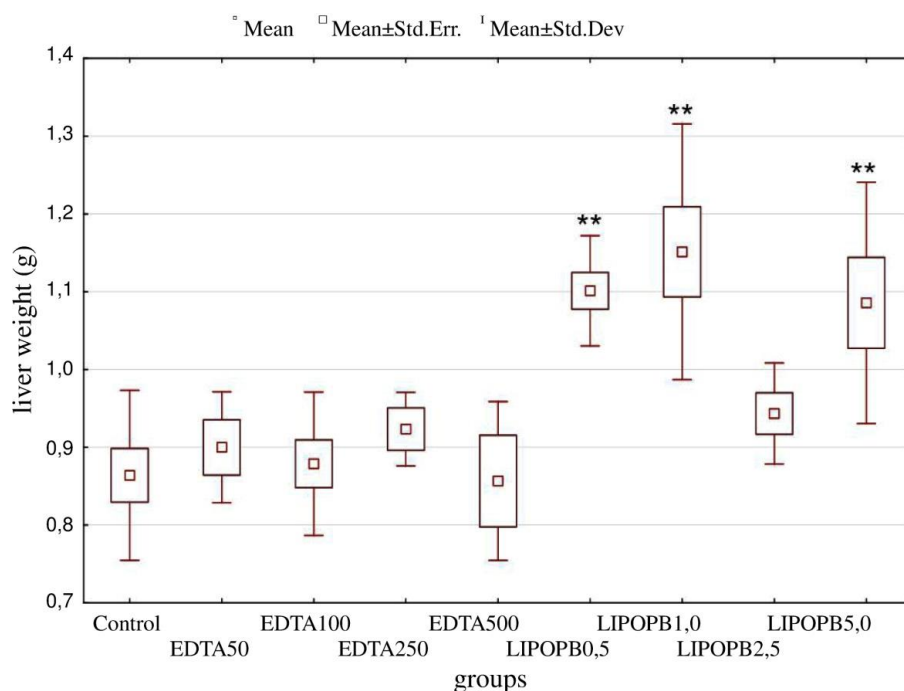
**Results and Discussion**



Graph 1: The first example of the results obtained in the project is embryonic heart rate of chickens after exposure to various doses of lead in comparison with the control groups (exposure group 50/100/250/500 micrograms Pb, average egg weight approx. 60 grams, \*\* =  $p < 0.01$ ,  $n = 84$ ).



Graph 2: The embryonic heart rate of chickens after exposure to various doses of EDTA in comparison with the control groups. (exposure group 50/100/250/500 micrograms  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ , the average egg weight of 60 grams, \*\* =  $p < 0.01$ ,  $n = 79$ ).



Graph 3: Weight of livers of chickens from experimental groups in comparison to the control groups (exposure group 50/100/250/500 micrograms  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ , 0,5 / 1,0 / 2,5 / 5,0 micrograms LIPOPB, the average egg weight 60 grams, \*\* =  $p < 0.01$ ,  $n = 79$ ).

## Conclusions

We experimentally tested the effects of the application  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  on the development of avian embryo. Chelation therapy of avian eggs seems to be an acceptable method of reduction of the toxic load of avian eggs by lead and ensure the successful development of chicken during incubation.

## Acknowledgements

The study was financially supported by the project IGA 29/2013/FVHE.

## References

- Burger J (1994). Heavy metals in avian eggshells: Another excretion method. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 41: 207-220.
- Damkova V, Sedlackova J, Bandouchova H, Peckova L, Vitula F, Hilscherova K, Paskova V, Kohoutek J, Pohanka M, Pikula J (2009). Effects of cyanobacterial biomass on avian reproduction: a Japanese quail model. *Neuroendocrinology Letters*, 30: 205-210.
- Pain DJ, Carter I., Sainsbury AW, Shore RF, Eden P, Taggart MA, Konstantinos S, Walker LA, Meharg AA, Raab A (2007). Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Sci Total Environ.* 376: 116–127.
- Thompson LJ (2007). Lead. In *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. First edition. Edited by Gupta RC. New York: Academic Press, 438–441.

**Contact address:** Hana Hrubá, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Veterinary and Pharmaceutical University Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, skochovah@vfu.cz.

## Impact of Pt, Pd and Rh on the soil invertebrate *Folsomia candida*

Němcová Barbora, Beklová Miroslava

Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, CZ-612 42 Brno, Czech Republic

### Summary

Trace concentrations of the platinum group elements (PGE; Pt, Pd and Rh) are nowadays an irreplaceable part of the environmental analysis and assessment. These rare elements are used as effective substances in automotive catalysts to reduce pollution by emissions originating from fuel combustion. Due to their harmful potential, it is necessary to monitor their content and behaviour in different samples. From the assessing of the effects of chemical substances, using ecotoxicological bioassays with different trophic levels can be obtained very valuable information of bioavailability in the ecosystems.

We focused on reproductive effects of platinum ( $PtCl_4$ ), palladium ( $PdCl_2$ ) and rhodium ( $RhCl_3$ ), in particular. Our study is based on a collembolan laboratory breed, test optimization and validation according to the OECD 232 standards [CSN ISO 11267 – Soil quality - Inhibition of reproduction of *Collembola* (*Folsomia candida*) by soil pollutants]. The concentrations of PGE tested were as follows: 5, 10, 25, 50 and 100  $\mu M$ . The results were evaluated using the inhibition of reproduction compared with controls. The  $EC_{50}$  (effective concentration) was determined after the 28-day test.

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

### Introduction

Scientific discussions concerning the global exposition of the environment to toxic elements (e.g. cadmium, lead, mercury) from various sources have been studied for a long period of time. Since the worldwide introduction of the catalytic converters of the exhaust gases from motor cars, platinum group elements (PGE) was included into the main interest of the investigations. Due to the ability of PGEs to bio-accumulate in the tissues of living organisms, the negative impact of these metals as a result of direct contact with road dust, inhaling solid particles (that constitute approximately 30% of all particles emitted from vehicle catalysts) as well as from food and drinking water cannot be totally excluded (Merget & Rosner, 2001). Importantly, some PGE species (those containing chloride, in particular) exert toxic, cytotoxic and allergenic effects. For example, signs of acute toxicity of  $H_2(PtCl_6)$ ,  $RhCl_3$  and  $PdCl_2$  were reported in rats and rabbits (Colombo *et al.* 2008). Immune functions were shown to be deteriorated by rhodium chloride (Iavicoli *et al.* 2012). *Collembola*, as one of the most abundant groups in the terrestrial ecosystem, are used to assess soil quality. *Collembola* are responsible for organic matter decomposition along with many other organisms and play an important role as prey in the soil ecosystem (Nota *et al.* 2011).

### Material and Methods

The experiments were carried out as described in the OECD Guideline 232 [CSN ISO 11267 – Soil quality – Inhibition of reproduction *Collembola* (*Folsomia candida*) by soil pollutants]. The artificial soil used as a testing substrate was prepared as a mixture of 70% sand, 20% kaolin clay and 10% finely ground Sphagnum peat, pH (6.0±0.5) and was adjusted with  $CaCO_3$ . The reproductive effects of platinum, palladium and rhodium, in particular, were examined. The soil was contaminated by dissolved  $PtCl_4/PdCl_2/RhCl_3$  in an adequate amount of deionised water to achieve soil moisture equal to 50% of maximum water-holding capacity. The  $PtCl_4/PdCl_2/RhCl_3$  substances are particularly soluble in water. Concentrations were chosen on the basis of the range finding test. The concentration of the stock solution was 10 mM. Each solution was mixed with the soil immediately before use, leading to nominal

concentrations of 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$   $\text{PtCl}_4/\text{PdCl}_2/\text{RhCl}_3$  per vessel. Five replicates were used per the tested concentration.

### Results and Discussion

The test with *Folsomia candida* fulfilled the CSN ISO criteria for validation. The 28hEC50 (effective concentration)  $\text{PtCl}_4$  was estimated at 200.4  $\mu\text{M}$ . All CV values were less than 11% for each concentration of platinum. Mean adult survival ranged from 9 to 10 out of 10 per vessel, and reproduction was between 541.6 and 1043.8 per vessel. In the Table 1 there is summary of platinum toxicity on *F. candida*. No significant effect on mortality was found. The 28dEC50 of  $\text{PdCl}_2$  amounted to 21.0  $\mu\text{M}$ . In the control, adult survival was 100%, the average number of juveniles per vessel was 1280 and the CV was 3% in juveniles. No significant effect on mortality was found. Summary of  $\text{PdCl}_2$  toxicity on *F. candida* is shown in Table 2. The 28dEC50 of  $\text{RhCl}_3$  was 266.22  $\mu\text{M}$ . In the control, adult survival was 100%, the average number of juveniles per vessel was 603.6 and the CV was 21% in juveniles. There was no significant effect on mortality. Summary of  $\text{RhCl}_3$  toxicity on *F. candida* is shown in Table 3. All CV values were less than 21% for each concentration of platinum, palladium and rhodium (Tables 1, 2, 3). Mean adult survival rates ranged from 8 to 10 out of 10 collembolans per vessel. Survival was not affected to such an extent as reproduction. Therefore, it is not a good indicator of toxicity.

Table 1: Summary of platinum ( $\text{PtCl}_4$ ) toxicity in *F. candida* (CV - coefficient of variation, SD – standard deviation).

Concentrations $\text{PtCl}_4$ ( $\mu\text{M}$ )	No. adult		Mortality (%)	No. juveniles produced mean $\pm$ SD	CV (%)	Inhibition of reproduction (%)
	at the beginning of the test	at the end of the test (mean)				
5	10	9,4	6	1011,8 $\pm$ 63	6	3
10	10	9,6	4	654,6 $\pm$ 46	7	37
25	10	10	0	694,8 $\pm$ 76	11	33
50	10	10	0	806,8 $\pm$ 23	3	23
100	10	9	10	541,6 $\pm$ 41	8	48

Table 2: Summary of palladium ( $\text{PdCl}_2$ ) toxicity in *F. candida* (CV - coefficient of variation, SD – standard deviation).

Concentrations $\text{PdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	No. adult		Mortality (%)	No. juveniles produced mean $\pm$ SD	CV (%)	Inhibition of reproduction (%)
	at the beginning of the test	at the end of the test (mean)				
5	10	9.6	4	1042.4 $\pm$ 48.5	5	19
10	10	9.6	4	761.6 $\pm$ 32.6	4	41
25	10	9.6	4	589.4 $\pm$ 36.5	6	54
50	10	10	0	463.0 $\pm$ 34.5	7	64
100	10	10	0	262.4 $\pm$ 34.6	13	80

Table 3: Summary of rhodium (RhCl<sub>3</sub>) toxicity on *F. candida* (CV - coefficient of variation, SD – standard deviation).

Concentrations RhCl <sub>3</sub> (µM)	No. adult at the beginning of the test	at the end of the test (mean)	Mortality (%)	No. juveniles produced mean ± SD	CV (%)	Inhibition of reproduction (%)
5	10	10	0	555.4 ± 41.8	7	8
10	10	9.6	4	542.8 ± 78.8	15	10
25	10	9.4	6	508.6 ± 107.6	21	16
50	10	9.6	4	454.6 ± 48.8	11	25
100	10	9.6	4	326.8 ± 46.6	14	46

### Conclusion

Combining the literature review and our new findings, we can confirm that the relative order of toxicities is Pd (II) > Pt(IV) >> Rh(III). Additionally, different invertebrate species such as *Folsomia candida*, *Enchytraeus albidus* and *Porcellionides pruinosus* showed different response patterns to metals, confirming that for an adequate ecological risk assessment several groups of organisms and endpoints should be included. No comprehensive studies about PGE behaviour and effects, their distribution in the food chain and bioaccumulation have yet been performed.

### Acknowledgement

The study was supported by FRVS 965/2013/G4.

### References

COLOMBO, C.; MONHEMIUS, A.J.; PLANT, J.A. Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008, vol. 71, s. 722–730.

CSN ISO 11267 (2010) Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.) 20 p.

Iavicoli, I.; SGAMBATO, A.; FONTANA, L.; MARINACCIO, A.; LESO, V.; CORBI, M. et al. Effects of sub-acute exposure to rhodium (as Rh (III) chloride hydrate) on cytokines in female wistar rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012, vol. 89, s. 686–692.

MERGET, R.; ROSNER, G. Evaluation of the health risk of platinum group metals emitted from automotive catalytic converters. *Science of the Total Environment*. 2001, vol. 270, s. 165–173.

NOTA, B.; VOOIJIS, R.; VAN STRAALLEN, N.M.; ROELOFS, D. Expression of mtc in *Folsomia candida* indicative of metal pollution in soil. *Environmental Pollution*. 2011, vol. 159, s. 1343–1347.

OECD 232 (2009). Guidelines for the testing of chemicals: Collembolan reproduction test in soil. 19 p.

**Contact address:** Barbora Němcová, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic, nemcovab@vfu.cz.

## Fylogeografia kliešť'a *Hyalomma aegyptium* Phylogeography of tick *Hyalomma aegyptium*

<sup>1</sup>Kautman Matej, <sup>1,2</sup>Dvořáková Nela, <sup>1,2</sup>Šírokový Pavel

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>CEITEC - Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

### Summary

*Hyalomma aegyptium* is a typical tree-host tick almost entirely parasitizing on tortoises of genus *Testudo*. Together more than 200 tick specimens were examined. Research is focused on localities in wide geographic range due to large distribution area of *H. aegyptium*. Material has been collected from 85 localities in Northern Africa, Southeastern Europe and Middle East. Together 10 different nuclear and mitochondrial molecular markers were tested, from which five have been successfully amplified (COI, 12S rDNA, 16S rDNA, 18S rDNA and ITS2) and two of them was enough variable to use them for phylogenetic analysis (COI and 16S rDNA). Cytochrome oxidase I (COI) together with 16S rDNA were analysed together in concatenated trees with both Bayesian method and maximum likelihood method. Analysis formed geographically separated clusters illustrating three separate lineages of *H. aegyptium* populations. This multi-gene access shows us clustering with lack of geographic pattern. Therefore our results lead us to suppose hypothesis that gene-flow between separate population can be affected by less host-specific non-adult forms (larvae and nymphs), which can be easily transferred by birds and other vertebrates.

**Keywords:** *Hyalomma aegyptium*; phylogeography; COI; 16S rDNA; 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. Väčšina druhov rodu *Hyalomma*, vrátane *H. aegyptium* sú trojhostiteľské kliešte. V krajinách ich výskytu sú tieto kliešte významnými parazitmi dobytka, iných poľnohospodárskych a domácich zvierat aj človeka. Rod *Hyalomma* je vektorom mnohých významných patogénov prenosných na človeka, napríklad Krymsko-konzskej hemoragickej horúčky, alebo Q-horúčky. Špeciálnym centrom druhov rodu *Hyalomma* je pravdepodobne Irán a Kaukaz.

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 širokej škále plazov, vtákov, cicavcov vrátane človeka. 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 viac ako 200 jedincov kliešťov z korytnačiek druhu *Testudo graeca* z 85 lokalít z Bulharska, Rumunska, Grécka, Turecka, Gruzínska, Azerbajdžanu, Sýrie, Iránu, Iraku, Afganistanu, Pakistanu, Maroka, Alžíriska, Tuniska, 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. Celkom sme testovali 9 rôznych markerov. Na analýzu sekvencií DNA boli po



testování variability vybrané dva mitochondriální gény (Tabulka 1). Programy PCR sú uvedené nižšie (Tabulka 2.).

Tabulka 1: Použité markery.

marker	počet b.p.	primery	autor
COI	863	C1-N-2312, TY-J-1449	Rees et al. 2003
16S rDNA	444	16S-F, 16S-R	Nourredine et al. 2011

Tabulka 2: PCR programy amplifikácie jednotlivých génov.

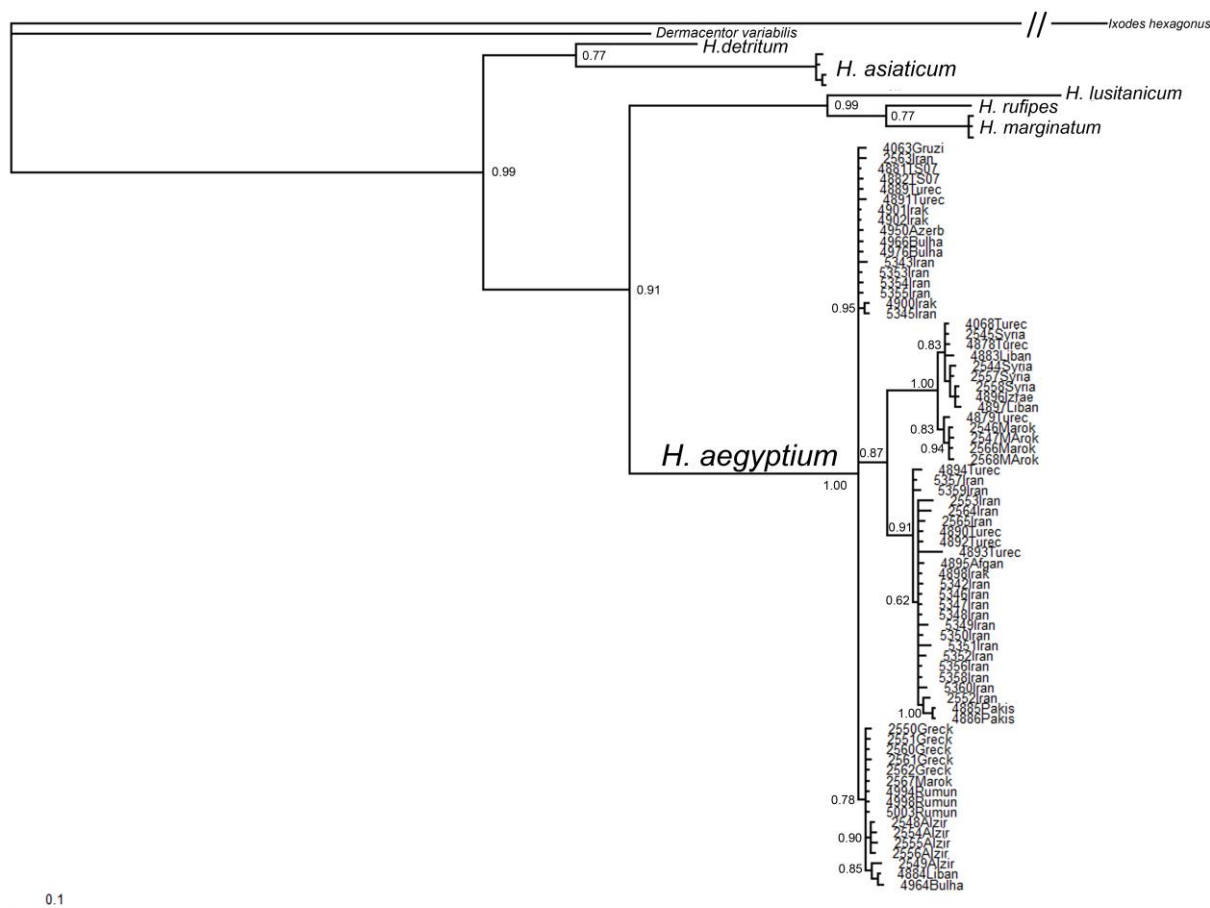
gén	objem	úvodná denaturácia	denaturácia	hybridizácia	extenzia	extenzia 2
COI	25µl	95°C (4 min)	40x 94°C (30 s)	40x 45°C (60 s)	40x 72°C (60 s)	72°C (10 min)
16S rDNA	30µl	95°C (5 min)	35x 95°C (30 s)	35x 59,4°C (30 s)	35x 72°C (60 s)	72°C (15 min)

Vizualizácia pruhov prebiehala na 1,5% agarózovom gély, zafarbeným farbivom MIDORI, presvieteným UV svetlom. Vzorky vybrané na sekvenční analýzu boli prečistené komerčným kitom Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan).

Sekvenovanie DNA bolo zaistené firmou Macrogen (Macrogen, the Netherland. Spoločná fylogenetická analýza sekvencií oboch génov z vybraných 100 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 9 testovaných markerov sa nám podarilo amplifikovať 5. Z týchto piatich sa však ako dostatočne variabilné gény na fylogenetickú analýzu ukázali iba dva mitochondriálne gény (COI a 16S rDNA). Spoločnou analýzou sekvencií týchto génov (bayesova metóda, metóda maximum likelihood) bol vytvorený fylogenetický strom, na ktorom sú zjavné 3 oddelené vetvy. Prvá skupina nie je zakorenená a obsahuje jedince s nešpecifickým umiestnením v porovnaní s ostatnými vetvami stromu. Ostatné tri vetvy by sa dali charakterizovať ako dva sesterské: levantská a východná. K týmto dvom vetvám dosadá tretia vetva zložená z jedincov z geograficky odlišných areálov (Obr. č.1). Minimálne dve vzniknuté vetvy vykazujú geografickú príslušnosť. Mierne miešanie jedincov v rámci geograficky oddelených areálov môžu mať na svedomí hostiteľsky málo špecifické nedospelé štádiá, prenášané na priestorovo oveľa aktívnejších hostiteľoch ako sú korytnačky.



Obrázok 1: Konkatenovaný fylogenetický strom na základe analýzy génu cytochróm oxidáza I a 16S rDNA (MrBayes).

### Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že dva použité mitochondriálne gény sú okrem medzidruhových vzťahov, vhodné aj na štúdium vnútrodrohových vzťahov a že dokážu rozdiely v populáciách dostatočne definovať. Diverzifikácia populácií v rámci druhu *Hylaomma aegyptium* pravdepodobne spája geografické ohraničenie populácií a miešanie génov medzi nimi za pomoci priestorovo aktívnejších lariev a nýmfov, ktoré často parazitujú na iných druhoch plazov, na cicavcoch a vtákoch, ktoré sú hlavným dôvodom myšlienky iného genetického toku ako len priameho vplyvu geografických prekážok v disperzii druhu. Detailnejšiemu pochopeniu vzťahov medzi populáciami pomôže analýza mikrosatelitov.

### Podakovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom GAČR P506/11/1738.

### Literatúra

Zoznam použitej literatúry a citácií je dostupný u uvedených autorov.

**Kontaktná adresa:** Matej Kautman, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, kautman.matej@gmail.com.

## Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* in large corvids of Europe and North America

<sup>1</sup>Janecko Nicol, <sup>2,3</sup>Čížek Alois, <sup>1</sup>Halová Dana, <sup>4</sup>Karpíšková Renáta, <sup>4</sup>Myšková Petra, <sup>1,2</sup>Literák Ivan

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Summary

It is well understood that *Salmonella* is carried by animals and in majority of cases as asymptomatic hosts. Acquired antibiotic resistance in this zoonotic pathogen compounds the public health concern. A total of 2778 faecal swabs from 11 countries were submitted. Positive isolates were serotyped, susceptibility tested and analysed for antibiotic resistance genes. Overall, 1.40% (39/2778) (CI = 1.01, 1.90) of samples were positive for *Salmonella* spp. No significant difference ( $p < 0.05$ ) was found in the proportion of *Salmonella* recovered in Europe vs. North America. European sites were significantly more likely to yield resistant *Salmonella* (OR 71.5,  $p < 0.001$ , CI = 3.77, 1358) than North American sites, where no resistance was found. Resistance to nalidixic acid was recovered in nine isolates from four serovars in four different sites across Europe. Large corvids should be considered as contributors to the overall dynamics of *Salmonella* and antibiotic resistance ecology.

**Keywords:** *Salmonella*; corvids; wild birds; antibiotic resistance; Europe; North America

### Introduction

Corvid species of birds, specifically those with communal roosting behaviour play a role in the epidemiology of *Salmonella* spp. transmission, albeit the size of the role and the direct impact on public health remains unknown. The coexistence of large corvids with people and their reliance on food sources around urban centres and areas with high livestock density creates a potential for transmission of pathogens. It is known that large corvid birds harbour various pathogenic bacteria including *Salmonella* spp. of public health importance (Hubalek, 2004; Literak et al., 2007; Gorski et al., 2011). The migratory pattern of some corvid species varies from long distances to smaller home ranges as a sedentary population. Wintering rooks in central Europe serve as reservoirs and vectors of *Salmonella* resistant to antibiotics and potentially transmit these bacteria as part of their faecal excretion during their migrations. Currently, there is a lack of baseline information in this wildbird population to determine the occurrence and distribution of *Salmonella*, therefore the aim of this large multi-country, two continent survey was to identify, characterize and describe the prevalence of *Salmonella* and the antibiotic resistance in roosting sites of wintering corvids.

### Material and Methods

During the 2010/11 to 2012/13 winter seasons, researchers located winter roosting sites in nine European countries, four states in USA and four provinces in Canada. In Europe, rooks were species predominantly sampled while North American crows (*Corvus brachyrhynchos*) were sampled in USA and Canada. One site each in Canada, Czech Republic and Slovakia collected samples from common ravens. Freshly dropped faecal specimens were collected and couriered to the CEITEC laboratory in Brno where all samples were part of multiple

microbiological analyses. *Salmonella* was tested for using an initial enrichment followed by selective plating onto modified semisolid Rappaport-Vassiliadis agar (Oxoid, UK). In parallel, xylose lysine deoxycholate agar (Oxoid) was inoculated. Suspect *Salmonella* colonies were confirmed using API 10S (bioMerieux, France). *Salmonella* isolates were then characterized by standard serotyping and phage typing methods.

Isolates were tested for susceptibility to antibiotics using antibiotic disk diffusion method to 12 selected antibiotics: amoxicillin/clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), cephalothin (30 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), sulfonamide compounds (300 µg), and tetracycline (30 µg) (Oxoid, UK). Results indicating resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin were confirmed by agar dilution assay in order to determine the minimum inhibition concentrations.

## Results

A total 19 roosting sites in 11 countries spanning Europe and North America were sampled resulting in a collection of 2778 faecal samples. *Salmonella* was recovered from 1.40% (39/2778) (CI = 1.01, 1.90). Serovars isolated varied within sampling site and among the two continents. In Europe, seven different serovars were isolated from 1739 samples tested, while in North America, 13 different serovars were isolated of the 1039 samples tested. The top four serovars isolated were *S. Enteritidis*, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium* and *S. Infantis*. *S. Enteritidis* phage types consisted one each of PT3, PT8 and U in isolates from Slovakia, phage type U from Poland and PT4 from Canada. *S. Typhimurium* phage types consisted of one each of atypical and DT120 from Canada and one each of phage type DT110 and DT104 from the Czech Republic. When comparing the prevalence of *Salmonella* spp. between the two continents there is no significant difference ( $p= 0.26$ , CI= 0.75, 2.73).

Antibiotic resistance was not present in any *Salmonella* isolates originating from North American birds. In Europe, resistance to one or more antibiotics was found in 67% (14/21) (CI= 43.03, 85.41) isolates tested. Four sites in Europe displayed resistance to nalidixic acid, a quinolone. This resistance was found in *S. Enteritidis* phage type U and phagetype PT8, *S. Hadar*, *S. Infantis* and *S. Oranienburg*. Of those, *S. Hadar* contained resistance to four antibiotics tested. One isolate of *S. Typhimurium* phage type DT110 from Czech Republic showed resistance to four antibiotics.

## Discussion

To date, this study is the largest survey of *Salmonella* in wintering corvids spanning Europe and North America. The survey included urban, agricultural, coastal and rural areas to explore various habitats. Sources of contamination at the agricultural, human and wildlife interface can not be ruled out nor can it be assessed by direction of contamination. This study did not analyse isolates for *Salmonella* homogeneity, however in European sites found four of the five serovars targeted in government reduction programs. Similar to other studies *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* were consistently among the top serovars suggesting the sources of *Salmonella* may be similar in corvids and human populations (EFSA, 2011; NARMS, 2011; Gov. of Canada, 2012).

Resistance in this study was low with most resistance profiles consisting of older antibiotic drugs, however patterns of significance were found in Europe. In particular, nalidixic acid resistance was found in *Salmonella* *Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, and *S. Oranienburg* in four different European sites. There has been a slow rise worldwide in the prevalence of *S. Enteritidis* with nalidixic acid resistance and subsequently ciprofloxacin resistance. In the

USA, early emergence of quinolone resistant was found in *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Virchow* (Herikstad et al., 1997), however the wildlife corvid strains found from USA sites in this study did not contain any resistance suggesting the occurrence of resistance in corvids may for the time being be limited.

### Conclusions

This large survey spanning two continents and 11 countries has created a baseline reference of prevalence of *Salmonella*. The study further addresses the issue of *Salmonella* distribution and antibiotic resistance occurrence in these wild bird populations where there is potential for large corvids to be sentinel indicators of *Salmonella* and AR distribution between urban centres and natural environments.

### Acknowledgements

This study was supported by the project “CEITEC - Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund and funded partially by Grant No. NT/14398 from the Ministry of Health of the Czech Republic. We would like to recognize the contributions of field work collaborators and laboratory staff for excellent cooperation in this study.

### References

- EFSA, (European Food Safety Authority). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*. 2013, vol. 11, s. 3129-3379. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- GOVERNMENT OF CANADA. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). 2011- Antimicrobial resistance short report. Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. 2013.
- GORSKI, L.; PARKER, C.T.; LIANG, A.; COOLEY, M. B.; JAY-RUSSELL, M. T.; GORDUS, A. G.; ATWILL, E. R.; MANDRELL, R. E. Prevalence, distribution and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, vol. 77, s. 2734-2748.
- HERIKSTAD, H.; HAYES, P.; MOKHTAR, M.; FRACARO, M. L.; THRELFALL, E. J.; ANGULO, F.J. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1997, vol.3, s. 371-37.
- HUBALEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J. Wildl. Dis.* 2004, vol. 40, s. 639-659.
- LITERAK, I.; VANKO, R.; DOLEJSKA, M.; CIZEK, A.; KARPISKOVA, R. Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Let. Appl. Microbiol.* 2007, vol. 45, s. 616–621.
- NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System). Retail Meat Report 2011. Available at: [www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf](http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf) (Accessed February 1, 2014).
- Contact address:** Nicol Janecko, MSc., Department of Biology and Wildlife Diseases Brno, VFU Palackého 1-3, 612 42 Brno, njanecko@uoguelph.ca.

## Plazmidově kódovaná rezistence k cefalosporinům a fluorochinolonům u izolátů *Escherichia coli* z havrana polního (*Corvus frugilegus*) zimujícího v Evropě

### Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* isolated from rook (*Corvus frugilegus*) wintering in Europe

<sup>1</sup>Jamborová Ivana, <sup>1,2</sup>Dolejská Monika, <sup>1,2</sup>Vojtěch Jiří, <sup>3</sup>Guenther Sebastian, <sup>1</sup>Uricariu Raluca, <sup>1,4</sup>Drozdowska Joanna, <sup>1</sup>Papoušek Ivo, <sup>4</sup>Meissner Włodzimierz, <sup>5</sup>Hordowski Jozef, <sup>2,6</sup>Čížek Alois, <sup>1,2</sup>Literák Ivan

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC) VFU Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>3</sup>Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin

<sup>4</sup>Avian Ecophysiology Unit, Department of Vertebrate Ecology and Zoology, University of Gdansk

<sup>5</sup>Arboretum I Zakład Fizjografii w Bolestraszcach

<sup>6</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

In the last decade, wild migrating birds have been identified as significant reservoirs and vectors of commensal and pathogenic bacteria resistant to clinically important antibiotics. In this study, extended-spectrum beta-lactamase-(ESBL)-producing, AmpC beta-lactamase-producing and plasmid-mediated quinolone-resistant (PMQR) strains of *Escherichia coli* were investigated in 1073 faecal samples from wintering rooks (*Corvus frugilegus*) in eight European countries. Resistant colonies obtained from selective isolation were screened for ESBL, AmpC and PMQR genes by PCR and sequencing. Pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing were performed to reveal their clonal relatedness. In total, 152 (14%,  $n_{\text{samples}}=1073$ ) cefotaxime-resistant and 355 (33%,  $n_{\text{samples}}=1073$ ) ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates were found. Eighty-two (54%) and forty-seven (31%) of these cefotaxime-resistant *E. coli* isolates carried ESBL and AmpC genes, respectively. Sixty-two (18%) of the ciprofloxacin-resistant *E. coli* isolates were positive for PMQR genes. Twelve isolates from the Czech Republic (8), Serbia (3) and Poland-Jaroslav (1) were identified as *E. coli* clone B2-025b-ST131. Widespread occurrence of highly diverse ESBL-, AmpC- and PMQR-positive *E. coli*, including the clinically important multi-resistant *E. coli* ST131 clone, was demonstrated in rooks wintering in various European countries.

**Keywords:** antibiotics; resistance genes; cephalosporines, fluoroquinolones; wildlife

#### Úvod

Narůstající trend výskytu bakterií rezistentních k cefalosporinům a ciprofloxacinu představuje závažné riziko pro zdraví člověka a zvířat. Volně žijící zvířata, která nepřicházejí do přímého kontaktu s antimikrobiálními látkami, jsou nepřímo ovlivněna jejich nadměrnou spotřebou v humánní a veterinární medicíně. Synantropní ptáci žijící v blízkém kontaktu s lidmi byli identifikováni jako významné rezervoáry a vektory multirezistentních bakterií s klinicky významnými mechanismy rezistence (Guenther a kol., 2011). Havran polní, který s oblibou vyhledává potravu na skládkách odpadu nebo polích, kam se zaváží odpad vznikající v rámci intenzivního zemědělství, je vystaven významnému riziku kolonizace multirezistentními bakteriemi (Guenther a kol., 2011; Literák a kol., 2012). Vzhledem k těmto topicko-trofickým nárokům je havran polní vhodným indikátorem kontaminace prostředí rezistentními bakteriemi vznikajícími lidskou činností. Cílem této studie bylo zdokumentovat výskyt *E. coli* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz (ESBL), AmpC beta-laktamáz a plazmidově kódovaných genů rezistence k chinolonům (PMQR) ze vzorků trusu havrana polního (*Corvus frugilegus*) zimujícího v osmi evropských státech.

## Materiál a metody

Vyšetřeno bylo celkem 1073 vzorků trusu havrana polního z osmi evropských států zahrnujících Českou republiku (n=150), Srbsko (150), Španělsko (150), Švýcarsko (49), Německo (100), Itálii (145), Francii (31) a Polsko – Jaroslaw (148) a Gdaňsk (150) v zimě 2010/2011. Kultivací na MacConkeyho agaru (MCA) s cefotaximem (2 mg/l) nebo ciprofloxacinem (0,05 mg/l) byly získány rezistentní izoláty *E. coli*, které byly následně testovány pomocí PCR na přítomnost genů ESBL, AmpC a PMQR (Dobiášová a kol., 2013; Perez-Perez a Hansen, 2011). U izolátů s prokázanou přítomností těchto genů byla stanovena citlivost k 13 antimikrobiálním látkám pomocí diskové difuzní metody (CLSI, 2011); (ampicilin, amoxicilin-klavulanová kyselina, cefalotin, ceftazidim, chloramfenikol, ciprofloxacín, gentamicin, kyselina nalidixová, streptomycin, sulfametoxazol-trimetoprim, sulfonamidy, tetracyklin a imipenem). Klonální příbuznost izolátů byla stanovena pomocí pulzní gelové elektroforézy a metodou „multi-locus sequence typing“. Makrorestrikční profily a zařazení izolátů do klonálních komplexů bylo kalkulováno prostřednictvím softwaru BioNumerics 6.6 a pomocí eBURST analýzy. Izoláty, jejichž makrorestrikční profily sdílely podobnost z 85 % a vyšší, byly považovány za epidemiologicky příbuzné (Dobiášová a kol., 2013).

## Výsledky

Získáno bylo celkem 152 (14 %, n=1073) izolátů *E. coli* rezistentních k cefotaximu a 355 (33 %, n=1073) izolátů rezistentních k ciprofloxacinu. Osmdesát dva (54 %) izolátů *E. coli* neslo gen pro ESBL: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (n=39), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (25), *bla*<sub>CTX-M-24</sub> (4), *bla*<sub>TEM-52</sub> (4), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (2), *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (2), *bla*<sub>SHV-12</sub> (2), *bla*<sub>CTX-M-8</sub> (1), *bla*<sub>CTX-M-25</sub> (1), *bla*<sub>CTX-M-28</sub> (1), a jeden nespecifikovaný typ. Čtyřicet sedm (31 %) izolátů neslo gen pro AmpC beta-laktamázu skupiny CMY-2. Šedesát dva (18 %) *E. coli* se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu neslo geny PMQR: *qnrS1* (n=54), *qnrB19* (4), *qnrS1+qnrB19* (2), *qnrS2* (1) and *aac(6')-Ib-cr* (1). Celkem 82 % izolátů rezistentních k cefotaximu mělo multirezistentní profil (rezistence ke třem či více antibiotikům) na rozdíl od PMQR pozitivních izolátů, u kterých multirezistenci vykazovalo pouze 42 % izolátů. Dvanáct izolátů z České republiky (8), Srbska (3) a Polska-Jaroslawi (1) bylo identifikováno jako multirezistentní pandemický klon *E. coli* B2-025b-ST131 vyznačující se rezistencí k 7-11 antimikrobiálním látkám z 13 testovaných. Významná klonální příbuznost izolátů byla zjištěna na lokalitě v České republice s třemi prevalentními skupinami (ST131, ST58 a ST617). Většina izolátů nesoucích geny pro ESBL, AmpC a PMQR patřila do klonálního komplexu 10, v menší míře pak do klonálního komplexu 155 a 23.

## Diskuze

Výskyt multirezistentních bakteriálních linií nesoucích geny ESBL, AmpC a PMQR u volně žijících ptáků je alarmující. Geny rezistence či klonální linie *E. coli* nalezené u havranů v této studii byly dříve dokumentovány u lidí a domácích zvířat, což ukazuje na možné zdroje těchto bakterií. Tento závěr podporuje i majoritní nález genu *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, který je celosvětově dokumentován především u potravinových zvířat a dále *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, což je nejrozšířenější gen u izolátů lidského původu (Ewers a kol., 2011). Nejběžnějším PMQR genem u izolátů ze zvířat a člověka je *qnrS1* a v menší míře také *qnrB19* (Veldman a kol., 2011), které se u izolátů se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu vyskytovaly téměř výlučně. Detekce multirezistentních izolátů u volně žijících zvířat pravděpodobně odráží přítomnost takovýchto izolátů v potravě či vodě v důsledku nedostatečných dekontaminačních postupů odpadu různého původu. Námi detekované sekvenční typy byly v minulosti identifikovány jako významné patogeny lidí a zvířat a jejich přítomnost v prostředí a u volně žijících zvířat by měla být považována za závažný problém ohrožující zdraví zvířat a lidí.

## Závěr

U synantropních volně žijících havranů polních z různých lokalit v Evropě byl prokázán vysoký výskyt bakterií s klinicky významným mechanismem rezistence k antibiotikům. Šíření multirezistentních bakteriálních linií do životního prostředí poukazuje na zcela neprobádanou komplexnost cest přenosu, v rámci kterých synantropní migrující ptáci zdržující se v blízkosti lidí, měst a v místech s intenzivním zemědělstvím mohou sehrávat významnou roli v cirkulaci těchto klonů mezi různými geografickými oblastmi a ekologickými nikami.

## Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), Ministerstvem zdravotnictví České republiky (NT/14398) a Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy (CZ.1.07/2.3.00/30.0014) a IGA VFU (12/2014/FVHE).

## Literatura

CLSI 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DOBIÁŠOVÁ, H., DOLEJSKÁ, M., JAMBOROVÁ, I., BRHELOVÁ, E., BLAŽKOVÁ, L., PAPOUŠEK, I., KOZLOVÁ, M., KLIMEŠ, J., ČÍŽEK, A., LITERÁK, I. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. FEMS Microbiology Ecology. 2013, vol. 85, no. 3, s. 604-611.

EWERS, C., A. BETHE, T. SEMMLER, S. GUENTHER a WIELER, L., H. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clinical Microbiology and Infection. 2012, vol. 18, no. 7, s. 646-655.

GUENTHER, S., EWERS, C., WIELER, L., H. Extended-spectrum beta lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? Frontiers in Microbiology. 2011, vol. 2, s. 1-13.

LITERÁK, Ivan, MIČUDOVÁ, M., TAUŠOVÁ, D., ČÍŽEK, A., DOLEJSKÁ, M., PAPOUŠEK, I., PROCHÁZKA, J., VOJTĚCH, J., BORLEIS, F., GUARDONE, L., GUENTHER, S., HORDOWSKI, J., LEJAS, C., MEISSNER, W., MARCOS, B., F., TUCAKOV, M. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rocks commonly wintering throughout Europe. Microbial Drug Resistance. 2012, vol. 18, no. 6, s. 567-573.

PEREZ-PEREZ, F. J., HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2002, vol. 40, no. 6, s. 2153-2162.

VELDMAN, K., CAVACO, L. M., MEVIUS, D., BATTISTI, A., FRANCO, A., BOTTELDOORN, N., BRUNEAU, M., PERRIN-GUYOMARD, A., CERNY, T., DE FRUTOS ESCOBAR, C., GUERRA, B., SCHROETER, A., GUTIERREZ, M., HOPKINS, K., MYLLYNIEMI, A.-L., SUNDE, M., AARESTRUP, F.M. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011, vol. 66, no. 6, s. 1278-1286.

**Kontaktní adresa:** Ivana Jamborová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, ivca.jamborova@gmail.com.



## Plazmidově kódovaná rezistence k chinolonům u *Aeromonas* spp. z ornamentálních ryb

### Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas* spp. from ornamental fish

<sup>1,2</sup>Dobiášová Hana, <sup>1</sup>Kutilová Iva, <sup>3</sup>Piačková Veronika, <sup>4</sup>Veselý Tomáš,  
<sup>2,5</sup>Čížek Alois, <sup>1,2</sup>Dolejská Monika

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Středoevropský technologický institut (CEITEC) VFU Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>3</sup>Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vodňany

<sup>4</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

<sup>5</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

Intensive fish farming is associated with extensive use of antibiotics leading to dissemination of bacteria resistant to clinically relevant antibiotics. The aim of the study was to examine imported tropical ornamental fish and koi carps bred in the Czech Republic as a potential source of *Aeromonas* spp. carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes (PMQR). Minimal inhibition concentration (MIC) of ciprofloxacin, clonality, additional antibiotic resistance genes and integrons were determined in PMQR-positive *Aeromonas* isolates. Transferability of plasmids with PMQR was tested using conjugation and transformation. Relatedness of the plasmids was determined using restriction analysis. Eighteen (24 %, n = 76) *Aeromonas* isolates from tropical ornamental fish and 15 (19 %, n = 80) isolates from koi carps harboured *qnrS2*, *aac(6')-Ib-cr* and *qnrB17*. PMQR-positive *Aeromonas* isolates from imported tropical ornamental fish showed higher MIC levels to ciprofloxacin, multiple antibiotic resistance genes and diverse class I integron content in comparison with *Aeromonas* spp. from koi carps. Identical plasmids with PMQR genes were found in *Aeromonas* spp. from tropical ornamental fish and koi carps bred in the Czech Republic. Ornamental fish may represent an important reservoir of antibiotic resistant *Aeromonas* spp. harbouring PMQR genes.

**Keywords:** *Aeromonas* spp.; plasmid-mediated quinolone resistance; water environment

#### Úvod

Intenzivní chov ryb je spojen s častým až nadměrným užíváním různých skupin antibiotik. Antibiotika jsou v akvakulturách podávána jako profylaxe nebo terapie bakteriálních infekcí ryb často za účelem zvyšování výnosů. Použití oxytetracyklinu, florfenikolu a chinolonů je v akvakulturách obecně dovoleno, nicméně v méně rozvinutých státech je navíc dovoleno používání např. amoxicilinu, erytromycinu, chloramfenikolu a dalších antibiotik významných pro humánní medicínu (Cabello a kol. 2013). Chinolony patří mezi nejčastěji používaná širokospektrá antibiotika v humánní i veterinární medicíně (Cattoir a kol. 2008). Klinická rezistence bakterií k chinolonům je spojena se vznikem mutací v genech topoizomeráz II. Snížená citlivost bakterií k chinolonům je spojena mimo jiné s geny plazmidově kódované rezistence k chinolonům (PMQR). Geny PMQR usnadňují vznik mutací v genech topoizomeráz II a vyskytují se především na plasmidech, což usnadňuje šíření PMQR genů v populacích bakterií. Dosud popsané geny PMQR zahrnují geny *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* a *oqxAB* (Strahilevitz a kol. 2009). Rod *Aeromonas* je vhodný indikátor antibiotické praxe v daném chovu ryb, protože se jedná o bakterie vodního prostředí, které kolonizují ryby a mohou vyvolat řadu infekčních onemocnění ryb i člověka (Verner-Jeffreys a kol. 2009). Cílem této studie bylo zhodnotit význam dovážených tropických ornamentálních ryb a kaprů koi chovaných v ČR jakožto potenciálního zdroje *Aeromonas* spp. nesoucí geny PMQR.

## Materiál a metody

Osmdesát izolátů *Aeromonas* spp. bylo získáno z kůže a žaber kaprů koi (*Cyprinus carpio koi*) chovaných na 7 farmách v ČR v letech 2005–2006. Sedmdesát šest izolátů *Aeromonas* spp. bylo získáno z kůže, žaber a tělních kavit různých druhů tropických ornamentálních ryb dovezených z Vietnamu, Thajska, Číny, Slovenska, Brazílie a Peru do ČR v letech 2005–2007. Ryby byly uchovány ve své původní přepravní vodě a odběr vzorků byl proveden po jejich dovozu do ČR. Vzorky byly kultivovány na Columbia agar (Oxoid, Velká Británie) s 5 % ovčí krve. Izoláty byly zařazeny do komplexu druhů a byla stanovena jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) ciprofloxacinu agarovou diluční metodou (CLSI, 2006; Čížek a kol. 2011). Izoláty s MIC  $\geq 0,05$  mg/l ciprofloxacinu byly testovány na přítomnost 8 genů PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*) pomocí PCR a sekvenování. U izolátů s prokázanou přítomností PMQR genů byla testována citlivost k chloramfenikolu, gentamicinu, nitrofurantoinu, florfenikolu, oxytetracyklinu, sulfonamidům a trimetoprimu diskovou difúzní metodou a příslušné geny rezistence včetně integronů byly stanoveny pomocí PCR (CLSI, 2006; Dobiášová a kol., 2013). Klonální příbuznost izolátů byla stanovena pomocí *Xba*I-PFGE a vyhodnocena pomocí software BioNumerics. Izoláty s indexem podobnosti (Dice)  $\geq 85$  % byly pokládány za epidemiologicky příbuzné. Přenos plazmidů nesoucích PMQR geny byl testován pomocí konjugace do recipientních kmenů *Escherichia coli* a *Aeromonas* sp. a transformace chemicky kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  teplotním šokem. Profil plazmidů u izolátů *Aeromonas* spp. a příslušných transformantů byl stanoven pomocí S1-nukleázy a PFGE (Dobiášová a kol., 2013). U plazmidů byla určena skupina inkompatibility (Cattoir a kol. 2008). Příbuznost IncU plazmidů byla hodnocena pomocí restriční analýzy za využití *Hinc*II (Takara, Japonsko).

## Výsledky

Sedmdesát šest izolátů *Aeromonas* spp. (100 %, n = 76) z importovaných tropických ornamentálních ryb a 36 izolátů (45 %, n = 80) z kaprů koi chovaných v ČR mělo MIC ciprofloxacinu  $\geq 0,05$  mg/l. Osmnáct izolátů *Aeromonas* spp. (24 %, n = 76) z importovaných ornamentálních ryb a 15 izolátů (19 %, n = 80) z kaprů koi neslo alespoň jeden PMQR gen (*qnrS2*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qnrB17*). Sedmnáct PMQR-pozitivních izolátů bylo zařazeno do komplexu druhů *Aeromonas hydrophila*, 15 izolátů do komplexu *A. sobria* a jeden izolát do komplexu *A. hydrophila/sobria*. *Aeromonas* spp. byly rozřazeny do pěti skupin (A-E) na základě podobnosti makrorestričních profilů. U izolátů z tropických ornamentálních ryb byly hodnoty MIC ciprofloxacinu vyšší (64–>128 mg/l) než u izolátů z kaprů koi (0,25–8 mg/l). U izolátů *Aeromonas* spp. z ornamentálních ryb byla zjištěna multirezistence (geny rezistence k tetracyklinu, chloramfenikolu, sulfonamidům, trimetoprimu, aminoglykosidům, rifampicinu a beta-laktamům). Mezi nejčastěji detekované sestavy genových kazet v integronech třídy I byly *dfrA12-aadA2* (16 izolátů *Aeromonas* spp.) a *arr3-aacA4-dfrA1-orf* (4 izoláty) z ornamentálních ryb i kaprů koi. Konjugativní přenos plazmidů s geny PMQR nebyl prokázán u žádného izolátu. Transformace proběhla úspěšně u 79 % izolátů *Aeromonas* spp. Ze 17 transformantů s jedním plazmidem 7 transformantů neslo malý netypizovatelný plazmid s *qnrS2* a 10 transformantů neslo plazmid IncU (20–40 kb). IncU plazmidy o velikosti 20 kb s identickým restričním profilem byly izolovány z nepříbuzných izolátů *Aeromonas* spp. z ornamentálních ryb i kaprů koi. IncU plazmidy o velikosti 35 a 40 kb se lišily restričním profilem i obsahem genů PMQR.

## Diskuze

Tato studie poskytuje detailní molekulární charakteristiku izolátů *Aeromonas* spp. s geny PMQR. Detekce *Aeromonas* spp. s geny rezistence k chinolonům je znepokojujícím zjištěním z hlediska významu chinolonů pro léčbu bakteriálních infekcí člověka a zvířat, a také jakožto

ukazatel zatížení životního prostředí vysoce stabilními antibiotiky, které ovlivňují biodiverzitu vodního prostředí a snižují množství populací bakterií přirozeně citlivých k těmto antibiotikům (Cabello a kol. 2013). Řada studií poukázala na značné rozšíření *qnrS2* u *Aeromonas* spp. z ornamentálních ryb (např. Verner-Jeffreys a kol. 2009). U izolátů z ornamentálních ryb byla zjištěna multirezistence, která odráží absenci důsledné regulace použití antibiotik v méně rozvinutých zemích. Detekce identických plazmidů s geny PMQR u nepříbuzných izolátů *Aeromonas* spp. z různých oblastí světa poukazuje na velký význam plazmidů pro rozšíření genů rezistence k chinolonům a k dalším významným antibiotikům.

### Závěr

Rostoucí rozšíření bakterií rezistentních k antibiotikům je alarmujícím problémem současné medicíny. Detekce multirezistentních *Aeromonas* spp. nesoucí geny PMQR z importovaných ryb poukazuje na nutnost omezení používání antibiotik v akvakulturách. Vodní ekosystémy reprezentují významný zdroj genů rezistence a mobilních genetických elementů zajišťujících jejich rozšíření v bakteriálních populacích.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena Národní agenturou pro zemědělský výzkum (projekt č. QJ1210237), Ministerstvem zemědělství (MZE 0002716202), projektem CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (LO1205).

### Literatura

CABELLO, F.C.; GODFREY, H.P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*. 2013, vol. 15, no. 7, s. 1917–1942.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; AUBERT, C.; SOUSSY, C.J.; NORDMANN, P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*. 2008, vol. 14, no. 2, s. 231–237.

CLSI. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. In: Approved Guideline M42-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA. 2006.

ČÍŽEK, A.; DOLEJSKÁ, M.; SOCHOROVÁ, R.; STRACHOTOVÁ, K.; PIAČKOVÁ, V.; VESELÝ, T. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology*. 2010, vol. 142, no. 3–4, s. 435–439.

DOBIÁŠOVÁ, H.; DOLEJSKÁ, M.; JAMBOŘOVÁ, I.; BRHELOVÁ, E.; BLAŽKOVÁ, L.; PAPOUŠEK, I.; KOZLOVÁ, M.; KLIMEŠ, J.; ČÍŽEK, A.; LITERÁK, I. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2013, vol. 85, no. 3, s. 604–611.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009, vol. 22, no. 4, s. 664–689.

VERNER-JEFFREYS, D.W.; WELCH, T.J.; SCHWARZ, T.; POND, M.J.; WOODWARD, M.J.; HAIG, S.J.; RIMMER, G.S.E.; ROBERTS, E.; MORRISON, V.; BAKER-AUSTIN, C. High Prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS ONE*. 2009, vol. 4, no. 12, e8388.

**Kontaktní adresa:** Hana Dobiášová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, dobiasova.hanka@gmail.com.

## Kolonizácia vankomycín rezistentnými enterokokmi u krkavcovitých vtákov v Európe a v Severnej Amerike

### Vancomycin resistant enterococci in corvids in Europe and North America

<sup>1</sup>Oravcová Veronika, <sup>2</sup>Zurek Ludek, <sup>2</sup>Ghosh Anuradha, <sup>3</sup>Guenther Sebastian, <sup>4</sup>Townsend Andrea, <sup>5</sup>Clark Anne, <sup>6</sup>Ellis Julie, <sup>7</sup>Janecko Nicol, <sup>8,9</sup>Masaříková Martina, <sup>1,9</sup>Literák Ivan

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

<sup>3</sup>Institute of Microbiology and Epizootics, Veterinary Faculty, Free University Berlin, Berlin, Germany

<sup>4</sup>Department of Wildlife, Fish, and Conservation Biology, University of California at Davis, Davis, CA, USA

<sup>5</sup>Department of Biological Sciences, Binghamton University, Binghamton, NY, USA

<sup>6</sup>Tufts University, Cummings School of Veterinary Medicine North Grafton, MA, USA

<sup>7</sup>Department of Population Medicine, University of Guelph, Guelph, Canada

<sup>8</sup>Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>9</sup>CEITEC VFU Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

#### Summary

Aim of this study was to compare prevalence and characteristics of *vanA*-carrying vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from American crows (*Corvus brachyrhynchos*) and rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the United States, Canada, and various European countries. Samples of feces were collected during winters 2010-2013 and cultivated selectively for VRE. We tested susceptibility to other antibiotics by disk diffusion method and occurrence of resistance and virulence genes. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) were used to examine epidemiologic relationships of *vanA*-containing VRE. VRE with the *vanA* gene were found in 15 (2.5%) of 590 and one of 400 crow samples (0.3%) in the USA and Canada, respectively. In Europe, VRE with the *vanA* gene were found in 8 (0.7%) of 1073 rook samples. In total, we obtained 23 isolates of *E. faecium* and 8 *E. faecalis*. Based on MLST analysis, all *E. faecium* isolates belonged to clonal complex 17. All *E. faecalis* isolates were from USA and belonged to ST6 (1), ST16 (3) and ST179 (4). Clinically important enterococci with the *vanA* gene occurred in omnivorous corvids in North America and Europe. The role of migratory birds in dissemination of antibiotic resistant bacteria has not been understood yet, but presence of clinically important enterococci in corvids may pose a risk of environmental contamination.

**Keywords:** vancomycin resistant enterococci; wildlife; Burda; antibiotic resistance

#### Úvod

Antibiotická politika USA, Kanady a Európy sa významne líši. Kolonizácia vankomycín rezistentnými enterokokmi (VRE) sa v USA vyskytuje takmer výhradne v nemocniciach (Ghosh *et al.*, 2012), zatiaľ čo v Európe je nemocničný výskyt iba sporadický a kolonizácia VRE je častejšia u hospodárskych zvierat (Bager *et al.*, 1997). Výskyt VRE v Kanade je vo všeobecnosti relatívne nízky. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať výskyt a vlastnosti izolátov s *vanA* génom, vyizolovaných z vrany krátkozobej (*Corvus brachyrhynchos*) v USA a v Kanade, a z havrana poľného (*Corvus frugilegus*) v Európe.

#### Materiál a metódy

Vzorky trusu boli zbierané na nocoviskách v 8 európskych štátoch (zima 2010/2011), v 4 štátoch USA (zima 2011/2012) a v 3 provinciách Kanady. Následne boli vzorky selektívne kultivované, a bola otestovaná minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) k vankomycínu,

citlivosť k ostatným antibiotikám diskovou difúznou metódou, ako aj výskyt génov rezistencie a virulencie pomocou PCR. Epidemiologická príbuznosť *vanA*-nesúcich izolátov bola testovaná pomocou pulznej gélovej elektroforézy (PFGE) a MLST analýzy (multi-locus sequence typing). U izolátov bola testovaná *in vitro* schopnosť horizontálneho prenosu *vanA* génu.

### Výsledky

VRE s *vanA* génom boli nájdené u 15 (2,5%) z 590 vzoriek z USA, u 8 (0,7%) z 1073 vzoriek z Európy. Zo 400 vzoriek z Kanady boli VRE identifikované iba u jednej (0,3%). Z morfológicky odlišných kolónií amerických vzoriek bolo získaných 22 rôznych izolátov VRE s *vanA* génom, z nich 14 bolo *E. faecium* a 8 *E. faecalis*. Všetkých 8 európskych a jeden kanadský izolát, patrili k druhu *E. faecium*. V USA pochádzal jeden izolát z Kansasu, dva z New Yorku a 19 z Massachusetts. Z európskych *vanA*-nesúcich izolátov pochádzalo 7 z Českej republiky a jeden z Nemecka. Izolát z Kanady bol z ostrova Princa Edwarda. Okrem vankomycínu boli izoláty najčastejšie rezistentné k erytromycínu, tetracyklínu a ampicilínu. Rezistencia k erytromycínu bola spôsobená prítomnosťou *ermB* génu, tetracyklínová rezistencia bola kódovaná génmi *tetM* a *tetL*. U niektorých izolátov zo Severnej Ameriky sa vyskytovali aj gény virulencie – *esp*, *gelE*, *cylA* a *asaI*, zatiaľ čo všetky európske izoláty boli týchto génov prosté. Na základe MLST boli izoláty *E. faecium* z USA typizované ako ST (sekvenčný typ) 18 (6 izolátov), ST555 (2) a nové typy ST749 (1), ST750 (3), ST751 (1), ST752 (1), kým *E. faecium* z Európy patrili do ST 92 (6), ST121(1), ST(671). Izolát z Kanady patril k ST448. *E. faecalis* boli zaradené do ST6 (1), ST16 (3) a ST179 (4). Všetky izoláty z USA mali pri konjugácii na filtri vysokú schopnosť prenášať *vanA* gén  $\sim 10^{-3}$  T/D (transkonjugant na donora). Sedem z ôsmich európskych izolátov bolo schopných prenášať *vanA* gén pri nízkej frekvencii  $\sim 10^{-7}$  T/D.

### Diskusia

Šírenie rezistentných mikroorganizmov a génov rezistencie z hospodárskych zvierat a z ľudí do voľne žijúcich zvierat je stále neobjasnené, ale predpokladá sa, že voľne žijúce zvieratá slúžia ako významné rezervoáre rezistencie, ktorú môžu šíriť do životného prostredia aj na veľké vzdialenosti, a to vďaka migráciám a sezónnym presunom (Blanco *et al.*, 2009). Táto štúdia porovnáva vlastnosti VRE nájdených u krkavcovitých vtákov v Severnej Amerike a v Európe. Izoláty z USA niesli rôzne gény virulencie, vykazovali oveľa širšie spektrum antibiotickej rezistencie ako izoláty z Európy a frekvencia horizontálneho prenosu *vanA* génu bola u nich omnoho vyššia. Na základe MLST analýzy, boli izoláty z USA zaradené do klinicky veľmi významných sekvenčných typov, ktoré sú častými pôvodcami nozokomiálnych infekcií (MLST Database, 2013). Naopak, sekvenčné typy európskych izolátov sú spájané s kolonizáciou u hospodárskych zvierat (MLST Database, 2013). Získané výsledky naznačujú, že izoláty zo Severnej Ameriky sú pravdepodobne humánneho klinického pôvodu. Výskyt VRE v nemocniciach v USA je vysoký (CDDEP, 2013), a je možné, že dochádza k šíreniu VRE do životného prostredia. V Európe je výskyt VRE spájaný s niekdajším používaním avoparcínu (glykopeptidové antibiotikum príbuzné vankomycínu) ako rastového stimulátoru u hospodárskych zvierat (Bager *et al.*, 1997). To súhlasí s výsledkami tejto štúdie, keďže izoláty z Európy neniesli žiadne z testovaných génov virulencie a až na antibiotickú rezistenciu vykazovali vlastnosti komenzálnych enterokokov. Predpokladáme teda, že zdrojom VRE pre kolonizáciu havranov v Európe boli hospodárske zvieratá.

### **Záver**

Klinicky významné enterokoky s *vanA* génom sa vyskytujú u voľne žijúcich vrán v USA a u havranov v niektorých európskych štátoch. Úloha migrujúcich vtákov v šírení rezistentných baktérií nie je úplne objasnená, ale prítomnosť klinicky významných enterokokov u krkavcovitých vtákov môže predstavovať riziko kontaminácie životného prostredia.

### **PodĎakovanie**

Táto štúdia bola finančne podporená projektom 'CEITEC - Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

### **Literatúra**

BAGER, F.; MADSEN, M.; CHRISTENSEN, J.; AARESTRUP, F.M. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 1997, vol. 31, no.1-2, s. 95–112.

BLANCO, G.; LEMUS, J.A.; GRANDE, J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environ Res* 2009, vol.109, no. 4, s. 405–412.

CDDEP – The Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (2013) Maps of regional trends – Vancomycinresistant Enterococcus [WWW document].

URL <http://www.cddep.org/resistancemap/bug-drug/VRE#.UUc2G6zcB3s>.

GHOSH, A.; KUKANICH, K.; BROWN, C.E.; ZUREK, L. Resident cats in small animal veterinary hospital carry multi-drug resistant enterococci and are likely involved in cross-contamination of the hospital environment. *Front Microbiol* 2012, vol. 3, no. 62, s. 1-14.

MLST Database (2013) [WWW document]. URL [efaecium.mlst.net/portable/portable.xls](http://efaecium.mlst.net/portable/portable.xls).

**Kontaktná adresa:** Veronika Oravcová, Mgr., Ústav biologie a chorob voľne žijících zvirat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H12006@vfu.cz.

## **Rickettsiae in ornitophilic ticks *Ixodes arboricola* and *Ixodes lividus* from the Czech republic and Slovakia**

**<sup>1,2</sup>Nováková Markéta, <sup>1</sup>Bulková Alexandra, <sup>3</sup>Borges Costa Francisco, <sup>4</sup>Krause František, <sup>5</sup>Kristin Anton, <sup>6</sup>Krist Miloš, <sup>7</sup>Heneberg Petr, <sup>3</sup>Bahía Labruna Marcelo, <sup>1,2</sup>Literák Ivan**

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech republic

<sup>2</sup>CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno Czech republic

<sup>3</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine and Health of Animals, Faculty of Veterinary Medicine and Husbandry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Břeclav, Czech republic

<sup>5</sup>Institute of Forest Ecology, Slovak Academy of Sciences, Zvolen, Slovakia

<sup>6</sup>Department of Zoology and Laboratory of Ornithology, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc, Czech republic

<sup>7</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech republic

### **Summary**

*Ixodes arboricola* and *Ixodes lividus* are ornitophilic nidicolous ticks. Birds are known as reservoirs of some bacterial pathogens. Rickettsiae are obligate intracellular bacteria and some species are causative agents of severe human diseases. Tick-borne rickettsioses belong to the spotted fever group rickettsiae. The aim of this study was to find presence of rickettsiae in ticks *I. arboricola* and *I. lividus* from the Czech republic and Slovakia. Ticks *I. arboricola* were collected from pulli and nests at 2 and 1 localities in the Czech republic and Slovakia, respectively. In total, 166 samples of *I. arboricola* were collected. Ticks *I. lividus* were sampled at 16 localities from nests in the Czech republic. In total, 1759 individuals were found. Randomly selected samples were tested by PCR targeting 2 rickettsial genes. All adults and 82% of nymphs of *I. arboricola* and 100% of *I. lividus* yielded positive results in both genes, so they contained spotted fever group rickettsiae DNA. Sequence analysis of rickettsial DNA from *I. arboricola* provided to identify the rickettsia as *Candidatus Rickettsia vini*. Rickettsial nucleotide sequences acquired from *I. lividus* needs further analysis. Our study showed that ornitophilic ticks represent an important reservoir of rickettsiae. We present the first evidence of *Candidatus Rickettsia vini* from the Czech republic and Slovakia.

**Keywords:** rickettsiae; ticks; birds; *Ixodes arboricola*; *Ixodes lividus*; spotted fever group rickettsiae

### **Introduction**

*Ixodes arboricola* Schulze et Schlotzke, 1929, also known as „the tree-hole tick“, is a nidicolous ectoparasite that feeds on various birds species. *Ixodes lividus* Koch, 1844, is an exclusive ectoparasite of *Riparia riparia* (sand martin). The whole life cycle of these tick species is restricted to different types of cavities, such as tree holes or bird boxes (*I. arboricola*) or tunnels in sand (*I. lividus*). Birds play a significant role as reservoirs of various tick-borne pathogens. Rickettsiae are divided into several groups - spotted fever group (SFG) rickettsiae, typhus group rickettsiae, the *Rickettsia bellii* group, and the *Rickettsia canadensis* group. Tick-borne rickettsioses belong to the SFG and represent emerging and reemerging infections. Recently, *Candidatus Rickettsia vini* has been described as a new rickettsia in *I. arboricola* from Spain. We examined presence of *I. arboricola* and *I. lividus* at appropriate habitats in the Czech Republic and Slovakia and investigated the prevalence of *Rickettsia* spp. in the ticks found.

### **Material and Methods**

**Sampling of *I. arboricola*.** Bird boxes installed in the forests were surveyed at three locations: Břeclav (7 May-21 June 2009, 24 May and 13 June 2013) and Velký Kosíř (1 June, 7 June

and 25 September 2013) both in the Czech Republic, and Ziar nad Hronom (6 June 2013) in Slovakia.

We identified, ringed and examined bird pulli for presence of ticks and put them back into their nests. If there were no nestlings because of mature or predation, nest material was placed into zip-lock plastic bag. In the laboratory, nests were examined for presence of ticks and identified of proper bird species according to characteristic appearance of the nest.

**Sampling of *I. lividus*.** Sand martin nesting holes were surveyed at 16 locations: Pouzdrany, Vemyslice, Bozice Martincova piskovna (2 May and 7 September 2013), Oleksovice, Oslavany (2 May 2013), Bozice CMS (7 September 2013), Roudnice nad Labem, Straskov, Hyskov, Belec, Srbsko, Pnovice (4 May 2013), Liten (4 May and 8 September 2013), Cernuc (8 September 2013), Cep I and Lzin (6 September 2013).

We collected nest material into zip-lock plastic bags that were examined for presence of ticks at laboratory.

Ticks were collected by tweezers and immediately stored in 96% ethyl alcohol to preserve DNA. All ticks were classified to species, stage and blood meal volume.

**DNA analysis.** DNA was extracted from randomly selected individuals. Quality of DNA extraction was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using primers 16S +1 and 16S -1 amplifying a  $\approx$ 460-bp fragment of the tick mitochondrial *16S rDNA* gene. PCR with primers CS-78 and CS-323 was used to amplify 398 bp fragment of the *gltA* gene that presents in all *Rickettsia* species. PCR using primers Rr190.70 and Rr190.602 was performed to amplify a 532-bp fragment, a part of the *ompA* gene that occurs in the majority of SFG rickettsiae. PCR products were purified by ExoSAP-IT® and DNA-sequenced. Sequences were subjected to NCBI nucleotide BLAST analysis to compare to published sequences.

## Results

***I. arboricola* results.** In total, 228 bird boxes were surveyed, in which 454 pulli were examined. 109 nests were observed in a laboratory. In total, 166 ticks *I. arboricola* were found (17 nymphs, 10 males and 139 females). Ten bird species nested in boxes. *I. arboricola* were found in the bird boxes of *Ficedula albicollis*, *Parus major*, *Cyanistes caeruleus* and *Sitta europaea*. The highest abundance of ticks was observed in a lowland flood-plain forest near Breclav. *F. albicollis* was the most frequently infested bird species.

In total, 119 ticks (17 nymphs, 10 males and 92 females) were tested individually for the presence of rickettsiae. All males, all females and 14 nymphs yielded positive results by the *gltA* and *ompA* PCR assays. The three *Rickettsia* spp. negative nymphs were collected from *F. albicollis* in Breclav in 2013.

DNA sequencing of *ompA* partial sequences obtained 100% identity with Candidatus *R. vini* (Spain, JF758828.1).

***I. lividus* results.** In total, 353 nests of *Riparia riparia* from 16 localities were examined. 1759 ticks *I. lividus* (1707 larvae, 16 nymphs, 10 males, 26 females) were found. In total, 39 larvae, 3 nymphs, 2 males and 1 female from 9 localities were tested by PCR as mentioned above. 100% of samples yielded positive results for both genes. Further analysis of nucleotide sequences is needed to identify *Rickettsia* spp.

## Discussion

*I. arboricola* is commonly found in tree cavities in Europe. In this study, we found ticks *I. arboricola* on birds belonging to Passeriformes, which is in compliance with previous studies.



As *ompA* is highly polymorphic gene and it is considered the most valuable for the identification of *Rickettsia* species, analysis of *ompA* sequences showed 100% identity with *Candidatus R. vini*. Using *gltA* sequences did not provide unique identification.

In a previous study, *Rickettsia* sp. was detected in 44% larvae and in 24.5% nymphs of *I. arboricola* from the Czech Republic. Here, we detected a recently described *Candidatus Rickettsia vini* in *I. arboricola* in the Czech Republic and Slovakia. Until now, this rickettsia was found in ticks *I. arboricola* and *I. ricinus* in Spain. All adults and 82% of nymphs were *Candidatus Rickettsia vini*-positive in our study. The different prevalence in comparison to previous results could be caused by more efficient DNA extraction used in this study.

As we sampled *I. lividus* ticks right before and after *R. riparia* breeding season, we found mainly larvae (97%). Other stages are more abundant during breeding season because their life cycle is dependent on host presence. 100% prevalence of SFG *Rickettsia* sp. detected in our study is in compliance to studies from the United Kingdom and Sweden.

By phylogenetic analysis, *Candidatus Rickettsia vini* that was found in *I. arboricola* is closely related to *R. heilongjiangensis* and *R. japonica*. Both these bacteria are human pathogens and have not been reported from Europe. Other rickettsial genospecies that are closely related to *R. heilongjiangensis* have been detected in *Ixodes* spp. (including *I. lividus*) collected from birds in Sweden and the United Kingdom. This high diversity of rickettsial genospecies underlines the importance of birds in the epidemiology of rickettsiae.

## Conclusion

In this study, we detected *Rickettsia* spp. in both ornitophilic tick species with high prevalence. As all *Rickettsia* spp. must be considered potential pathogens, a further study of *Candidatus R. vini* is needed.

## Acknowledgements

We thank Peter Adamik, Libor Schropfer, Pavel Ruzek, Martin Skorpik, Michaela Galova, Miloslava Krauseova and Martin Janca for their cooperation in the field. We appreciate Eva Spitalska's help in the early period of study. We are grateful to Tomas Najer and Álvaro A. Faccini M. for providing skilled advice. The study was supported by the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) of the European Regional Development Fund., FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Project for Consolidation of Student's Mobilities in non-EU Countries (CSM15) of the Faculty of Pharmacy VFU Brno.

## References

The list of references and cited sources is at the authors' disposal on request.

**Contact adress:** Markéta Nováková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, novakovamar@vfu.cz.

# **SEKCE 5**

*Veřejné veterinářství a ochrana zvířat*



## **Effect of heat stress on plasma neopterin and biopterin in broilers with probiotic supplementation.**

**Želinská Gabriela, Bedáňová Iveta, Maršálek Petr, Plhalová Lucie, Chloupek Jan, Voslářová Eva**

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

### **Summary**

*The aim of this experiment was to determine changes in the plasma neopterin, biopterin and corticosterone in poultry fattened under increased ambient temperature with and without probiotic supplementation. In the experiment, a total of 80 ROSS 380 broiler-type chickens was used. Broilers were divided into 4 groups (20 broilers in each group): 1) control group, 2) group supplemented with probiotics, 3) group exposed to heat stress without probiotics supplementation and 4) group exposed to heat stress with probiotics supplementation. Chickens in groups 2 and 4 (supplemented with probiotics) were administered with probiotics Lactiferm® containing  $5 \times 10^9$  CFU of *Enterococcus faecium* M-74 at 1 g quantity of 4 g / l of drinking water from 35 day to 42 day. On the day 42 of age, chickens in groups 3 and 4 were exposed to increased ambient temperature of  $35 \pm 1$  °C for 24 h. On the day 43, blood was taken from all groups by puncturing v. basilica for corticosterone, neopterin and biopterin determination. Plasma neopterin and biopterin concentrations were correlated with corticosterone concentration.*

**Keywords:** *neopterin; biopterin; corticosterone; stress; probiotics; broilers*

### **Introduction**

Increased ambient temperature represents a significant stress factor that negatively affects the welfare of poultry and subsequently negatively affects the quality of meat. The principal stress hormones glucocorticoids and catecholamines affect major immune functions such as antigen presentation, leukocyte proliferation and traffic, secretion of cytokines and antibodies, and the selection of the Th-1 versus Th-2 responses (Elenkov and Chrousos, 2006). Neopterin and biopterin belong to a group of unconjugated pterins, derived from guanosine triphosphate by guanosine triphosphate cyclohydrolase I (Brown, 1971). They were considered as suitable markers of immune system activation under acute stress (Breinekova et al., 2006; Breinekova et al., 2007). Several studies have shown that the addition of probiotics to the diets of broilers leads to improved performance (Jin et al., 1997; 1998). The mechanism of probiotics activity is not yet known and is open for research, although there are several hypotheses. There is increasing evidence to suggest that probiotics may affect stimulation of the host's immune systems (Ahmad, 2006).

### **Material and Methods**

In the experiment, 80 ROSS 380 broiler-type chickens were used. The broilers were obtained from a commercial broiler housing, where they were reared from the first day after hatching on deep litter (wood shavings) with controlled light and heat, hygiene, and feeding patterns corresponding to standard husbandry requirements for meat hybrid poultry. Feed and water were provided ad libitum; the lighting regime was 18 hours of light and 6 hours of darkness. On Day 35, the broilers (total number 80) were transferred to the experimental broiler housing at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. Broilers were divided into 4 groups (20 broilers in each group): 1) control group, 2) group supplemented with probiotics, 3) group exposed to heat stress without probiotics supplementation and 4) group exposed to heat stress with probiotics supplementation. Chickens in groups 1 and 2 (supplemented with probiotics) were administered with probiotics Lactiferm® containing  $5 \times 10^9$  CFU of *Enterococcus faecium* M-74 at 1 g quantity of 4 g / l of drinking water from 35 day to 42 day.

On the day 42, chickens (groups 3 and 4) were exposed to increased ambient temperature of  $35 \pm 1$  °C for 24 h. On the day 43, blood was taken from all groups by puncturing v. basilica for corticosterone, neopterin and biopterin determination. Plasma neopterin and biopterin concentrations were correlated with corticosterone as a marker of neuroendocrine activity.

The measurement of neopterin and biopterin was based on high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (Carru et al., 2004). All samples and pterin solutions were protected against light when handled. Detection limits for neopterin and biopterin were 0.23 and 0.41 ng/mL, respectively. The limits of quantification for neopterin and biopterin were 0.75 and 1.35 ng/mL, respectively. The coefficient of variation was 3.8%.

The plasma corticosterone concentration was measured on the principle of photometric detection using a commercial Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). The detection limit for corticosterone was 0.03 ng/mL. The limit of quantification for corticosterone was 0.1 ng/mL. The intra-assay CV was 6.2%.

The results were analyzed using the statistical package Unistat 5.1. (Unistat Ltd., GB). The data was subjected to a two-way ANOVA using the general linear model procedure with two fixed effects: Heat treatment with 2 levels (33 °C, 21 °C) and Probiotic treatment with 2 levels (Probiotics, Control) along with their interactions. When the effect was statistically significant, the Tukey-HSD test (Zar, 1999) was performed as a post hoc test for pairwise comparisons. To assess correlations in the experiment, A Spearman rank correlation coefficients (Zar, 1999) were calculated among monitored stress indices.

## Results and Discussion

The results of biochemical examinations in broiler chickens treated with probiotics under heat stress (33°C for 24 h) are given in Table 1. An ANOVA revealed a heat treatment effect on plasma corticosterone ( $P < 0.001$ ), neopterin ( $P < 0.001$ ) and biopterin ( $P < 0.001$ ). While both corticosterone and neopterin levels in broilers under heat stress increased approximately twice (from 0.38 to 0.84 ng/mL and 17.9 to 32.6 nmol/L, respectively), biopterin concentration was elevated from 142.3 to 181.1 nmol/L. The increase in biopterin concentrations were detected in adult pigs transported to the slaughterhouse (Breinekova et al., 2006) and in neonatal piglets in the acute stage of hypoxia-ischemia (Fujioka et al., 2008). Smutna et al. (2010) observed an increase in plasma neopterin and biopterin levels in pigs already an hour after Fe<sup>3+</sup>-dextran administration that produces a special stress situation.

Heat stress stimulates the release of corticosterone from the adrenal gland, initiates lipid peroxidation in the cell membrane and leads to the generation of free radicals (Etches et al., 1995). Kataria et al. (2008) observed the effect of high ambient temperature on increased levels of corticosterone. They stated that the ambient temperature of 42-45 °C during the fattening of broilers led to an increase in corticosterone levels compared to broilers fattened at temperatures of 24-27 °C.

In our experiment, we found also a highly significant correlation between corticosterone level and plasma neopterin concentration ( $r = 0.404$ ,  $p < 0.001$ ) and between corticosterone level and plasma biopterin concentration ( $r = 0.502$ ,  $p < 0.001$ ). This suggests that biopterin and neopterin may serve as possible additional stress markers in broilers in the case of acute heat stress.

In addition, a probiotic treatment effect ( $P < 0.001$ ) on plasma neopterin was revealed in our study, with higher neopterin level in broilers treated with probiotics irrespective to heat stress. No effect of probiotic treatment was found in corticosterone and biopterin levels. Further, there were no interaction effects between heat and probiotic treatment in plasma corticosterone, neopterin and biopterin revealed in our study. Havenaar and Spanhaak (1994)

has reported that probiotics stimulate the immunity of the chickens. Also Jin et al. (1997) suggest probiotics exert an essential role in stimulating the immune system in avian. Several studies have reported that the neuro-endocrine system is ultimately involved in the response of immune and epithelial systems to stress (Cook, 1994; Kohm and Sanders, 2000; Levite, 2001).

Table 1: Effect of heat stress (33°C for 24 h) on selected biochemical indices of broilers (n = 80) treated with probiotics (*Enterococcus faecium* M-74;  $7.5 \times 10^9$  CFU/l) in drinking water and untreated control broilers.

Effect	Indicator		
	Corticosterone (ng/mL)	Neopterin (nmol/L)	Biopterin (nmol/L)
Heat treatment			
21°C	0.38 <sup>b</sup>	17.9 <sup>b</sup>	142.3 <sup>b</sup>
33°C	0.84 <sup>a</sup>	32.6 <sup>a</sup>	181.1 <sup>a</sup>
SEM	0.06	0.03	5.86
Probiotic treatment			
Control	0.62 <sup>a</sup>	20.6 <sup>b</sup>	157.5 <sup>a</sup>
Probiotics	0.60 <sup>a</sup>	29.9 <sup>a</sup>	165.9 <sup>a</sup>
SEM	0.07	0.04	7.26
ANOVA	Significance (P)		
Heat treatment (H)	<0.001	<0.001	<0.001
Probiotic treatment (P)	N.S.	<0.001	N.S.
T × C	N.S.	N.S.	N.S.

<sup>a,b</sup> = Means within the same effect and column lacking a common letter of superscript differ significantly (P < 0.05)

### Conclusion

In our experiment, we found an increased plasma neopterin, biopterin and corticosterone in broilers due to high ambient temperature (35°C) for 24 hours. A strong positive correlation between corticosterone and neopterin and biopterin was also found. Based on that, we may consider biopterin and neopterin to be possible additional stress markers in broilers in the case of acute heat stress.

### Acknowledgments

This work was supported by the Internal Grant Agency of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno 28/2013/FVHE.

### References

References are available from the authors.

**Contact address:** Gabriela Želinská, MVDr., Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, FVHE VFU Brno, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, H11007@vfu.cz.

## Behaviour patterns of pheasant hens kept in enriched cages during the laying period

<sup>1</sup>Hrabčáková Petra, <sup>2</sup>Radisavljević Katarina, <sup>1</sup>Voslářová Eva, <sup>1</sup>Bedáňová Iveta

<sup>1</sup>Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Animal Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Serbia

### Summary

The aim of our study was to investigate the behaviour patterns of cage-housed pheasant hens during the laying period. The laying hens were housed in cages enriched with two perches and a hiding place. Monitored behaviour patterns were feeding, drinking, defecation, movement, resting, scratching, preening, stereotype behaviour, mating, feather pecking and aggression. The results determined provide new information about behaviour of common pheasant hens during the laying period.

**Keywords:** pheasant; behaviour; enrichment; laying period

### Introduction

In Czech pheasantries the substantial number of raised breeding pheasants in the breeding season is housed in cage systems. This method of breeding occurs currently also in other countries (Zapletal et al., 2010). An appropriate environmental design is considered fundamental to ensure bird welfare (Campo and Prieto 2009). Animal well-being can be improved by housing the animals in species-specific natural or near-to-natural environments (Duncan et al., 1992; Pohle and Cheng, 2009). An enriched environment is one of the ways how to improve animal welfare during the housing (Tactacan, 2009; Jendral et al., 2005; Pavlik et al., 2008).

Creating the optimum environment for animals is a key prerequisite for animal welfare. In poultry raising, the results of production performance, health and behaviour patterns in birds document to which extent the respective conditions of husbandry satisfy the needs of animals (Appleby et al., 2004). Thorough knowledge of pheasants behaviour is necessary for positive results in game birds husbandry.

The aim of our study was to investigate the behaviour patterns of pheasant hens housed in enriched cage system during one day of laying period.

### Materials and Methods

#### *The birds and their treatment*

The monitoring of ethological activities was performed on the pheasant hens housed in a two-tiered cage battery from the beginning of the laying period. Each cage was enriched with two perches and a place to hide created by strips of cloth hung in one corner of the cage, separating this corner from the rest of the cage. Neither cauterisation nor clip-on spectacles were used in this group.

The main aim of the study was to analyze an objective video recording birds' behaviour throughout the light day, i.e. from 7:00 a.m. until 7:15 p.m. In principle, 15-minute segments at the beginning of every hour (i.e. at 7:00 a.m., 8:00 a.m., 9:00 a.m., etc.) were analyzed for each hen, i.e. total analyzed time was 195 minutes for each hen. The following behaviour patterns were monitored: Feeding, Drinking, Defecation, Movement, Resting, Scratching, Preening, Stereotype behaviour, Mating, Feather pecking, Aggression. Ethograms of

individual female pheasants were evaluated followed by calculating the average frequency of particular behaviour patterns in all hens within the monitored period.

### Results and Discussion

The frequency of evaluated behaviour patterns in female pheasants during the monitored time segments is provided in Table 1.

Table 1: Behaviour patterns of pheasant hens during one day of laying period.

Behaviour	Feeding	Drinking	Defecation	Movement	Resting	Scratching	Preening	Stereotype behaviour	Mating	Feather pecking	Aggression	Total
Minutes	11.4	6.2	3.0	23.2	67.0	0.6	15.2	45.6	1.2	14.6	7.0	195.0
%	5.8	3.18	1.54	11.9	34.4	0.31	7.79	23.4	0.62	7.49	3.59	100.0

The most observed activities in monitored pheasant hens housed in enriched cages were resting (34.4%) and stereotype behaviour (23.4%). Resting is among behaviour patterns with a generally highest rate during the day (Zapletal et al., 2011). Fraser and Broom (1997) have reported that the stereotypes occur in situations where an individual lacks control of its environment. Movement of birds includes a variety of locomotor activity. According to Hughes and Appleby (1989), cages enriched using perches may influence the increase in physical activity. Movement (11.9%) was the third most frequent activity in pheasant hens in our ethological study. Preening as such is very important to birds since it helps keep the feathers well groomed (Ostfeld and Lewis, 1999). In our study, preening was observed in 7.79% of the monitored time. Also feather pecking (7.49%) and aggression (3.59%) in pheasant hens were recorded during monitored period. Enriched cages in laying hens have resulted in better bone quality, which may have been brought about from increased activity (Tactacan, 2009). The issue of enriched cages and their influence on aggression levels, lower body weight and feather pecking has also been addressed by Jendral et al. (2005) and Pavlik et al. (2008). Activities such as feeding (5.8%) and drinking (3.18%) were less represented during the monitored period in comparison with other activities. The lowest frequency was recorded for the activities such as defecation (1.54%), scratching (0.31%) and mating (0.62%).

The results determined in our study provide new information about behaviour patterns of common pheasant hens housed in enriched cage system during the laying period.

### Acknowledgements

This study was supported by the Research Project No MSM6215712402 Veterinary Aspects of Food Safety and Quality.

### References

- APPLEBY, M. C.; MENCH, J. A.; HUGHES, B. O. Poultry behaviour and welfare. *Wallingford: CABI*. 2004, p. 276.
- CAMPO, J.L.; PRIETO, M.T. Effects of moist litter, perches, and droppings pit on fluctuating asymmetry, tonic immobility duration, and heterophil-to-lymphocyte ratio of laying hens. *Poultry Science*. 2009, vol. 88, pp. 708-713.



DUNCAN, E.T.; APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O. Effect of perches in laying cages on welfare and production of hens. *British Poultry Science*. 1992, vol. 33, pp. 25-35.

FRASER, A.F.; BROOM, D.M. Farm animal behaviour and welfare. 3rd edition. *Wallingford: CABI*. 1997, p. 437.

HUGHES, B. O.; APPLEBY, M. C. Increase in bone strength of spent laying hens housed in modified cages with perches. *Veterinary Record*. 1989, vol. 124, pp. 483-484.

JENDRAL, M.J.; FEDDES, J.J.R.; CHURCH, J.S. Enriched housing environments for layer hens. Behaviour and production. *Proceedings of the 7th International Livestock Environment Symposium*, Beijing, China, 2005, pp. 636-643.

OSTFELD, R.S.; LEWIS, D.N. Experimental studies of interactions between wild turkeys blacklegged ticks. *Journal of Vector Ecology*. 1999, vol. 24, pp. 182-186.

PAVLIK, A.; JEZOVA, D.; ZAPLETAL, D.; BAKOS, J.; JELINEK, P. Impact of housing technology on blood plasma corticosterone levels on laying hens. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2008, vol. 56, pp. 515-527.

POHLE, K.; CHENG, H.W. Comparative effects of furnished and battery cages on egg production and physiological parameters in White Leghorn hens. *Poultry Science*. 2009, vol. 88, pp. 2042-2051.

TACTACAN, G.B.; GUENTER, W.; LEWIS, N.J.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; HOUSE, J.D. Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. *Poultry Science*. 2009, vol. 88, pp. 698-707.

ZAPLETAL, D.; VITULA, F.; STRAKOVÁ, E.; KROUPA, L.; SUCHÝ, P. Výskyt agresivních forem chování u snáškového kmene bažantů v klecové technologii během dne. In: *Ochrana zvířat a welfare*. 2010, Brno, VFU Brno, pp. 301-306.

ZAPLETAL, D. ; SUCHY, P.; STRAKOVA, E.; VITULA, F.; KUČHTIK, J. Behaviour patterns of the cage-housed breeding flock pheasants (*phasianus colchicus*). *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendeliana brunensis*. 2011, vol. LIX, no. 28, pp. 215-220.

**Contact address:** Petra Hrabčáková, Mgr., Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, hrabcakovap@vfu.cz.

## The content of polyamines (spermine and spermidine) in the muscles of selected kind of wild animals

Hutařová Zdeňka, Večerek Vladimír

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary hygiene and Ecology,  
Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare

### Summary

The content of polyamines spermine and spermidine in muscles of selected game, was observed in the study. For purposes of this study the carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*), wild boar (*Sus scrofa*) and European hare (*Lepus europaeus*) hunted by huntsmen were used ( $n = 10$  of each selected kind). The carcasses of selected wild animals were stored at the temperature  $0 - 7^{\circ}\text{C}$  for 21 days. For assessment of polyamine content the muscle samples (shoulder leg and hind leg) were taken at 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> day of storage. Polyamines (spermine and spermidine) were separated and quantified by reverse phase liquid chromatography. Even if the changes of polyamine concentrations during the storage time were not sizable, higher concentrations (mg/kg) of both polyamines were observed at the end of storage time. The highest spermidine concentrations were assessed in muscles of European hare  $1.26 \pm 0.900$ ; followed by roe deer  $1.02 \pm 0.220$  and the least amount was observed in wild boar muscles  $0.82 \pm 0.194$ . Spermine concentrations (mg/kg) were at highest levels observed in muscles of wild boar  $30.26 \pm 2.786$ ; then roe deer  $29.02 \pm 5.796$  and finally European hare  $24.96 \pm 6.930$ .

**Keywords:** biogenic amines; European hare; liquid chromatography; roe deer; wild boar

### Introduction

Biogenic amines and the polyamines are organic compounds that are natural constituents of living cells (Paulsen et al., 2008). Due to their different biological roles and mode of formation, polyamines started to be separated from their traditional classification within biogenic amines (Dadáková et al., 2012). Polyamines are involved in numerous biochemical and physiological activities, including cell proliferation and differentiation (Zoumas – Morse et al., 2007). Furthermore polyamines are supposed to be involved in tumor development. The polyamine body pool is maintained by three primary sources: endogenous synthesis, production by intestinal microorganisms and contribution from the diet (Dadáková et al. 2012, Zoumas-Morse et al., 2007). Information on the polyamine content in foods is thus in great interest of many researchers to assess their dietary intake (Kalač and Krausová, 2005; Dadáková et al., 2012).

Authors of previously presented studies assessed the polyamine content in rabbits (Dadáková et al., 2012), ducks (Dadáková et al., 2012), chicken (Kozová et al., 2009), lamb and sheep (Dadáková et al., 2012) pork and beef meat (Kalač, 2006). Available information about polyamine content in muscles of wild animals is however very limited.

The objective of this study was thus to determine polyamines (spermine and spermidine content) in raw meat of selected kind of wild animals (wild boar, roe deer, and European hare) and assesses the changes in the polyamine content during the storage.

### Materials and Methods

For purposes of this study were used carcasses of selected wild game – wild boar (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and European hare (*Lepus europaeus*). Hunted carcasses of these wild animals were stored at temperature range  $1-7^{\circ}\text{C}$  for 21 days. Meat samples were collected from shoulder or hind leg muscles ( $n= 20$  form each selected species;  $m=0.5$  g) at the beginning (1<sup>st</sup> day) and at the end (21<sup>st</sup> day) of storage.

Measurement of polyamines (spermine and spermidine) was based on high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry. Normal distribution of data was proved for statistical analysis. Statistical significance of changes in the concentrations was tested by Student's test. A significance level of P value < 0.05 was considered as statistically significant.

## Results

Result concentration assessed in muscles of selected game animals are show in figures 1 and 2.

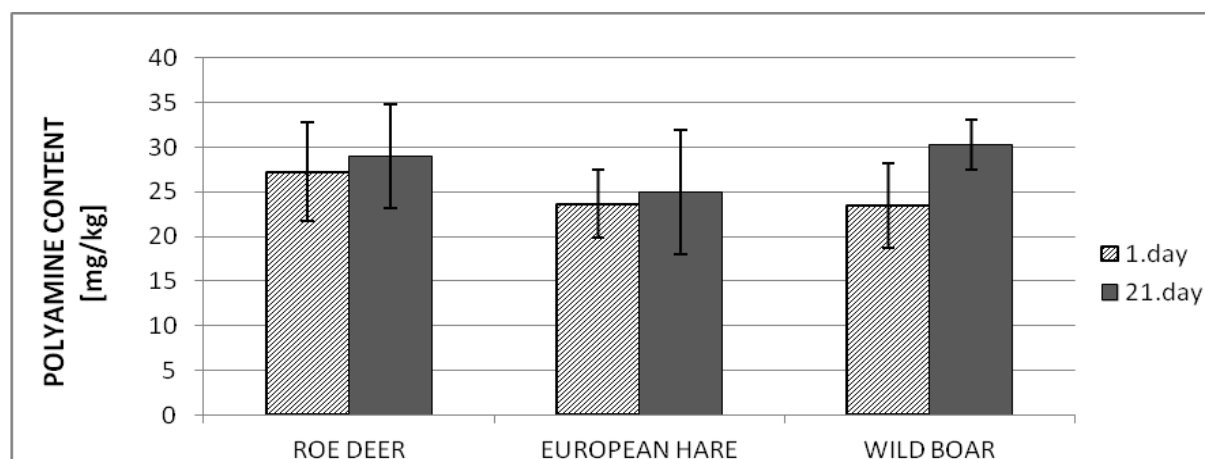


Figure 1: Spermine content in muscles of selected wild game stored at temperature 1-7°C for 21 days.

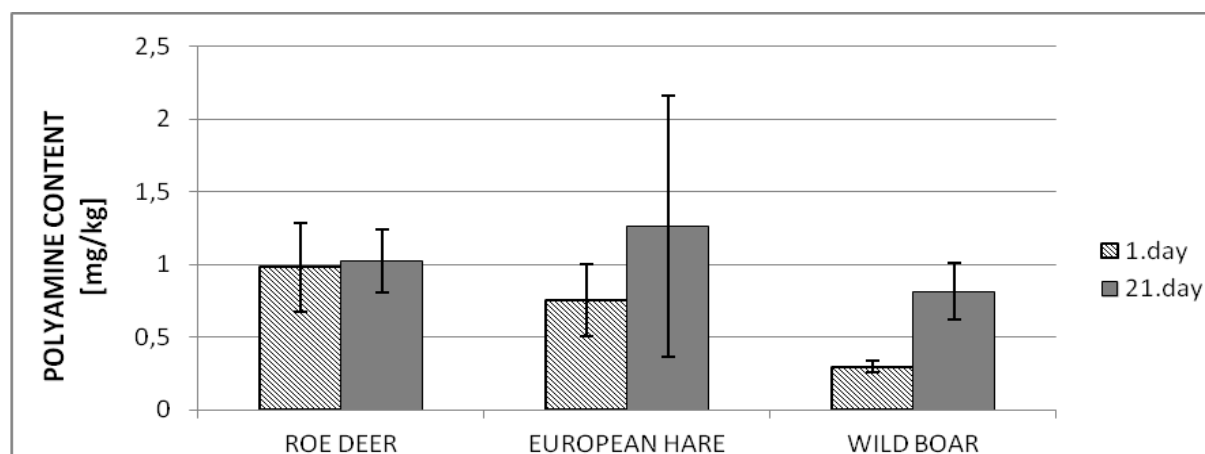


Figure 2: Spermidine content in muscles of selected wild game stored at temperature range 1-7°C for 21 days.

## Discussion

Obviously higher concentrations were observed in spermine compared to spermidine. Higher spermine contents as compared to spermidine contents are usual in foods of animal origin, while the opposite is observed in food of plant origin (Kalač and Krausová, 2005). Even if the changes of polyamine concentrations during the storage time were not sizable, higher concentrations (mg/kg) of both polyamines were observed at the end of storage time. Statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) of both polyamines (spermine and spermidine) was assessed in wild boar meat.

Polyamines concentration (mg/kg) assessed in muscles of European hare were  $1.26 \pm 0.90$  and  $24.96 \pm 6.93$  for spermidine and spermine respectively. When compare our results with those presented for rabbit meat - leg muscle (Dadáková et al., 2012), higher concentrations were assessed in spermidine concentration ( $2.2 \pm 0.6$  mg/kg for rabbit leg muscle), while obviously lower concentration was observed in spermine ( $8.0 \pm 0.7$  mg/kg for rabbit leg muscle).

Second highest polyamine concentrations (mg/kg) among kinds of venison studied in our work were assessed in roe deer meat ( $1.02 \pm 0.220$  and  $29.02 \pm 5.796$  for spermidine and spermine respectively). Compared to results of previously presented studies (Krausová et al., 2006; Dadáková et al., 2011) concerning polyamine concentrations in muscles of certain kinds of farm animals (lamb leg muscle  $4.2 \pm 1.6$  and  $17.2 \pm 2.2$  mg/kg for spermidine and spermine respectively; beef muscles  $1.2 - 2.4$  mg/kg for spermidine and  $22 \pm 5.6$  mg/kg for spermine) there is obviously lower spermidine concentration and higher spermine concentration in roe deer meet.

Polyamine concentrations in wild boar muscles were  $0.82 \pm 0.19$  and  $30.26 \pm 2.78$  mg/kg for spermidine and spermine respectively. Higher spermidine concentrations ( $1.3-5.6$  mg/kg) and lower spermine concentrations ( $18.3 - 28.4$  mg/kg) were presented by Krausová et al. (2006) for pork meet.

### **Conclusion**

Knowledge on the content of intestinally absorbed dietary polyamines is required due to their special participation on many physiological processes in human body. Results assessed in our study show the highest spermidine concentrations in muscles of European hare followed by roe deer and the least amount was observed in wild boar muscles. Spermine concentrations were at highest levels observed in muscles of wild boars, subsequently in muscles of roe deer and finally in muscles of European hare.

Based on our results it seems that venison contain higher spermidine concentrations and lower spermine concentrations as compared to farm animals.

### **Acknowledgements**

This study was supported by IGA VFU Brno 13/2013/FVHE and 13/2012/FVHE.

### **References**

For references, please contact corresponding author.

**Contact address:** Zdeňka Hutařová, MVDr., UVPS Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, Palackého tř. 1/3, 612 42, hutarovaz@vfu.cz.

# SEKCE 6

*Veterinární toxikologie a toxikologie potravin*



## Monitorování obsahu PAH na vybraných tocích České republiky s využitím biochemického markeru 1-hydroxypyrenu

### Monitoring of PAH contamination in selected Czech rivers using biochemical marker - 1-hydroxypyrene

<sup>1</sup>Divišová Lenka, <sup>1</sup>Blahová Jana, <sup>2</sup>Kodeš Vít, <sup>2</sup>Leontovyčová Drahomíra, <sup>3</sup>Mach Samuel, <sup>3</sup>Ocelka Tomáš, <sup>1</sup>Svobodová Zdeňka

<sup>1</sup> Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno

<sup>2</sup> Český hydrometeorologický ústav, Praha

<sup>3</sup> Zdravotní ústav Ostrava, Ostrava

#### Summary

*This study investigated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) pollution of selected rivers in the Czech Republic. Integrated evaluation was carried out using combination of chemical and biological monitoring, in which we measured content of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in chub bile and priority PAH in water samples obtained by exposing the semipermeable membrane devices at each location. The concentrations of 1-OHP in bile samples and sum of priority PAH in water sampler ranged from 6.8 ng.mg protein<sup>-1</sup> to 106.6 ng.mg protein<sup>-1</sup> and from 5.2 ng.L<sup>-1</sup> to 173.9 ng.L<sup>-1</sup>, respectively. The highest levels of biliary metabolite and PAH in water were measured at the Odra River (the Bohumín site), which is located in relatively heavily industrialized and polluted region. Statistically significant positive correlation between biliary 1-OHP and sum of PAH in water was also obtained ( $P < 0.01$ ,  $r_s = 0.806$ ).*

**Keywords:** polycyclic aromatic-hydrocarbons; organic pollutants; semipermeable-membrane devices; organic pollutants; fish bile; biomarkers

#### Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) představují skupinu lipofilních organických sloučenin přítomných ve všech složkách a oblastech životního prostředí. Do prostředí vstupují nejčastěji při spalování fosilních paliv, jako vedlejší produkty průmyslových výrobních procesů, během kulinářské úpravy potravin a v menší míře i z přírodních zdrojů. Mnohé z nich jsou hodnoceny jako potenciální mutageny a karcinogeny (Douben, 2003). Ve vodním prostředí se PAH vyskytují především v abiotických matricích (voda, sediment, suspendovaný materiál). Mezi hlavní zdroje PAH ve vodách patří vypouštění domácích a průmyslových odpadů a atmosférické depozice. Nejčastěji používaným metabolitem pro hodnocení expozice PAH ve vodním prostředí je 1-hydroxypyren (1-OHP) (Hosnedl et al., 2003). Stanovení 1-OHP ve žluči je konvenční a relativně rychlá metoda využívaná při hodnocení kontaminace ryb PAH.

#### Cíl práce

Cílem práce bylo zhodnotit kontaminaci významným říčních lokalit na území ČR polycyklickými aromatickými uhlovodíky. Dalším cílem bylo posoudit vypovídací schopnost biomonitoringu na základě korelace mezi hodnotou 1-OHP ve žluči ryb a koncentrací PAH ve vodě zjišťovanou dlouhodobým měřením pomocí pasivních vzorkovačů.

#### Materiál a metodika

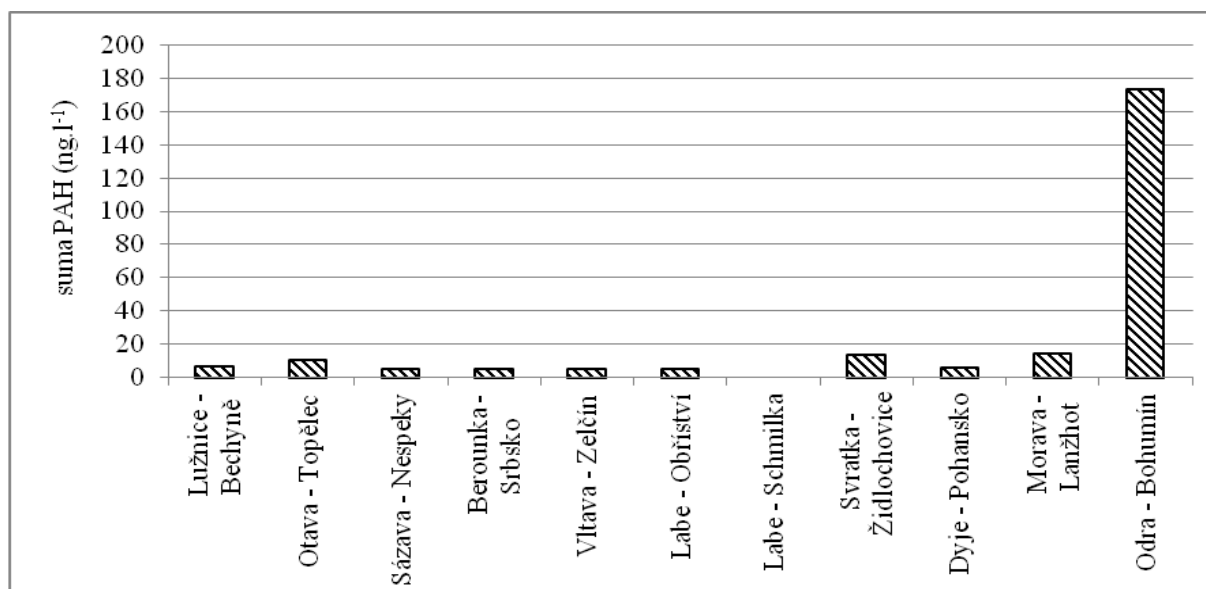
Terénní studie byla provedena na deseti hlavních řekách České republiky, na kterých bylo vybráno celkem 11 lokalit. Vybrané lokality byly následující: Lužnice (řeka Bechyně), Topělec (řeka Otava), Nespeky (řeka Sázava), Srbsko (řeka Berounka), Zelčín (řeka Vltava), Obříství (řeka Labe), Schmilka (řeka Labe), Židlochovice (řeka Svratka), Pohansko (řeka

Dyje), Lanžhot (řeka Morava) a Bohumín (řeka Odra). Na sledovaných lokalitách byly instalovány pasivní vzorkače (semipermeabilní membrána - SPMD) po dobu 4 týdnů. Dále byl na uvedených lokalitách proveden odlov ryb. Jako indikátorový druh byl zvolen jelec tlušť (*Leuciscus cephalus* L.). Ve žluči bylo následně provedeno stanovení 1-OHP pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Obsah 1-OHP byl normalizován na obsah proteinu, který byl stanoven spektrofotometricky.

### Výsledky a diskuze

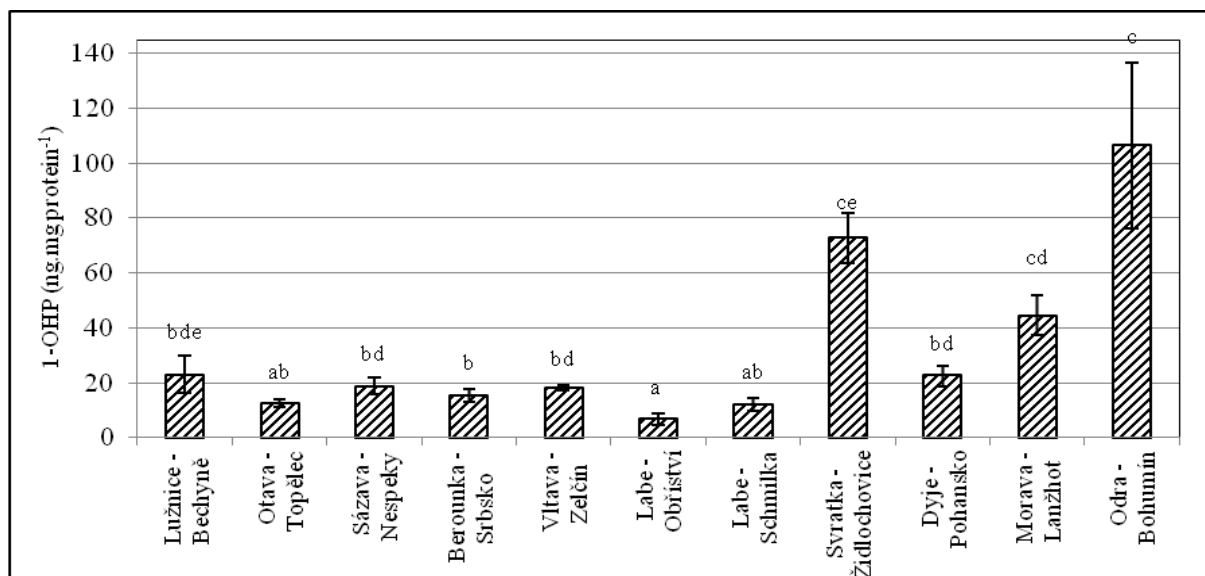
Výsledky obsahu sumy 16 prioritních PAH v pasivních vzorkovačích jsou uvedeny v grafu č. 1. Nejvyšší obsah byl naměřen v lokalitě Bohumín (řeka Odra 173,9 ng.l<sup>-1</sup>), kdy tato hodnota byla více než třicetkrát vyšší než na lokalitě Obříství (řeka Labe 5,2 ng.l<sup>-1</sup>), kde byla zjištěna nejnižší koncentrace PAH. Hodnoty obsahu individuálních PAH na sledovaných lokalitách se pohybovaly v rozmezí nedetekovaných koncentrací až 89 ng.l<sup>-1</sup>. Majoritními zástupci byly tří- a čtyřjaderné sloučeniny jako jsou acenaftalen, fenantren, fluoren, fluranten a pyren. Naopak nejméně zastoupeným PAH byl dibenzo(*ah*)antracen, který byl detekován jen na dvou lokalitách.

Výsledky obsahu 1-OHP ve vzorcích žluči jsou uvedeny v grafu č. 2. Nejnižší obsah byl naměřen na lokalitě Obříství (řeka Labe 2,2 ng.mg protein<sup>-1</sup>) a nejvyšší obsah byl naměřen na lokalitě Bohumín (řeka Odra 165,2 ng.mg protein<sup>-1</sup>). Obsah 1-OHP zjištěný v lokalitě Bohumín se statisticky významně lišil od všech ostatních lokalit s výjimkou lokalit Morava - Lanžhot a Svatka Židlochovice. Byla také prokázána statisticky vysoce významná korelace ( $p < 0,01$ ) mezi 1-OHP a součtem prioritní PAH ve vzorkovačích ( $r = 0,806$ ). Námi zjištěné výsledky jsou ve shodě se závěry ostatních autorů (Van der Oost et al., 1994; Hosnedl et al., 2003). Hosnedl et al. (2003) sledoval zatížení řeky Vltavy a Labe některými důležitými perzistentními organickými polutanty, mimo jiné i PAH. Ve své studii také prokázali statistickou významnou pozitivní korelaci ( $p < 0,05$ ) mezi obsahem 1-OHP a PAH pro jelce tluště ( $r = 0,81$ ) a cejna velkého ( $r = 0,76$ ).



Graf 1: Suma prioritních PAH v pasivních vzorkovačích.





Graf 2: Obsah 1-OHP ve vzorcích žluči jelce tlouště. Rozdílná písmena znamenají statisticky významné rozdíly mezi lokalitami ( $p < 0,05$ ).

### Závěr

Z uvedených výsledků je zřejmé, že 1-OHP je vhodným biomarkerem pro hodnocení zatížení vodního prostředí PAH. Stanovení tohoto metabolitu v moči se velmi často také používá jako biochemický marker pro stanovení expozice PAH u lidí, zvláště u kuřáků, řidičů nebo pracovníků v hutním a těžebním průmyslu.

### Literatura

DOUBEN, P. E. T., editor. *PAHs: An ecotoxicological perspective*. Bedford: John Wiley and Sons Ltd. 2003, 392 p.

HOSNEDL, T., HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V., TOMANIOVÁ, M., VOLKA, K. 1-Hydroxypyrene as a biomarker for fish exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003, vol. 71, no. 3, p. 465–472.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMUELEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, vol. 13, no. 2, p. 57–149.

**Kontaktní adresa:** Lenka Divišová, Mgr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE, VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, [divisoval@vfu.cz](mailto:divisoval@vfu.cz).

## Evaluation of norfloxacin toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress

**Bartošková Marta, Dobšíková Radka, Stancová Vlasta, Pána Ondřej, Živná Dana, Plhalová Lucie, Blahová Jana, Maršálek Petr**

*Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic*

### **Summary**

*The aim of the study was to investigate the effects of subchronic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to a fluoroquinolone norfloxacin, using selected oxidative stress parameters as a target. Toxicity test was performed on zebrafish according to the OECD Guideline No. 215 (subchronic toxicity test). In the test, there was found a significant ( $p < 0.01$ ) increase in the activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT). Norfloxacin did not affect lipid peroxidation (TBARS) and catalytic activity of glutathione reductase (GR). From the results we can conclude that norfloxacin has a negative impact on specific biochemical processes connected with the production of reactive oxygen species in fish tested.*

**Keywords:** *fluoroquinolone; fish; toxicity test; oxidative stress enzymes; lipid peroxidation*

### **Introduction**

Fluoroquinolone antibacterial agents are widely used for the treatment of various infections, especially against gram-negative bacteria (Owens et al. 2005). Fluoroquinolones are among the antimicrobial chemotherapeutics frequently detected in the aquatic environment in relatively high concentrations ranging from  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Their ubiquitous presence has been reported for example in waste water treatment plant influents (Vieno et al. 2007), as well as in groundwater (Andreozzi et al. 2003), surface waters (Kolpin et al. 2002), and even in drinking water (Barnes et al. 2008).

These drugs are rather resistant to microbial degradation (Kümmerer et al. 2000) and may persist in water bodies because of their strong sorption properties. Photodegradation is expected to play an important role in fluoroquinolone fate in some sunlit surface waters (Wammer et al. 2013). Also chemical oxidation may be significant for their degradation (Huber et al. 2003).

Norfloxacin is a synthetic chemotherapeutic agent usually used to treat urinary tract infections (Nelson et al. 2007, Rafalsky et al. 2006). Norfloxacin belongs to the third generation of quinolones. The mechanism of norfoxacin action is the inhibition of DNA gyrase (a type II topoisomerase), which is an essential bacterial enzyme (Wolfson et al. 1985). NOEC (“no observed effect concentration”) for norfloxacin was determined  $10.38 \mu\text{g L}^{-1}$  by long-term bioluminescence inhibition assay with *V. fischeri* (Backhaus et al. 2000). The  $\text{EC}_{50}$  and NOEC of this compound for *Chlorella vulgaris* are  $10.4$  and  $4.1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively (Eguch et al. 2004).

The aim of this study was to investigate the subchronic effect of norfloxacin on zebrafish (*Danio rerio*). For the determination of norfloxacin effects, selected oxidative stress parameters such as glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, catalase and lipid peroxidation were used as a target.

## Materials and Methods

Subchronic toxicity test of norfloxacin was performed according to OECD Guideline No. 215. In the test, juvenile (30-day-old) zebrafish (*Danio rerio*) were used. Fish had been acclimatized for 14 days before the test started.

Norfloxacin was dissolved in water using DMSO in volume of 2  $\mu\text{L L}^{-1}$  as a solvent. Fish were exposed to five ascendant sublethal concentrations, i.e. 0.0001 (an environmental concentration), 0.1, 1, 10, and 30  $\text{mg L}^{-1}$  (all in a duplicate). In the test, two control groups (the first one with only water, the second one with water and solvent, DMSO) were used. Fish were randomly distributed into 30 liter glass aquaria, 50 specimens in each aquarium. Total of 600 fish was used in the test.

The experiment was conducted in a flow-through system with a test solution renewal every twelve hours. During the test, water condition parameters were monitored at 24 hour intervals. In the course of the test, fish were fed with dried *Artemia salina* without shells at 8% of body weight per day. The food ration was based on an initial fish weight and recalculated after 14 days of the test. Duration of the test was 28 days.

Water samples were collected every 7th day to measure real concentrations of norfloxacin in water. Analyzed concentrations of norfloxacin in water were found above 92% of the nominal concentrations in the course of subchronic test, which is in the accordance with the test validation criteria.

At the end of the subchronic toxicity test, fish were euthanized by an approved anesthetic (MS222). Body weight and length of each fish were recorded. Fish were frozen and stored at  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  until homogenization. Whole body samples were weighed and homogenized (1:10 w/v) using a phosphate buffer (pH 7.2). The homogenate was then divided into two parts. First one was used for the measurement of lipid peroxidation, the second was centrifuged (10,500 g at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min) and the obtained supernatant fraction was then used for the determination of catalytic activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, and catalase.

### Statistical analysis

Oxidative stress biomarkers were tested for a normal distribution using the Shapiro–Wilk test. After testing for homogeneity of variance across groups, an analysis of variance (one-way ANOVA) was used. The differences among test groups were assessed with the Tukey–HSD test with  $p < 0.05$  as the level of significance.

## Results and Discussion

### Effect of norfloxacin on biotransformation and antioxidant enzymes

An significant increase in glutathione peroxidase activity was found in fish exposed to norfloxacin concentrations of 0.1, 1, 10, and 30  $\text{mg L}^{-1}$  compared to the control group. In the activity of glutathione reductase was not found an significant increase in all tested concentrations of norfloxacin compared to the control group. The activity of glutathione S-transferase significantly increased in the environmental concentration (0.0001  $\text{mg L}^{-1}$ ) compared to the control group. A significant ( $p < 0.01$ ) increase in catalase activity was found in all tested concentrations compared to the control group.

### Effect of norfloxacin on lipid peroxidation

There was found no significant difference in all tested concentrations - 0.0001, 0.1, 1, 10, and 30  $\text{mg L}^{-1}$  of norfloxacin when compared to the control group. In our study, norfloxacin did not affect the lipid peroxidation.

In the literature, there is a little information on the effect of norfloxacin (or other fluoroquinolones) on fish and other water organisms, therefore we had to compare our results also with the effect of other pharmaceuticals on fish described for example in the studies of Nie et al. (2009), Zivna et al. (2013), Oliveira et al. (2013), and Wang et al. (2009).

Summarized results are depicted in Table 1.

Table 1: Results of measured oxidative stress parameters; \*\* = a significant increase in activity ( $p < 0.01$ ).

group	GPx (nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) ±SD	TBARS (nmol g <sup>-1</sup> of wet weight) ±SD	GR (nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) ±SD	GST (nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) ±SD	CAT (μmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) ±SD
control	17.16 ± 1.09	21.63 ± 1,19	10.59 ± 0,58	131.86 ± 4.41	107.36 ± 4.18
0.0001 mg L <sup>-1</sup>	18.24 ± 1.25	32.22 ± 3.76	11.34 ± 0.74	<b>163.16 ± 5.33</b> **	<b>128.29 ± 5.67</b> **
0.1 mg L <sup>-1</sup>	<b>45.86 ± 5.34</b> **	26.57 ± 4.35	12.96 ± 2.74	137.49 ± 7.00	<b>128.37 ± 5.24</b> **
1 mg L <sup>-1</sup>	<b>39.92 ± 6.14</b> **	28.01 ± 5.22	13.41 ± 1.65	147.64 ± 4.01	<b>149.35 ± 5.95</b> **
10 mg L <sup>-1</sup>	<b>32.12 ± 3.48</b> **	35.86 ± 3.68	10.42 ± 0.54	152.06 ± 6.81	<b>127.53 ± 3.28</b> **
30 mg L <sup>-1</sup>	<b>30.24 ± 2.01</b> **	22.54 ± 4.42	12.18 ± 0.58	145.03 ± 2.86	<b>145.96 ± 4.72</b> **

### Conclusions

The results of our study indicate that norfloxacin in the tested concentrations affects some biomarkers of oxidative stress (GPx, GST, and CAT). Based on these results, we can conclude that norfloxacin (even in environmental concentrations) may have a negative impact on some biochemical processes connected with the production of ROS (reactive oxygen species) in aquatic organisms.

### Acknowledgements

This research was supported by IGA VFU 19/2013/FVHE.

### References

For references contact authors.

**Contact address:** Marta Bartošková, MVDr., Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, H11020@vfu.cz.

## Determination of oxidative stress parameters in early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*) after subchronic exposure to ciprofloxacin

Živná Dana, Plhalová Lucie, Prášková Eva, Chromcová Lucie, Blahová Jana,  
Maršálek Petr, Štěpánová Stanislava, Svobodová Zdeňka

*Department of Veterinary Public Health, Animal Protection and Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

### Summary

*The aim of this investigation was to study the effects of subchronic exposure of common carp embryo-larval developmental stages to CIP (ciprofloxacin) using determination of selected oxidative stress biomarkers. We performed the test according to OECD 210, in which we used fertilized eggs of common carp. The tested concentrations were 5, 150, 500, 1000 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and were selected according to the environmental concentrations. As markers of oxidative stress antioxidant and biotransformation enzymes and products of lipid peroxidation were determined. The results obtained through measurement of oxidative stress biomarkers showed that ciprofloxacin affects an occurrence of oxidative stress in all tested concentrations.*

**Keywords:** *pharmaceuticals; antibiotics; lipid peroxidation; antioxidant enzymes; biotransformation enzymes*

### Introduction

Ciprofloxacin (CIP) is a broad-spectrum antimicrobial agent and belongs to fluoroquinolones. Its residues are often found in surface waters. Environmental concentrations measured in different parts of the world may differ. In Switzerland, concentration of CIP in STPs (sewage treatment plants) effluents ranged from 62 to 106  $\text{ng L}^{-1}$ . The removal of CIP from the water stream during wastewater treatment was between 79 and 86% (Golet, 2002). By contrast, Fick et al. (2009) who studied contamination of surface, ground and drinking water in India, detected this drug at the concentration of 14  $\text{mg L}^{-1}$  in STP effluent and 2.5 – 6.5  $\text{mg L}^{-1}$  in the lake.

Currently, the effects of environmental contaminants are investigated by determining oxidative stress biomarkers (Pamplona et al. 2011; Plhalova et al. 2011; Stepanova et al. 2013). Under physiological conditions, there is a balance between reactive oxidative species (ROS) production and elimination. Oxidative stress is a situation when steady-state level of ROS is impaired. The result is an increased concentration of ROS which leads to the disruption of cellular metabolism and damage to cellular components (Lushchak, 2010).

The aim of this investigation was to study the effects of subchronic exposure of common carp embryo-larval developmental stages to CIP using determination of selected oxidative stress biomarkers. Oxidative stress was assessed using determination of antioxidant and biotransformation enzymes and products of lipid peroxidation. The activities of enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) were used and, as a product of lipid peroxidation, content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was determined.

### Material and Methods

Embryo-larval toxicity test was performed according to OECD guidelines 210 (Fish, Early-life Stage Toxicity Test). Twenty-four hours post-fertilization, one hundred fertilized eggs were separated from unfertilized eggs and randomly distributed into crystallization dishes containing one of four solutions of CIP, or to a control dish. The concentrations of these solutions were 5, 150, 500, 1000 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$  and were selected according to the

environmental concentrations. The experiment was performed in triplicate. A semi-static method was used, in which the tested solutions were replaced twice a day. During the test, larvae were fed freshly hatched nauplii of *Artemia salina* ad libitum twice a day prior to the bath exchange.

The beginning of the test was designated as day 1 (one day post-fertilization). Feeding nauplii of *A. salina* was initiated on day 6. The test was terminated on day 33 when all larvae in the control group had become juveniles. During the test, embryos and larvae were sampled to record length, weight, Fulton's condition factor (FCF), specific growth rate (SGR), inhibition of specific growth (I), and morphological anomalies. At the end of the test, the fish were euthanized, frozen immediately, and stored at  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analyses. Whole body samples were weighed and homogenized using phosphate buffer.

The GST activity was determined by measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione at 340 nm (Habig et al., 1974). The activity of GR was determined spectrophotometrically by measuring NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1975). The activity of GPx was calculated from the rate of NADPH oxidation by the reaction with GR at 340 nm (Flohe and Gunzler, 1984). The CAT activity was determined spectrophotometrically by measuring  $\text{H}_2\text{O}_2$  breakdown at 240 nm. The specific activity of this enzyme was expressed as the  $\mu\text{mol}$  of decomposed  $\text{H}_2\text{O}_2$  per min per mg of protein (Aebi, 1984). To check lipid peroxidation, malondialdehyde was measured using the TBARS method at 535 nm as described by Lushchak et al. (2005).

## Results and Discussion

Length and weight parameters are shown in Table 1. Fish were significantly smaller ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) after 6 days exposure to the highest concentration of CIP ( $3000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) compared to the control and other experimental groups. Length and weight were found higher in fish exposed to CIP concentrations  $1000$  and  $3000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  after 33 days. But only values in concentration  $1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  were significant ( $p < 0.05$ ). The effect of CIP on FCF was not significant in all experimental groups compared to the control. The inhibition of specific growth rate was not detected in all tested groups.

Table 1: Values of length and weight parameters after 6 and 33 days exposure to CIP (\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , values in mean  $\pm$  SEM). TL – total body length, W – fish weight, FCF – Fulton's condition factor, SGR – specific growth rate, I – inhibition of specific growth.

	Control	$5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	$150\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	$500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	$1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	$3000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$
<b>TL<sub>6</sub> (mm)</b>	$6.09 \pm 0.06$	$6.24 \pm 0.06$	$6.20 \pm 0.07$	$6.29 \pm 0.06$	$6.00 \pm 0.08$	$5.78 \pm 0.04^{**}$
<b>W<sub>6</sub> (mg)</b>	$1.61 \pm 0.04$	$1.66 \pm 0.05$	$1.63 \pm 0.05$	$1.77 \pm 0.05$	$1.57 \pm 0.04$	$1.43 \pm 0.04^*$
<b>FCF<sub>6</sub></b>	$0.71 \pm 0.02$	$0.67 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.02$	$0.70 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.02$
<b>TL<sub>33</sub> (mm)</b>	$18.22 \pm 0.28$	$17.89 \pm 0.33$	$17.86 \pm 0.22$	$18.36 \pm 0.21$	$19.30 \pm 0.27^*$	$19.18 \pm 0.35$
<b>W<sub>33</sub> (mg)</b>	$87.92 \pm 4.43$	$78.10 \pm 4.53$	$75.39 \pm 2.94$	$83.47 \pm 3.30$	$102.04 \pm 4.58^*$	$100.37 \pm 6.40$
<b>FCF<sub>33</sub></b>	$1.37 \pm 0.05$	$1.32 \pm 0.02$	$1.29 \pm 0.01$	$1.32 \pm 0.02$	$1.38 \pm 0.01$	$1.32 \pm 0.02$
<b>SGR</b>	14.48	14.12	14.13	14.19	15.32	15.46
<b>I (%)</b>	–	2.48	2.42	2.01	-5.83	-6.77

Cumulative mortality was under 25% in the control group and groups exposed to CIP concentrations  $5$ ,  $150$  and  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . While mortality was between 29 and 32% in the groups treated with  $1000$  and  $3000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ .

Values of activity of the selected antioxidant and biotransformation enzymes and products of lipid peroxidation are shown in Table 2. A gradual decrease of GST activity was detected in all experimental groups exposed to CIP (5, 150, 500, 1000, and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) compared to the control group. However, statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) were found only between the control group and groups treated with 500 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The activity of GPx was statistically significantly higher ( $p < 0.01$ ) in all tested groups compared to the control. The activity of CAT was increased in all tested concentrations of CIP compared to the control group. Statistically significantly higher ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) activity of CAT was found only in the groups exposed to CIP concentrations 150, 500, 1000 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . An increase in GR activity was found in fish exposed to CIP concentrations 5, 150 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  compared to the control group. But none of these changes was significant ( $p > 0.05$ ). In contrast, a decrease of GR activity was found in the groups exposed to CIP concentrations 500 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . But only in the group exposed to CIP at 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , the activity of GR had significant effect ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. The concentration of TBARS was statistically significantly lower ( $p < 0.01$ ) in all experimental groups exposed to CIP (5, 150, 500, 1000 and 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) compared to the control group.

Table 2: Activity of GST ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ), GPx ( $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ), GR ( $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ), CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ) and content of TBARS ( $\text{nmol g of w w}^{-1}$ ) in common carp after CIP exposure (\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , values in mean  $\pm$  SEM).

	Control	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	500 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	3000 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>GST</b>	101.80 $\pm$ 2.47	98.41 $\pm$ 2.51	97.08 $\pm$ 2.46	91.18 $\pm$ 1.89**	95.83 $\pm$ 1.33	88.99 $\pm$ 1.97**
<b>GPx</b>	22.17 $\pm$ 0.68	34.85 $\pm$ 2.10**	34.21 $\pm$ 1.15**	33.58 $\pm$ 1.63**	35.89 $\pm$ 1.54**	32.65 $\pm$ 0.87**
<b>GR</b>	6.04 $\pm$ 0.16	6.32 $\pm$ 0.53	6.48 $\pm$ 0.38	4.79 $\pm$ 0.30*	6.92 $\pm$ 0.30	4.88 $\pm$ 0.36
<b>CAT</b>	19.67 $\pm$ 0.59	23.17 $\pm$ 1.05	25.29 $\pm$ 1.07**	26.26 $\pm$ 1.53**	27.65 $\pm$ 1.58**	24.62 $\pm$ 0.93*
<b>TBARS</b>	17.96 $\pm$ 2.90	7.76 $\pm$ 0.71**	6.31 $\pm$ 0.59**	4.77 $\pm$ 0.55**	6.73 $\pm$ 0.78**	4.25 $\pm$ 0.27**

Similar results with significant changes in antioxidant and biotransformation enzymes and products of lipid peroxidation after exposure to pharmaceuticals were reported in a number of studies (Pamplona et al. 2012; Stepanova et al. 2013; Bartoskova et al. 2013).

### Conclusions

In this study it was found that the CIP has an effect on some biomarkers of oxidative stress (GST, GPx, GR, CAT and TBARS). The subchronic exposure of early life stages of common carp to CIP causes changes in activities of antioxidant and biotransformation enzymes and lipid peroxidation. Based on these results, we can conclude that CIP may have a negative impact on some biochemical processes connected with the production of ROS in aquatic organisms. On the other hand, CIP has a positive influence on lipid peroxidation which is reduced.

### Acknowledgments

This research was supported by IGA VFU 4/2014/FVHE.

### References

Available at author.

**Contact address:** Dana Živná, MVDr., Department of Veterinary Public Health, Animal Protection and Welfare FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11473@vfu.cz.

## Hodnocení míry kontaminace psů rtuť pomocí analýzy srsti Evaluation of mercury contamination in dogs using hair analysis

Král Tomáš, Blahová Jana, Sedláčková Lenka, Svobodová Zdeňka

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

### Summary

*The aim of the present work is to evaluate the degree of mercury contamination of dogs by analysis of hair. Simultaneously, the content of total mercury was measured in pelleted feed. Dogs were divided into two groups. The first group was fed granular feed with fish and the second group feed free of fish. Total mercury in hair samples and granulated feed was measured using atomic absorption spectrophotometry with AMA 254. The significant correlation ( $P < 0,05$ ) between mercury content in the hair of dogs and in the granulated feed was found. The results serve as an indicator of mercury contamination of dogs.*

**Keywords:** total mercury; feed with fish; feed free of fish

### Úvod

Rtuť a většina jejich sloučenin jsou extrémně toxické. Rtuť může být vdechnuta, vstřebána přes kůži a sliznice. Ryby mají přirozenou tendenci akumulovat rtuť v těle. Rtuť na methylrtuť přetváří mikroorganismy v sedimentu a následně proniká do těl a akumuluje se v rybách (WHO, 2007). Rtuť v životním prostředí se akumuluje v potravinovém řetězci. Organická rtuť přijatá zvířaty snadno proniká přes hemato-encefalickou bariéru a hromadí se v mozku. Rtuť se ukládá do vlasů a vlasy se používají ke sledování dlouhodobé expozice rtuť. Obsah ve vlasech závisí především na frekvenci konzumace ryb (Sakai et al. 1995; WHO, 2007).

Po podávání krmiv, které obsahovaly ryby, docházelo u zvířat k neurologickým příznakům, byla pozorována ataxie a docházelo k záchvatům a křečím. Vysoká úroveň celkové rtuti byla u zvířat prokázána ve všech sledovaných tkáních (Takeuchi et al. 1977). Charakteristické léze otravy methylrtuť byly pozorovány v centrálním nervovém systému a významně zvýšená hladina byla v mozku, mozečku, játrech a ledvinách (Eto et al. 2001).

Psi a kočky se úspěšně využívají jako indikátory znečištění prostředí a krmiv kovy. Kovy se stanovují v krvi a kožních derivátech (např. srsti). Srst slouží jako vhodná neinvazivní matrice pro hodnocení expozice rtuť. Stanovení celkové koncentrace rtuti ve vzorcích srsti u psů se ukázalo být dobrou screeningovou metodou pro hodnocení zátěže rtuť u tohoto druhu (Sousa et al. 2013).

Pro výskyt rtuť v potravinách a krmivech jsou stanoveny maximální limity, které uvádějí SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech se změnou SMĚRNICE KOMISE 2010/6/EU, kde se uvádí limit rtuti v krmných směsích pro psy, kočky a kožešinová zvířata 0,3 mg/kg.

### Materiál a metody

V práci byla využita neinvazivní metoda pro hodnocení zatížení organismu rtuť. K analýze bylo odebráno cca 500 mg srsti u 122 psů. Vzorky byly odebírány z oblasti předloktí stříháním co nejbližší u kůže. Dále bylo odebíráno cca 10 g granulovaného krmiva, které se zkrmovalo minimálně jeden měsíc před odběrem srsti. U sledovaných zvířat byl zaznamenán druh, pohlaví, jméno, plemeno, věk, hmotnost, způsob chovu, výrobce krmiva, složení krmiva, doba zkrmování a doplňky stravy.

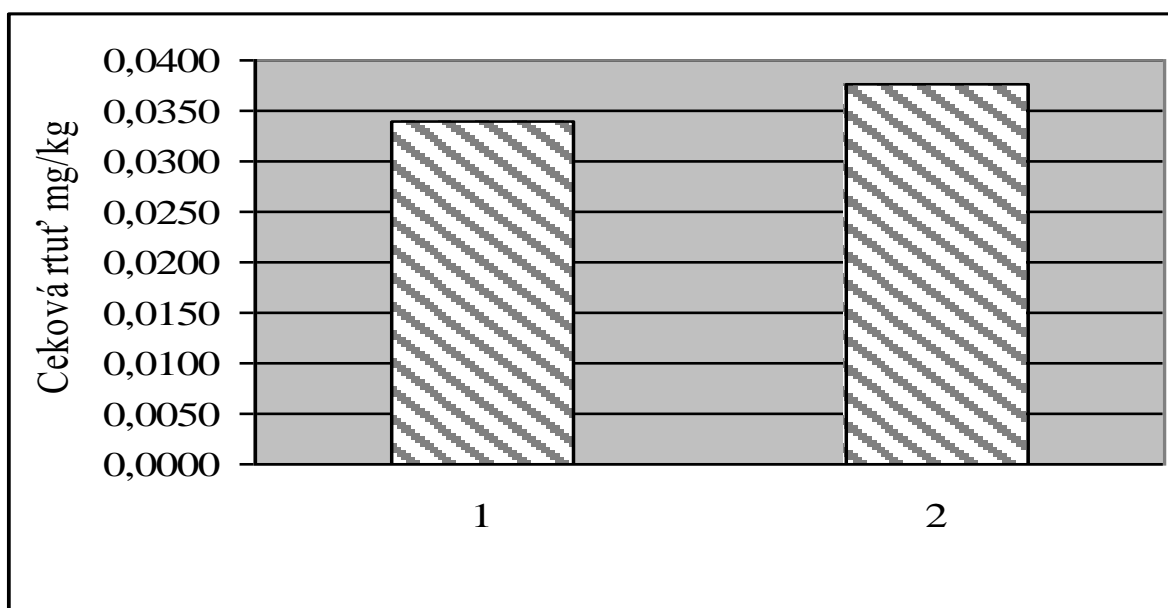


Před vlastním měřením byly vzorky srsti zbaveny nečistot. Srst byla čištěna nejprve v acetonu, poté třikrát v destilované vodě a následně opět v acetonu. V každém činidle byla srst ponechána 10 minut za občasného míchání. Po tomto kroku byla připravená srst sušena mezi dvěma filtračními papíry. Vzorky granulovaných krmiv nebyly upravovány, pouze byly rozdrčeny. Obsah celkové rtuti ve vzorcích srsti a granulovaných krmiv byl měřen na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrofotometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyser), který umožňuje detekci celkové rtuti. Vyšetřování psi byli rozděleni do 2 skupin. První skupinu (n = 96) představovali psi, kteří byli krmeni granulovaným krmivem bez přítomnosti ryb, druhou skupinu (n = 26) psi krmeni krmivem s přítomností ryb (rybí moučky). Statistické zpracování dat bylo prováděno pomocí programu UNISTAT 5.6. for EXCEL. Pro porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit nepárový Mann-Whitneyův test. Pro hodnocení závislosti mezi obsahem rtuti v srsti a granulovaném krmivu byl použit Spearmanův koeficient.

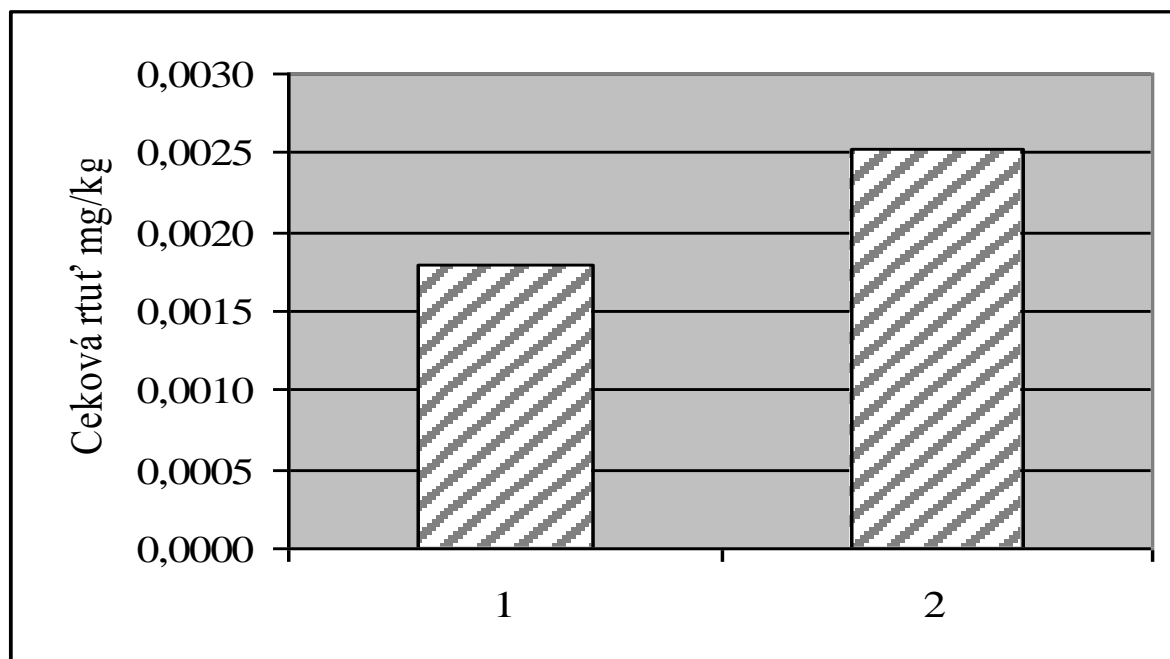
### Výsledky a diskuse

Výsledky obsahu celkové rtuti v srsti jsou uvedeny v grafu 1, kde sloupec jedna představuje srst psů, kteří byli krmeni krmivem bez obsahu ryb a ve sloupci 2 jsou uvedeni psi, kterým bylo podáváno krmivo s obsahem ryb. V grafu 2 ve sloupci 1 jsou uvedeny výsledky obsahu celkové rtuti v krmivu bez obsahu ryb a ve sloupci 2 krmivu s obsahem ryb.

Byla zjištěna závislost mezi obsahem celkové rtuti v granulovaných krmivech a mezi koncentrací celkové rtuti v srsti psů. Tato korelace byla signifikantní ( $P < 0,05$ ). Výsledky hladiny celkové rtuti u psů v srsti a granulovaném krmivu jsou v souladu s výsledky (SOUSA et al., 2013).



Graf 1: Porovnání mediánů obsahu celkové Hg v srsti psů po zkrmování granulí bez ryb (1) a granulí s rybou (2).



Graf 2: Porovnání mediánů obsahu celkové Hg v granulovaném krmivu bez ryby (1) a s rybou (2).

### Závěr

Byla prokázána signifikantní ( $P < 0,05$ ) závislost mezi obsahem celkové rtuti v granulovaném krmivu a koncentrací celkové rtuti v srsti psů. Srst psů se ukázala jako vhodná neinvazivní matrice pro hodnocení expozice rtutí.

### Literatura

ETO, K., YASUTAKE, A., NAKANO, A., AKAGI, H., TOKUNAGA, H., KOJIMA, T. Reappraisal of the historic 1959 cat experiment in Minamata by the Chisso factory. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2001, vol. 194, no. 4, s. 197-203.

SAKAI, T., ITO, M., AOKI, H., AIMI, K., NITAYA, R. Hair mercury concentrations in cats and dogs in central Japan. *British Veterinary Journal*. 1995, vol. 151, no. 2, s. 215-219.

SOUSA, ACA., TEIXEIRA, ISD., MARGUES, B., VILHENA, H., VIERA, L., SOARES, AMVM., NOGUEIRA, AJA., LILLEBO, AI. Mercury, pets' and hair: baseline survey of a priority environmental pollutant using a noninvasive matrix in man's best friend. *Ecotoxicology*. 2013, vol. 22, no. 9, s. 1435-1442.

TAKEUCHI, T., DITRI, FM., FISCHER, PV., ANNETT, CS., OKABE, M. Outbreak of Minamata disease (methylmercury-poisoning) in cats on Northwestern ontario reserves. *Environmental Research*. 1977, vol. 13, no. 2, s. 215-228.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Exposure to mercury: A major public health concern. 20 Avenue Appia, 2007, CH-1211 Geneva-27. Switzerland.

**Kontaktní adresa:** Tomáš Král, Mgr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H12024@vfu.cz.

# **SEKCE 7**

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat  
zoologických zahrad*



## Výskyt hlístice *Raphidascaris acus* u lososovitých ryb chovaných v recirkulačním systému dánského typu.

### The incidence of nematodes *Raphidascaris acus* on salmonids reared in a recirculation system of the Danish type.

Soukupová Zdeňka, Palíková Miroslava, Navrátil Stanislav

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

Within two years of monitoring, focusing on health monitoring salmonids, we detected the presence of nematodes *Raphidascaris acus* in the recirculation system of the Danish type. This parasite was probably introduced into breeding deployed by the fish. However, it is now evident that the breed successfully implemented throughout the development cycle, in which reared salmonids serve as the definitive host and intermediate host. Increasing amounts of the parasite is becoming a serious problem and may participate in the increased fish mortality.

**Keywords:** salmonids; *Raphidascaris acus*; recirculation system of the Danish type

#### Úvod

Celosvětová produkce ryb pro narůstající lidskou populaci dlouhodobě meziročně roste. Zvyšující se spotřeba ryb pro výživu obyvatel je kryta z více než 45% jejich produkcí v akvakulturních systémech (FAO 2010). Se snahou o snížení zatížení vodního prostředí intenzivním chovem ryb a závislosti na vydatném zdroji nezávadné vody, dochází k rozvoji recirkulačních akvakulturních systémů (Martins a kol., 2010). Jednou z alternativ recirkulačních systémů je využití tzv. dánské technologie, která vychází z principu airliftů, zajišťujících recirkulaci vody a výměnu plynů. Vývoj recirkulačních systémů „dánského typu“ pro produkci lososovitých ryb vycházel zejména z potřeby efektivního využití kvalitní vody bez patogenních zárodků, zlepšení využití aplikovaného krmiva a snížení zatížení prostředí odpadní vodou (Jokumsen a Swendsen, 2010).

V České republice jsou dvě funkční farmy s recirkulačním systémem dánského typu. V chovu, v němž byl prováděn dvouletý monitoring zdravotního stavu ryb, je chován siven americký (*Salvelinus fontinalis*), kříženci sivena amerického a sivena alpského (*S. fontinalis* x *S. alpinus*) a pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Celkový objem vody v systému je 1000m<sup>3</sup>, je zde 12 odchovných žlabů, každý o objemu 34m<sup>3</sup> a dva typy biofiltrů, jeden s plovoucími a druhý s ponořenými elementy. Za biofiltry jsou umístěny difuzory a hluboký airlift.

Cílem pravidelného sledování zdravotního stavu ryb bylo zjistit výskyt onemocnění, která mohou negativně ovlivnit sledovaný chov ryb a následně navrhnout reálná opatření, týkající se jejich eradikace.

#### Materiál a metody

V období od května 2012 do března 2013 bylo v měsíčních intervalech odebíráno po sedmi kusech ryb. Ryby byly usmrceny, byly zaznamenány jejich délko-hmotnostní parametry a následně byly podrobeny pato-morfologickému (histologickému), parazitologickému a mikrobiologickému vyšetření. Vyšetřováni byli siveni američtí dvojího původu (označení S, N) a kříženci. Siven americký S byl chován v hustotě rybí obsádky 550 ks/m<sup>3</sup>, siven americký N v hustotách 550 a 270 ks/m<sup>3</sup> a kříženci v hustotě 270 ks/m<sup>3</sup>.

### Výsledky a diskuse

U ryb vyšetřovaných od května do listopadu 2013 jsme v několika případech našli patomorfologické změny jako ascites, přítomnost meziorgánových srůstů a krváceniny, resp. migrační kanály v játrech. Tyto změny souvisí se záchytem velkého množství kapsul s larvami *Raphidascaris acus* na vnitřních orgánech. Parazitologickým vyšetřením jsme detekovali přítomnost pouze dvou parazitárních druhů, a to kožovce rybiho (*Ichthyophthirius multifiliis*) na kůži a žábřácích ryb a škrkavky *Raphidascaris acus*.

*Raphidascaris acus* jsme detekovali nejprve jako dospělé v kraniální části střeva. Největší prevalence dospělých hlístic byly u sivenů amerických chovaných ve větší intenzitě rybí obsádky, nicméně jejich intenzity v roce 2012 byly nízké (tabulka 1).

Tabulka 1: Prevalence a intenzita dospělců hlístice *R. acus* vyšetřovaných od května 2012 do března 2013.

	<i>S. fontinalis</i> S	<i>S. fontinalis</i> N	Kříženci 1/2	<i>S. fontinalis</i> N 1/2
Květen 2012	0	2; 14%	0	0
Červen 2012	0	2; 14%	1; 14%	1; 14%
Červenec 2012	0	1; 29%	0	0
Srpen 2012	0	0	4; 14%	0
Září 2012	1; 38%	1-2; 71%	0	2-3; 29%
Říjen 2012	2; 14%	1-5; 57%	0	-
Listopad 2012	1; 14%	1; 14%	1; 14%	-

½...poloviční intenzita rybí obsádky

V říjnu a listopadu jsme začali detekovat přítomnost kapsul s larválními stádii hlístice, a to zejména mezi pylorickými přívěsky a na střevní stěně (tabulka 2).

Tabulka 2: Prevalence a intenzita kapsul s larvami hlístice *R. acus* vyšetřovaných od května 2012 do března 2013.

	<i>S. fontinalis</i> S	<i>S. fontinalis</i> N	Hybrids 1/2
Říjen 2012	0	0	29%
Listopad 2012	2-100(φ30); 86%	1-35(φ14); 71%	0
Prosinec 2012	1-30(φ9); 86%	2-10(φ5); 62%	20; 14%
Leden 2013	7-50(φ25); 100%	6-22(φ11); 100%	1-14(φ5); 57%
Únor 2013	1-30(φ21); 50%	-	1-2(φ2); 50%
Březen 2013	1-30(φ11); 62%	-	1-10(φ5); 50%

½...poloviční intenzita rybí obsádky

V roce 2013 dosahovaly intenzity dospělců tohoto parazita výrazně vyšších hodnot a maximální epidemiologické charakteristiky byly zaznamenány již v červnu (tabulka 3).

Tabulka 3: Prevalence a intenzita dospělců hlístice *R. acus* vyšetřovaných od května do října 2013.

	<i>S. fontinalis</i> S	Kříženci 1/2	<i>O. mykiss</i>
Květen 2013	0	1-2; 43%	1 a 8; 29%
Červen 2013	1-36; 86%	2; 14%	6-37; 86%
Červenec 2013	1; 14%	0	1-3; 57%
Srpen 2013	1 a 7; 29%	6; 14%	3-4; 43%
Září 2013	1-2; 43%	1; 14%	1; 14%
Říjen 2013	1 a 18; 29%	0	0

Navíc vzrostlo množství kapsul, které byly nacházeny i na povrchu jater a jejich výskyt byl zaznamenán již v srpnu (tabulka 4), tj. o 2-3 měsíce dříve, než v roce 2012.

Tabulka 4: Prevalence a intenzita kapsul s larvami hlístice *R. acus* vyšetřovaných od května 2012 do března 2013.

	<i>S. fontinalis</i> S	Kříženci 1/2	<i>O. mykiss</i>
Srpen 2013	25-150(φ58); 100%	15 a 35(φ25); 29%	15-40(φ21); 71%
Září 2013	7-60(φ21); 71%	2 a 4(φ3); 29%	15-70(φ41); 86%
Říjen 2013	20-140(φ80); 100%	2-20(φ11); 83%	60-200(φ132); 100%

Tento parazit byl pravděpodobně do chovu zavlečen s nasazovanými rybami, nicméně nyní je evidentní, že se v chovu úspěšně realizuje celý jeho vývojový cyklus. Ten je vázán na jednoho mezihostitele, kterým jsou ryby, resp. blešivci (Moravec a kol., 1970, Bradley, 1980, Moravec, 2004). V nich larva dospěje do do invazního třetího stádia, které po pozření definitivním hostitelem – rybou, ve střevě dospívá. Larvy jsou popisovány u mezihostitelů jako vysoce patogenní a některé práce popisují masové hynutí ryb díky těžkým infekcím spojeným s larválními migracemi *R. acus* orgány (Bauer et al., 1977, Žitňan, 1967). Otázkou ovšem zůstává, jak se ryby, jako definitivní hostitelé infikují. V systému jsme dosud našli pouze zástupce korýšů (Crustacea) a to berušku vodní (*Asellus aquaticus*), pijavek (Hirudinea) a dvoukřídlých (Diptera) z čeledi Simuliidae, Limoniidae a Chironomidae. Tito bezobratlí však mohou sloužit pouze jako parateničtí hostitelé v nichž larva zůstává ve druhém, tj. neinfekčním stádiu (Moravec, 1970). Vysoké prevalence dospělců eliminují kanibalismus jako takový, nicméně jistou možností by mohlo představovat požívání uhynulých ryb nebo jejich vnitřností u dna ostatními rybami. Otázkou také zůstává, zda mohou být i jiní bezobratlí dalšími hostiteli.

### Závěr

Zvyšující se množství tohoto parazita začíná být vážným problémem a může se spolupodílet na zvýšených úhyních ryb. Je zajímavé, že hybridy se zdají být odolnější vůči tomuto parazitu, jak nasvědčují nižší epidemiologické charakteristiky.

### Poděkování

Tento monitoring je financován z projektu NAZV Q1210013 „Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče“.

### Literatura

Veškerá literatura je k dispozici u autora.

**Kontaktní adresa:** Zdeňka Soukupová, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, soukupova.zdenka@centrum.cz.

## Fenotypizace leukocytů u sivenů amerických (*Salvelinus fontinalis*) s využitím průtokové cytometrie

### Leukocyte phenotyping of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by flow cytometry

<sup>1</sup>Cutáková Zdeňka, <sup>1</sup>Soukupová Zdeňka, <sup>1</sup>Palíková Miroslava, <sup>2</sup>Ondráčková Petra

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

#### Summary

The main goal of our project was to optimize the method of leukocyte phenotyping of brooks using antibodies that were obtained from the Friedrich-Loeffler Institute in Germany. This method was used to evaluate the representation of leukocyte subpopulations in pure form of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and hybrids of brook trout with alpine brook trout (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus*). Leukocytes from peripheral blood, kidneys and spleen were obtained by gradient centrifugation using Lympholyte medium. Subsequently, the peritoneal leukocyte population was evaluated by flow cytometry. We tested fourteen monoclonal antibodies in total. On the basis of measurements, we selected the appropriate antibodies and then we used it for the phenotyping of leukocyte subpopulations in peripheral blood, spleen and head kidney in brook trout, hybrids and rainbow trout. On the basis of the obtained results, there are noticeable differences in the representation of each observed subpopulation, depending not only on the type of fish, but on the season as well.

**Keywords:** leukocyte phenotyping; monoclonal antibodies; flow cytometry; *Salvelinus fontinalis*

#### Úvod

Imunitní systém ryb se může zdát z pohledu adaptivní imunity teplokrevných živočichů méně pokročilý, je však dostatečně funkční a plastický, aby umožnil rybám adaptivní radiaci ve vodním prostředí s přítomností velkého množství patogenů. Imunitní odpověď ryb ovlivňuje řada faktorů včetně sezónních změn a stresu, které rovněž ovlivňují neuroendokrinní aktivitu (1). Průtoková cytometrie umožňuje rychlé a reprodukovatelné metody pro analýzu subpopulací rybích leukocytů a buněčné imunitní funkce (2). Principem imunofenotypizační diagnostiky je kvantitativní i kvalitativní analýza zastoupení diagnosticky významných markerů (3). Fenotypizací leukocytárních subpopulací u pstruha duhového se zabývají ve Friedrich-Loeffler-Institutu v Německu za využití jedinečné sady monoklonálních protilátek (4).

Hlavním cílem našeho projektu bylo optimalizovat metodu fenotypizace leukocytů u sivenů právě pomocí těchto protilátek. Následně byla metoda využita k vyhodnocení zastoupení sledovaných leukocytárních subpopulací u čisté formy sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) a u kříženců sivena amerického se sivenem alpským (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus*).

#### Materiál a metodika

Modelovým druhem byl siven americký (*Salvelinus fontinalis*), kříženci sivena amerického se sivenem alpským (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus*) a pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Všechny ryby pocházely z rybochovu Pravíkov v okr. Pelhřimov. Celkem bylo vyšetřeno 48 ryb, z čehož bylo 19 sivenů amerických, 18 kříženců a 11 pstruhů duhových. Do pokusu byli zařazeni jedinci ve věku 6-12 měsíců o hmotnosti 120-250g. V rámci zohlednění sezónnosti sledovaných ukazatelů pokusných zvířat jsme provedly 3 fáze odběru (T1-duben,



T2-září a T3-listopad). U všech jedinců jsme zaznamenaly pohlaví a délko-hmotnostní parametry.

Pomocí heparizované stříkačky jsme z ocasních cév odebraly 1 ml krve pro cytometrické vyšetření. Pokusná zvířata byla zákonným způsobem usmrcena a poté byla uskladněna v chladničkové teplotě a převezena na VÚVeL v Brně, kde byla rybám odebrána slezina a hlavová ledvina pro další analýzu. Tyto orgány byly homogenizovány a buněčná suspenze byla navrstvena, podobně jako periferní krev, na dělicí médium Lympholyte. Leukocyty z periferní krve, z ledvin a ze sleziny byly získány gradientovou centrifugací a následně vyhodnoceny pomocí průtokové cytometrie.

## Výsledky

Seznam testovaných monoklonálních protilátek (MAb) uvádí tabulka 1.

Protilátky proti granulocytům (21) a proti monocytům (30) značily stejnou populaci. Protilátky proti B lymfocytům (N2B9D7, N3-1) se váží na krátký řetězec imunoglobulinu, značí pouze subpopulaci B lymfocytů. Protilátky proti T lymfocytům (Darm 13, 33, 89, D 11-2, D 30-1) vykazovaly nespecifickou vazbu, neboť se vázaly i na jiné typy buněk.

Tabulka 1: Seznam testovaných protilátek. +/- znamená funkčnost testované protilátky.

Seznam testovaných protilátek	+/-		
Trombocyty 28-1	+	B lymfocyty N2B9D7	+
Trombocyty 15-2	+	B lymfocyty N3-1	-
Trombocyty Darm 8	-	Granulocyty 21	+
B lymfocyty 4C10	+	Monocyty 30	+
B lymfocyty 10C11	+	T lymfocyty Darm 13, 33, 89, D 11-2, D 30-1	-

V čase T1 jsme provedly testování krve, sleziny a ledviny u sivena a křížence. Použily jsme MAb proti B lymfocytům (4C10). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Separaci buněk z periferní krve je třeba provést bezprostředně po odběru, neboť časová prodleva vzniklá transportem znemožňovala řádné oddělení leukocytů.

Tabulka 2: Zastoupení B lymfocytů u sivenů a kříženců v čase T1 (průměr ± SD).

MAb B lymfocyty 4C10	Krev	Slezina	Ledvina
siven	36,01 ± 30,79	52,11 ± 36,27	39,28 ± 45,51
kříženec	23,37 ± 10,23	61,47 ± 39,42	13,97 ± 21,68

V čase T2 jsme provedly fenotypizaci leukocytů z periferní krve a ledviny u sivena, křížence a pstruha. Použily jsme MAb proti B lymfocytům (4C10) a granulocytům (21) Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Zastoupení B lymfocytů a myelocytů u sivenů, kříženců a pstruhů v čase T2 (průměr ± SD).

MAb B lymfocyty 4C10	Krev	Ledvina	MAb Myelo 21	Krev	Ledvina
siven	50,36 ± 8,69	15,54 ± 6,24	siven	9,22 ± 5,11	47,5 ± 15,67
kříženec	61,66 ± 7,54	25,24 ± 6,78	kříženec	5,74 ± 1,39	30,8 ± 9,76
pstruh	34,46 ± 6	19,9 ± 6,41	pstruh	9,24 ± 1,52	59,62 ± 7,61

V čase T3 jsme provedly fenotypizaci leukocytů periferní krve, sleziny a ledviny u sivena, křížence a pstruha. Použily jsme MAb proti B lymfocytům (4C10), trombocytům (28-1),

lehkému řetězci imunoglobulinu (N2 – FITC) a myeloidním buňkám (Myelo 21). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Zastoupení B lymfocytů, trombocytů, lehkého řetězce imunoglobulinu a myeloidních buněk u sivenů, kříženců a pstruhů v čase T3 (průměr ± SD).

<b>MAb B lymfocyty 4C10</b>	<b>Krev</b>	<b>Slezina</b>	<b>Ledvina</b>
siven	28,4 ± 8,54	25,78 ± 11,08	8,28 ± 5,28
kříženec	39,22 ± 12,19	7,98 ± 4,28	2,78 ± 1,87
pstruh	26,76 ± 10,01	48,06 ± 12,72	14,7 ± 5,47
<b>MAb trombocyty 28-1</b>	<b>Krev</b>	<b>Slezina</b>	<b>Ledvina</b>
siven	15,98 ± 8,84	10,78 ± 3,66	1,83 ± 0,63
kříženec	4,55 ± 0,97	13,12 ± 9,86	1,13 ± 0,6
pstruh	2,22 ± 1,2	3,9 ± 2,39	1,3 ± 0,69
<b>MAb N2 - FITC</b>	<b>Krev</b>	<b>Slezina</b>	<b>Ledvina</b>
siven	8,2 ± 2,48	5,4 ± 1,94	2,36 ± 1,12
kříženec	11,26 ± 1,8	1,26 ± 0,63	0,63 ± 0,35
pstruh	23,32 ± 9,46	43,7 ± 6,04	10,42 ± 2,86
<b>MAb Myelo 21</b>	<b>Krev</b>	<b>Slezina</b>	<b>Ledvina</b>
siven	31,4 ± 25,78	28,56 ± 22,75	69,56 ± 10,11
kříženec	13,6 ± 7,88	32,8 ± 14,3	52,43 ± 10,68
pstruh	15,1 ± 6,92	32,88 ± 9,53	61,9 ± 2,44

### Závěr

Naším cílem bylo zoptimalizovat metodu fenotypizace leukocytů u sivenů a její následné využití při hodnocení imunitní odpovědi v závislosti na původu ryb. Na základě řady měření jsme vytipovaly vhodné protilátky a následně jich využily pro fenotypizaci leukocytárních subpopulací v periferní krvi, slezině a v hlavové ledvině u sivena amerického, hybridů a pstruha duhového. Na základě získaných výsledků jsou patrné rozdíly v zastoupení jednotlivých sledovaných subpopulací jak v závislosti na druhu ryb, tak v závislosti na ročním období.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem Interní grantové agentury Brno č. 24/2013/FVHE.

### Literatura

1. TOMAN M. et al. Veterinární imunologie. Praha: *Grada Publishing*. 2009, 2nd ed., p: 392.
2. CHILMONCZYK S.; MONGE D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*. 1999, 9: 319-333.
3. ADAM Z.; VORLÍČEK J.; VANÍČEK J. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Praha: *Grada Publishing*. 2004, 2nd ed., p: 648.
4. KORYTÁŘ T.; DANG THI H.; TAKIZAWA F.; KÖLLNER B. A multicolour flow cytometry identifying defined leukocyte subsets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2013, 1-3.

**Kontaktní adresa:** Zdeňka Cutáková, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H12015@vfu.cz.

## Biodiversity and phylogenetic relationships of blood parasites in freshwater turtles from Southeast and East Asia

<sup>1,2</sup>Dvořáková Nela, <sup>1</sup>Kautman Matej, <sup>1,2</sup>Široký Pavel

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

<sup>2</sup>CEITEC-Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

### Summary

Species of *Haemogregarina* are blood apicomplexan parasites of aquatic vertebrates, mostly reptiles and fish; leeches are their vectors and definitive hosts. In the current study, we examined 21 freshwater turtles belonging to 5 species (2 *Cuora galbinifrons*, 13 *Malayemys subtrijuga*, 2 *Platysternon megacephalum*, 1 *Sacalia quadriocellata*, and 3 *Leucocephalon yuwonoi*) originally from China, Indonesia, Thailand and Vietnam. We detected presence of various morphotypes of blood parasites belonging to the genus *Haemogregarina* in 6/21 (28,6%) of examined turtles. The results of phylogenetic analyses of 1210 bp long 18S rDNA sequences of our isolates confirmed genetic identity detected *Haemogregarina* sp. from two different host species. Two new species of haemogregarine parasites were recovered.

**Keywords:** *Haemogregarina*; turtles; 18S rDNA; microscopy; phylogenetic analysis

### Introduction

Representatives of the genus *Haemogregarina* Danilewsky, 1885 (Apicomplexa: Eucoccidiorida: Adeleiorina: Haemogregarinidae) belongs to a large and widely distributed group of reptilian and fish blood parasites with a heteroxenous life cycle. They are transmitted by invertebrate definitive hosts, which are often not known. Their high prevalence was often detected in the blood of turtles (Siddall & Dessler, 1992; Mihalca, 2002; Telford *et al.* 2009; Davis & Sterrett, 2011; Hossen *et al.* 2013).

The life-cycle includes erythrocytic gamogony and sporogony occur intracellularly in leeches (Glossiphoniidae or Ozobranchidae) (Siddall, 1995) and erythrocytic and extra-erythrocytic merogony in vertebrate host. The prevalence of individual stages in circulating blood characterized duration of infection (Mihalca *et al.* 2002). Because haemogregarines are cause of infections with low or unknown pathogenicity (Dessler, 1993), they have not been given sufficient attention. Until recently, genealogy and evolution of *Haemogregarina* species have been studied based on partial 18S rDNA sequences within the evolutionary tree of adeleids (Barta *et al.* 2012; Dvořáková *et al.* 2014).

### Material and Methods

In our project, we examined 21 freshwater turtles belonging to 5 species (2 *Cuora galbinifrons*, 13 *Malayemys subtrijuga*, 2 *Platysternon megacephalum*, 1 *Sacalia quadriocellata*, and 3 *Leucocephalon yuwonoi*) imported from China, Indonesia, Thailand and Vietnam (Table 1). Examined blood smears were fixed in absolute methanol for 5 minutes and stained with Giemsa for 15 minutes. The presence of the parasites was detected and intensity of parasitaemia was estimated microscopically using 1000 × magnification objective lens equipped with immersion.

Total genomic DNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions and then stored at -20 °C. Specific primers ER and EF (Kvičerová *et al.* 2008) with adjusted PCR conditions (Dvořáková *et al.* 2014) were used for PCR amplification of approximately 1500 bp long fragment of

apicomplexans 18S rDNA. Amplicons were visualized by electrophoresis on 1.2 % agarose gel using Midori Green. Positive PCR products were purified using the Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan). Sequencing was carried out using automatic ABI 3730XL DNA analyser (Macrogen Inc., the Netherlands).

Obtained sequences were edited using the DNASTAR program package (DNASTAR Inc.) and identified by BLAST analysis. Alignment was created using BioEdit (Hall, 1999) with the Clustal W algorithm (Thompson *et al.* 1994). We selected additional sequences of all available *Haemogregarina* species and closely related organisms to construct the phylogeny. Methods of Bayesian inference (BI) and Maximum likelihood (ML) were selected to clarify the phylogenetic relationships within related organisms. BI was performed in MrBayes 3.1.2. program with a GTR+I+ $\Gamma$  model for 10 million generations (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). PHYML 2.4.4. (Guindon and Gascuel, 2003) was employed to carry out analysis of ML following the GTR+I+ $\Gamma$  model. Bootstrap support values in ML and MP were calculated for 1000 replicates.

Table 1: Examined turtles; m – males, f – females, juv – juveniles, nd – not detected.

Host	Collecting site	Number (m/f/juv/na)
<i>Cuora galbinifrons</i> (Bourret, 1939)	Vietnam: exact locality unknown	2/0/0/0
<i>Leucocephalon yuwonoi</i> (McCord, Iverson & Boeadi, 1995)	Indonesia: exact locality unknown	0/0/3/0
<i>Malayemys subtrijuga</i> (Schweigger, 1812)	Thailand: exact locality unknown	0/0/0/7
<i>M. subtrijuga</i>	Thailand: Surin province: Isaan region	4/0/0/0
<i>M. subtrijuga</i>	Vietnam: exact locality unknown	0/1/0/1
<i>Platysternon megacephalum</i> (Gray, 1831)	China: exact locality unknown	0/1/1/0
<i>Sacalia quadriocellata</i> (Siebenrock, 1903)	Vietnam: exact locality unknown	1/0/0/0

## Results and Discussion

Altogether, 6/21 (28,6%) of examined turtles were infected with *Haemogregarina* sp. by microscopic examination. The highest parasitaemia – 4.58 % was estimated in *S. quadriocellata*, followed by 0.88 - 0.02 % in *M. subtrijuga* and 0.01 % in *P. megacephalum*. In molecular analyses, 18S rDNA sequences of three samples are included except for three positive samples of *M. subtrijuga* from Isaan region in Thailand, from which we were not succeed in extracting DNA. BI and ML analyses provided identical tree topology (Fig. 2), but BI analysis demonstrated highly supported nodes in general. Analysed haemogregarine from *S. quadriocellata* represented sister taxon to *Haemogregarina*-like parasite from African hinged terrapin *P. marani* from Gabon. *Haemogregarines* from *M. subtrijuga* from Vietnam and *P. megacephalum* from China are conspecific and constitute distinct branch within *Haemogregarina* clade.

Many records exist about haemogregarines infecting freshwater turtles of Southeast and East Asia, while many of them are based on a hundred years old descriptions. Of all studied turtles, only for *M. subtrijuga* *H. pellegrini* was incompletely described (Laveran and Petit, 1910). The results confirmed the low host specificity of parasites of the genus *Haemogregarina* regarding their vertebrate host – turtles.

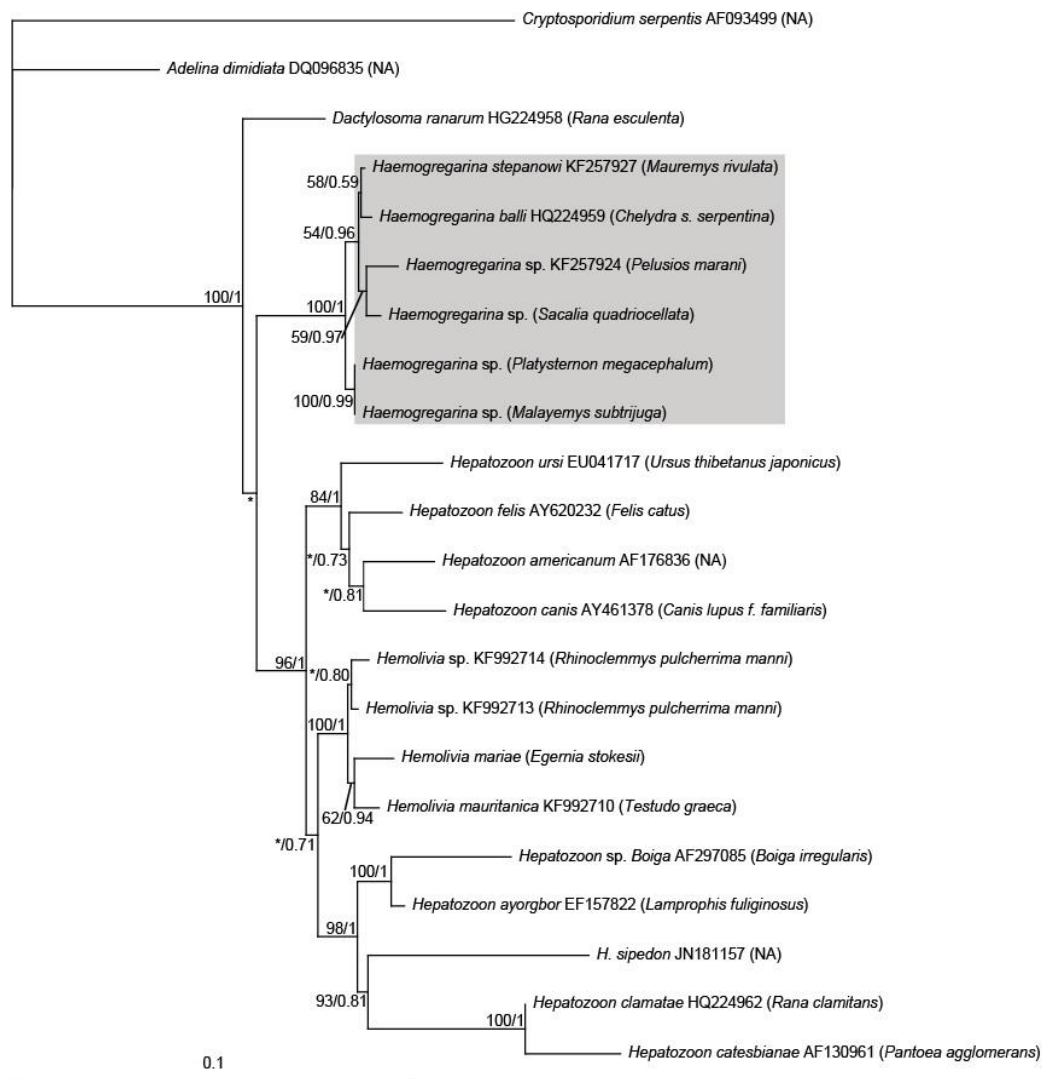


Figure 1: Phylogenetic position of detected *Haemogregarina* sp. inferred from partial 18S rDNA gene sequences. Relationships were determined using BI and ML methods.

## Conclusions

Two newly found haemogregarines in three various turtle species from Southeast and East Asia were genetically characterized. *Haemogregarina* sp. infecting turtles *M. subtrijuga* from Isaan region in Thailand evinces similar morphological characteristics of *H. pellegrini* Laveran and Petit, 1910. The results greatly clarified our understanding of the distribution, prevalence and host specificity of haemogregarines in freshwater turtles in this zoogeographical region.

## Acknowledgements

This research was supported by “CEITEC – Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), GAČR P506/11/1738 a IGA VFU number 6/2014/FVHE.

## References

The list of references and cited sources is available from the authors.

**Contact address:** Nela Dvořáková, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H11469@vfu.cz.

## Parasite-mediated coexistence

<sup>1</sup>Šmiga Ľubomír, <sup>1</sup>Košuthová Lenka, <sup>1</sup>Košuth Peter, <sup>2</sup>Koščo Ján, <sup>3</sup>Halačka Karel, <sup>2</sup>Manko Peter, <sup>2</sup>Ševc Ján, <sup>1</sup>Oberhauserová Katarína, <sup>2</sup>Kočišová Jana, <sup>2</sup>Fedorčák Jakub, <sup>2</sup>Falatová Lucia, <sup>4</sup>Oros Mikuláš, <sup>4</sup>Barčák Daniel, <sup>1</sup>Lazar Peter

<sup>1</sup>*Institute of Breeding and Diseases of Game and Fish, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice*

<sup>2</sup>*Faculty of Human and Natural Sciences, University of Prešov in Prešov*

<sup>3</sup>*Institute of vertebrate biology, Academy of Sciences of the Czech republic, Brno*

<sup>4</sup>*Parasitological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice*

### Summary

Among questions that resist understanding despite many years of biological research, two occupy prominent position, i.e. why sexual organisms have not been overridden by asexuals despite their two-fold reproductive disadvantage and what mechanisms affect the coexistence of distinct species. We focused on Danube spined loach *Cobitis elongatoides* (Cypriniformes, Cobitidae) hybrid complex as a model group to test the hypotheses about the dependence between hybridization, polyploidy and parasitic infection parameters.

Fish were caught seasonally from several model rivers of East Slovakia during the period 2011-2013, following the point sampling method. Using the helminthological examination of cobitid fishes we obtained the basic knowledge of parasite diversity of loaches and their epizootological indices to pay the special attention to correlation between parasite load and clonal diversity.

In all groups, poor parasites diversity was detected. The most prevalent were the adult flukes of genus *Allocreadium* localised in intestine and *Digenea* larvae present in body cavity, skin and eyes. Moreover, 3 adult acanthocephalans and 1 larval nematode were found. The overall intensity of infection ranged from 1 to 6 worms.

**Keywords:** *Cobitis elongatoides*; ploidy; intensity of parasites; prevalence of parasites

### Introduction

Role of ploidy in natural ecosystems is very important for phylogenesis of plant and animal species. Individuals with different ploidy are very frequent in populations of lower vertebrates, such as Osteichthyes (Leggatt, Iwama, 2003). Relationships between intensity of infection and prevalence of parasites of specimens with different ploidies are not well known. There are only some limited data mostly on commercially important species (Piačková, Flajšhans, 2006). The complex character of genotypes in biotypes of the genus *Cobitis* makes possible to test the hypotheses about the dependence between hybridization, polyploidy and parasitological infection parameters (Guégan and Morand, 1996).

### Material and Methods

The total of 355 specimens of *Cobitis elongatoides* from rivers Roňava, Ondava and Okna were examined. Using the helminthological examination of cobitid fishes we obtained the basic knowledge of parasite diversity of loaches and their epizootological indices; subsequently we evaluate the prevalence and intensity of parasitological infection in relation to species, sexes, season, and standard length and ploidy forms. We paid special attention to correlation between parasite load and clonal diversity. Fish were caught by electro-fishing at 4 localities in the different seasons from May 2011 to September 2013. Fish were sampled following the modified methodology (pointing method) of sampling and data were reported in field protocols. General epizootological indices of found parasites were assessed in parasitological protocols. Isolated parasites were preserved in 70 % ethyl-alcohol or in 4 % formalin, stained with carmine borax and then in acidic ethyl-alcohol. Then they were

dehydrated in an alcohol series, treated with clove oil and mounted in Canada balsam. All measurements (in micrometers) and pictures were made by microscope Olympus BX 41 TF with camera AXIO CAM ERc 5s on the basis of fixed preparations. Some photos were made by scanning microscope. We determined parasites according to the determination keys (Jones, Bray, Gibson, 2005). We propose the determination of parasites by measurements of individual morphological features. Determination of ploidity was performed with cooperation of Institute of Vertebrate Biology in Brno (Czech Republic).

## Results

We detected species of four groups of parasites: trematodes - *Allocreadium transversale* (prevalence (P) = 98%, II = 1- 4, adults in intestinal tract) and digeneal larvae (prevalence =1%, II = 6, in submucosa of visceral organs); larvae of nematodes were found in intestine only in one case with low intensity of infection (II = 1 parasite); and acanthocephalans in three cases with II 1 - 2.

Table 1: Prevalence and intensity of parasites of diploids and polyploids from three localities.

Localities and dates	Total number of samples	Diploids				Polyploids			
		Posit. sample	Negat. sample	P (%)	II	Posit. sample	Negat. sample	P (%)	II
<b>Okna</b> (07.2011)	52	4	43	8,5	1-4	1	4	20	1
<b>Ondava</b> (09.2012)	94	<b>3</b>	<b>48</b>	<u>5,8</u>	<u>1</u>	<b>3</b>	<b>40</b>	<u>6,9</u>	<u>1-2</u>
<b>Roňava</b> (07.2013)	49	18	24	42,8	1-5	6	1	85,7	1-4
<b>Okna</b> (05.2013)	47	17	21	44,7	1-3	2	7	22,2	1-2
<b>Ondava</b> (07.2013)	53	<b>6</b>	<b>23</b>	<u>20,6</u>	<u>1-2</u>	<b>6</b>	<b>18</b>	<u>25</u>	<u>1-2</u>
<b>Ondava</b> (09.2013)	60	4	24	14,2	1-3	6	26	18,75	1-6

Table 2: Percentages of negative and positive samples in relation to body standard length and in different seasons.

Size of examin.fish	Total number of samples	Percentages of pozit or negat. samples		Season	Total number of samples	Percentages of pozit or negat. samples	
		Negat.	Posit.			Negative	Positive
<59 mm	51	84,31%	15,68%	May	49	49	51
60-89 mm	234	75,21%	24,70%	July	152	24	76
90 mm <	72	84,72	15,27%	September	153	10,5	89,5

## Discussion

Manifestation of different ploidy in fish is not visible. It is very complicated to create two identical groups with different ploidy for statistical significance. *Allocreadium transversale* is a common parasite of fish from genus *Cobitis* (Popiolek, Okulewicz, Kotusz, 2003; Popiolek and Kotusz, 2003), that was detected in both ploidy fish groups (only in low intensity of infection and prevalence). Polyploids are bigger than diploids (thus have more space for

parasite living), they eat more food (higher possibility to receive the intermediate host with parasite larval stages) (Benfey, 1999), they have less developed immunity system (Guégan, Morand, 1996). Polyploids do not invest such energy to reproduction as diploids do (Guégan, Morand, 1996) but everything can be otherwise. Why aren't differences between intensity and prevalence of parasitic infection visible in our study? The exact answer is temporarily not sure. There are not significant differences between sizes of all fish. There were only seasonal differences in prevalence of *Allocreadium transversale*: in September the prevalence was higher than in July. In autumn, metacercariae are at the peak of their growth in intermediate host, thus the occurrence in definitive host is higher (Meyer a Radulescu, 1979).

### Conclusion

Polyploidy creates a significant field for further research in many branches of science. It is convenient to pay more attention to the issue.

### Acknowledgements

The research was supported by VEGA projects No. 1/0916/14 and 1/0847/13.

### References

- BENFEY, T. J. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick. ICES. *J. Mar. Sci.* 2001, vol. 58, p. 525 – 529.
- GUÉGAN, J. F.; MORAND, S. Polyploid hosts: strange attractors for parasites? *OIKOS*. 1996, vol. 77, no. 2, p. 366 - 369.
- JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. *Keys to the trematoda, volume 2*. Wallingford: CAB International, 2005. 746 p. ISBN 0-85199-587-X.
- LEGGATT, A. R.; IWAMA, K. G. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2003, vol. 13, p. 237 - 246.
- MEYER, E. A.; RADULESCU, S. *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*. 1979, vol. 17, p. 1-47.
- PIAČKOVÁ, V.; FLAJŠHANS, M. Long-term examination of health conditions in monoculture of communally tested amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture international*. 2006, vol. 14, no. 1 – 2, p. 43 - 59.
- POPIOLEK, M.; KOTUSZ, J. Endoparasitic Helminths of Fishes of the Genus *Cobitis* from Poland. *Folia biologica (Krakov)*. 2003, vol. 51, p. 173-178.
- POPIOLEK, M.; OKULEWICZ, J.; KOTUSZ, J. The first record of *Allocreadium transversale* (Rudolphi, 1802) (Digenea, Allocreadiidae) from cobitid fishes of Poland. *Helminthologia*. 2003, vol. 40, no. 4, p. 245-246.

**Contact address:** Lubomír Šmiga, MVDr., Institute of Breeding and Diseases of Game and Fish, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, smiga.lubomir@gmail.com.



## Nové druhy netopýrů postižené plísní *Pseudogymnoascus destructans*

### New species of bats affected by *Pseudogymnoascus destructans*

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

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

#### Summary

White-nose syndrome (WNS) is a cutaneous fungal disease of hibernating bats affiliated with a psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus* [formerly *Geomyces*] *destructans*. WNS is associated with unusually high bat mortality in the northeastern USA and has the potential to cause the extinction of several species. Currently, confirmation of WNS requires histopathologic examination. Invasion of living tissue distinguishes this fungal infection from those caused by conventional dermatophytes. In the Czech Republic has been discovered the presence of *Pseudogymnoascus destructans* and its typical skin erosions (cupping erosions). In our study tissue samples were obtained under the monitoring of white nose syndrome in bat roosts in Moravian Karst. Results, based on histopathology, show the presence of white-nose syndrome in Czech Republic with a new affected bat species.

**Keywords:** White-nose syndrome; fungi; *Plecotus auritus*; *Barbastella barbastellus*

#### Úvod

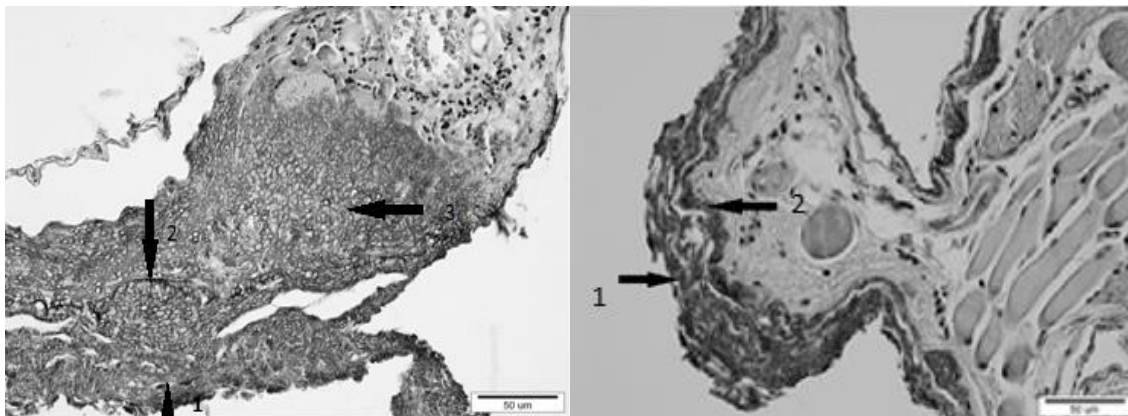
Zdá se, že se zvyšuje počet houbových patogenů po celém světě, což vede k závažným problémům v oblasti biologické rozmanitosti a fungování ekosystémů (Fisher *et al.*, 2012). Jedním z těchto patogenů je psychrofilní houba *Pseudogymnoascus destructans*, vyvolávající onemocnění syndrom bílého nosu (WNS). Toto onemocnění bylo poprvé zaznamenáno v Severní Americe v roce 2006 a odhaduje se, že způsobilo úhyn více než 5 milionů netopýrů na rozsáhlém geografickém území států USA a provincií Kanady (Blehert *et al.*, 2009, Frick *et al.*, 2010). Bílé hyfy této houby infikují kožní tkáň netopýrů, a to hlavně tlamu, uši, křídla a napadeny mohou být i chlupové folikuly infikovaných netopýrů. WNS se objevuje u netopýrů během hibernace, čímž byl výskyt omezen na mírné pásmo a vliv pouze na typ přezimování v tzv. hibernakulu (Meteyer *et al.*, 2009). Houba byla vědecky popsána v roce 2009 jako *Geomyces destructans* (Gargas *et al.*, 2009). Později byla fylogenetickou analýzou zařazena do samostatného rodu *Pseudogymnoascus* (Minnis *et al.*, 2013). Vzhledem k tomu, že patologické mechanismy, vedoucí k úhynu hibernujících netopýrů a reakce jejich organismu na kožní plísníovou infekci, jsou dosud na úrovni hypotéz, je nutné doplnit poznatky o WNS, které ohrožuje chráněné netopýry.

#### Materiál a metody

Vzorky plísní *Pseudogymnoascus destructans* a tkáň netopýrů byly získány v rámci monitoringu syndromu bílého nosu v zimovištích netopýrů České republiky (Moravský kras). Celkem bylo vyšetřeno 148 netopýrů (z 15 různých druhů), z toho 61 vzorků kůže bylo posláno na histopatologii. Identifikace plísně byla prováděna přímou mikroskopií typických arthrokonidií, kultivací stěrů na Sabouradově agaru a PCR diagnostikou s využitím specifických primerů. Výběr kožních lézí pro analýzy byl založen na diagnostickém využití UV záření. Povrchově kolonizovaná kůže fluoreskuje modrozeleně, zatímco infikovaná kůže s typickými lézemi oranžově. Rozsah kožních lézí v kožních bioprátech byl posouzen histopatologicky. Negativní kontrolou pro analýzy byla laboratorní kultura plísně P.d. a biopsie létací blány zdravých netopýrů.

## Výsledky

Z výsledků vyplývá, že z celkového počtu vyšetřených netopýrů (148), bylo histopatologicky pozitivních 40 vzorků a po diagnostice UV záření bylo pozitivních 53 vzorků netopýrů (tab. 1). Tento rozdíl je způsoben místem, z kterého se odebíral vzorek pro histopatologii. Histopatologickým vyšetřením tak byly zjištěny dva nové druhy netopýrů *Plecotus auritus* (obrázek 1) a *Barbastella barbastellus* (obrázek 2), postižené syndromem bílého nosu.



Obrázek 1: Histopatologické kožní léze shodné s WNS u druhu *Plecotus auritus*.

Šipky: 1 povrchová kolonizace plísní; 2 typická cupping erosion způsobená hyfami plísně; 3 *Pseudogymnoascus destructans* invalidovala již do dermis.

Obrázek 2: Histopatologické kožní léze shodné s WNS u druhu *Barbastella barbastellus*.

Šipky: 1 povrchová kolonizace plísní; 2 *Pseudogymnoascus destructans* invalidovala již do dermis.

Tabulka 1: Seznam a počet vyšetřených druhů netopýrů v roce 2013.

Year	2013			
	Screened	Biopsied	Histo+	UV +
<i>Myotis myotis</i>	34	26	21	30
<i>Myotis daubentonii</i>	3	1	1	1
<i>Myotis bechsteinii</i>	8	2	2	3
<i>Myotis nattereri</i>	11	1	1	3
<i>Myotis brandtii</i>	4	-	-	1
<i>Myotis mystacinus</i>	2	2	0	0
<i>Myotis emarginatus</i>	9	6	5	3
<i>R. hipposideros</i>	27	5	1	0
<i>Eptesicus nilssonii</i>	3	-	-	0
<i>Plecotus auritus</i> *	23	11	5	10
<i>B. barbastellus</i> *	17	3	3	1
<i>Plecotus austriacus</i>	3	1	0	0
<i>Eptesicus serotinus</i>	2	1	0	0
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	1	1	0	0
<i>Myotis dasycneme</i>	1	1	1	1
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>61</b>	<b>40</b>	<b>53</b>

\* nové druhy netopýrů postižené WNS, zjištěné v roce 2013

## Diskuse

Už dřívější evropské studie prokázaly růst plísně během hibernace netopýrů (Martínková *et al.*, 2010; Puechmaille *et al.*, 2011; Wibbelt *et al.*, 2010), avšak ani jedna nebyla takového rozsahu jako tato. V této studii jsme vyšetřili 148 netopýrů a to odebráním kožního bioptátu. Histopatologickou analýzou jsme zjistili dva nové druhy netopýrů, pozitivní na infekci plísní *P. destructans* a WNS, z rodů *Plecotus* a *Barbastella*, s různým hibernačním chováním. Naše histopatologické nálezy jsou v souladu s diagnostikou WNS (Meteyer *et al.*, 2009). Patogeneze WNS však nebyla stále ještě zcela objasněna (Blehert, 2012). Poruchy chování, fyziologické narušení a imunoprese během hibernace jsou však považovány za klíčový patomechanismus tohoto onemocnění (Blehert *et al.*, 2009; Cryan *et al.*, 2010; Cryan *et al.*, 2013). Ukazuje se také, že hlavním rizikovým faktorem pro příznivý růst plísně je hibernace netopýrů v kontaminovaných jeskyních a dolech (Gargas *et al.*, 2009; Verant *et al.*, 2012). Obnovení imunitní odpovědi u WNS pozitivních netopýrů brzy po hibernaci, může vést k imunitně zprostředkované odpovědi a zabránit tak velkému poškození tkáně či případné smrti zvířete (Meteyer *et al.*, 2012). Naše histopatologicky pozitivní vzorky byly odebrány i na konci hibernace netopýrů, což by mohlo nasvědčovat tomu, že evropské druhy netopýrů jsou schopné přežít infekci *P. destructans*. Je však nutné provést další studie na porovnání reakce evropské a severoamerické populace netopýrů na toto plísňové onemocnění, jelikož vykazují rozdílnou mortalitu.

## Závěr

Na území České republiky byly histopatologickým vyšetřením prokázány dva nové druhy netopýrů *Plecotus auritus* a *Barbastella barbastellus*, postižené syndromem bílého nosu. Náš výzkum přináší nové druhy netopýrů a doplňuje tak znalosti o ekologii a epidemiologii této plísňové choroby.

## Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 32/2013 FVHE.

## Literatura

Dostupná u autora.

**Kontaktní adresa:** Veronika Kováčová, Mgr. Ing., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, h12437@vfu.cz.

Editace:	Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	XVI. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	161
Vydání:	1.
Rok vydání:	2014
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

**Elektronický sborník je dostupný na URL:  
<http://fvhe.vfu.cz/konference/Sborniky.html>  
 ISBN 978-80-7305-670-4**