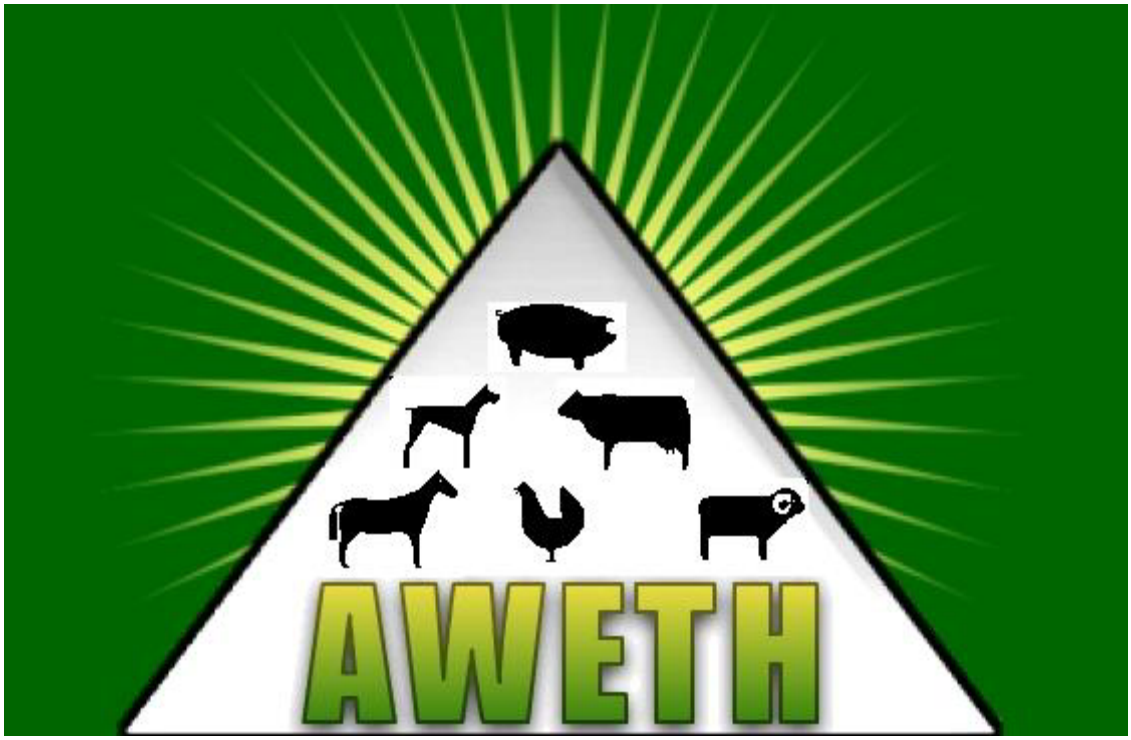
Animal Welfare, Etológia és Tartástechnológia



Animal Welfare, Ethology and Housing Systems

Volume 9 Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő
2013

Tartalomjegyzék

I. KÖTET - IV. GÖDÖLLŐI ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOS NAPOK	
Andrýsek, J., Liprtová, L., Falta, D.: The influence of lamensee of Holstein breed milk cows on their dairy yield	1-5
Filipčík, R., Voříšková, J., Dufek, A., Hošek, M., Kleinová, J.: The effect of leptine gene on beef efficiency of Czech flekvieh cattle	6-11
Javorová, J., Falta, D., Velecká, M., Andrýsek, J., Večeřa, M., Studený, S., Chládek, G.: Effect of increasing temperature and changes in relative humidity on composition and technological properties of bulk milk samples from Czech flekvieh breed	12-17
Kuchtík, J., Šustová, K., Zapletal, D.: Organic farming and issue of food safety in the Czech Republic	18-24
Massányi Péter, Bárdos László, Lukáč, Norbert, Stawarz, Robert, Formicki, Grzegorz, Toman, Robert, Forgács Zsolt, Capcarová, Marcela, Kolesárová, Adriana, Kročková, Jiřina, Kalafová, Anna, Kováčik, Jaroslav: Heavy metals - accumulation and reproductive toxicity	25
Mostafa, M.A., Beder, E.A., Khattab, A.S., Tőzsér J.: Variances of direct and maternal genetic effects for milk yield and its composition in a herd of Friesian cows in Egypt	26-31
Paldusová, M., Hošek, M., Filipčík, R., Máchal, L.: The effect of the age, body weight and labour utilization of dogs to the qualitative and quantitative parameters of their ejaculate	32-36
Pešinová, Petra, Vejčík, Antonín, Maršálek, Miroslav: Effect of lambing on the quantitative and qualitative traits of milk of native sheep on the natural pasture in a submontane region	37-42
Večeřa, Milan, Falta, Daniel, Chládek, Gustav: The effect of temperature in the stables on resting behaviour of Czech flekvieh cows	43-46
Velecká, M., Javorová, J., Falta, D., Večeřa, M., Andrýsek, J., Chládek, G.: Change of stable microclimate during spring and summer as a criterion of welfare and its effect on milk yield, composition and qualitative indicators as Holstein dairy cows	47-52
Abayné Hamar Enikő, Póti Péter: Juhtartás jövedelmének vizsgálata a szaporulati mutatók tükrében	53-59
Alföldi László, André Gergely, Süpek Zoltán: A magyar laktációs termelés kulcsa a zavartalan ellés körüli időszak	60-63

Bakos Katalin, Fetter Éva, Csenki Zsolt, Kovács Róbert, Csepeli Andrea, Reining Márta, Kovács Balázs, Urbányi Béla, Scholtz, Stefan: Bioszenzor zebradánió vonal pajzsmirigy működését zavaró anyagok monitorozása	64-68
Balogh Laura, Kerekes Andrea, Debnár Viktória, Ray Krisztina, Bodó Szilárd: Tej alapú hígítók alkalmazásának lehetősége nyúl sperma mélyhűtésnél	69-72
Barna Brigitta, Holló Gabriella: A bivalytej beltartalmi értékelése ultrahangos tejanalizátorral	73-79
Barna Brigitta, Holló Gabriella: Az évszak hatása a legeltetett bivaly viselkedésére	80-85
Bencsik Dóra: Actuel problems, possibilities and trends in drinking water testing	86-91
Benedek Zsuzsanna, Kertai Zsófia, Nyíri András, Polgár J. Péter, Nagy Szabolcs: Osztott választás hatása a kocák kondíciójának alakulására	92-98
Bónai András, Bagóné Vántus Viola: Az elválasztási kor, valamint a pro- és prebiotikumok alkalmazásának hatása a növendék házinyúl vakbél mikrobiótára	99-109
Demény Márton, Csatlós Eszter, Tőzsér János: A csülökszaru keménységmérés módszertana - a nedvességtartalom befolyásoló hatása	110-116
Drobnyák Árpád, Szabó Rubina Tünde, Kustos Károly, Weber Mária: A csincsilla tenyésztés Magyarországon, múlt-jelen-jövő	117-121
Farsang Alexandra, Mikó Józsefné Jónás Edit: Termelési adatok elemzése Csongrád megye kiemelkedő holstein-fríz tenyészeteiben	122-127
Gál János, Mándoki Míra: Causes leading to death captive Tragopans in Hungarian private breeding colinies	128-131
Galamb Eszter, Paczolay Gábor, Mozsár János, Pócza Szabolcs, Ács Kázmér Csaba, Bustyaházai László, Bartyik János, Fébel Hedvig, Husvéth Ferenc: Bendővédett full-fat szója hatása az intenzíven tejelő holstein-fríz tehenek tejtermelésére és tejösszetételére	132-138
Géczi Gábor, Korzenszky Péter, Szabó Tamás, Bense László, Urbányi Béla: Levegő-víz hőszivattyú alkalmazásának lehetősége az intenzív recirkulációs haltenyésztési rendszerben	139-146
Gerencsér Zsolt, Matics Zsolt, Radnai István, Meinrad, Odermatt, Szendrő Zsolt: Növendéknyulak különböző padozatok közötti szabad helyválasztása alacsony hőmérsékleten	147-152
Gulyás Gabriella, Radócz Tünde, Jávor András, Czeglédi Levente: Mintaelőkészítési és frakcionálási lehetőségek a tojás proteomikai vizsgálata során	153-159

Hajdu Péter, Horvainé Szabó Mária: A gazdasági lovak használatának és tenyésztésének helyzete hazánkban	160-169
Holbok László, Erdélyi Márta, Kapás Sándor, Ancsin Zsolt, Bócsai Andrea, Balogh Krisztián, Mézes Miklós: A paradicsomtörköly hatásának vizsgálata brojlercsirke egyes termelési, vágási és húsminőségi paramétereire	170-176
Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Skoda Gabriella, Barta Endre, Rocha, Dominique, Lejard, Véronique, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna: A szarvasmarha prion fehérje szabályozó SNP vizsgálata transzgénikus egér modellben	177-182
Kerényi Viktória, Weber Mária, Erdélyi Márta, Apáti Nagy Gábor, Ábrahám Csaba, Szabó Rubina Tünde, Mézes Miklós: Hízósertések termelésének és húsminőségének vizsgálata gyógynövénnyel dúsított takarmányok etetésének hatására	183-188
Kézér Fruzsina Luca, Tőzsér János, Jurkovich Viktor, Kovács Levente: Egészséges és sánta tejelő tehenek szívritmusa és szívritmus-varianciája fejés során	189-194
Kiss Barbara, Bélley Márta, Pongrácz László: Magyarország angol telivér ménállománya 2008-2012-ben	195-201
Kiss István: Nyílméregbékák terráriumi tartásával kapcsolatos tapasztalatok	202-208
Kovács Alfréd Pál: A hazai étkezési szokások változásai a honfoglalástól-napjainkig	209-212
Kovács Levente, Jurkovich Viktor, Kézér Fruzsina Luca, Tőzsér János: Előzetes eredmények: tejelő tehenek szívritmus-varianciája hagyományos és robotizált fejési rendszerben	213
Körözsi Virág, Weber Mária, Erdélyi Márta, Apáti Nagy Gábor, Ábrahám Csaba, Szabó Rubina Tünde, Mézes Miklós: Pecsenyeludak termelésének vizsgálata gyógynövénnyel dúsított takarmányok etetésének hatására	214-218
Kummer Luca, Egri Borisz, Bába András: Az újszülött csikó egyes élettevékenységeinek értékeléséről	219-225
Maros Katalin, Gidró Noémi, Nagy Viktória, Varga Áron, Veres Éva, Tőzsér János: Ügető és galopp lovak személyiségének vizsgálata	226-231
Márton Mihály, Szentkirályi Petra, Horváth Zsuzsanna, Markolt Ferenc, Szabó László, Kozák Lajos, Heltai Miklós: Hazai adatok a vörös róka (*Vulpes vulpes*) élőhelyválasztásához	232-238
Mézes Miklós, Kovács Alfréd: Traceabiliti of farm animals, their meat and meat products	239-243

Mikó Annamária, Szendrő Zsolt, Meinrad, Odermatt, Gerencsér Zsolt, Radnai István, Nagy István, Matics Zsolt: A csoportosan tartott anyanyulak agresszív viselkedése a csoport kialakítását követő hónapban	244-249
Mikó Annamária, Szendrő Zsolt, Meinrad, Odermatt, Gerencsér Zsolt, Radnai István, Nagy István, Matics Zsolt: A csoportosan tartott anyanyulak párzási viselkedése a csoport kialakítását követő hónapban	250-254
Morlin Zsófia, Póti Péter, Bokor Beáta, Kerti Annamária, Pajor Ferenc: Előzetes eredmények német húsmerinó hízóbárányok vérmérsékletének és egyes vérparamétereinek összefüggés-vizsgálatáról	255-261
Munkácsi László: Juhok szabadtartása nagyüzemben	262-269
Nyisalovits Andrea, Posta János, Czeglédi Levente, Juhász Diána, Babinszky László: MC4R és RYR1 gének polimorfizmusának és nagy genetikai kapacitású sertéshibrid termelési paramétereinek összefüggésvizsgálata	270-277
Oláh János, Győri Zsolt, Hutás István, Treuer Ákos, Csépányi Balázs, Páli Jenő, Janan, Janbaz: A pulyka fertőző vakbél- és májgyulladás (hisztomonadózis) megelőzésének új, gyógyszermentes védekezési formája	278-283
Pajor Ferenc, Egerer Anna, Weidel Walter, Polgár J. Péter, Póti Péter: Tőgybimbó típus összefüggése a kecsketej higiéniai tulajdonságaival egy hazai kecske tenyészetben	284-289
Panker Máté: A vörösfülü ékszerteknős megítélése, mint potenciálisan invazív hüllőfaj	290-293
Posta János, Rudiné Mezei Anita, Mihók Sándor: A díjugrató sportban különböző nehézségi szinteken nyújtott sportteljesítmények értékelése	294-299
Póti Péter, Varga Gábor, Pajor Ferenc: Tőgy- és tőgybimbó-tulajdonságok összefüggése a szomatikus sejtszámmal egy hazai holstein fríz tenyészetben	300-304
Prágai Andrea, Kovács Alfréd: Alpakák gyomorférgessége	305-309
Prágai Andrea, Kovács Alfréd: Az alpaka gyapjú felhasználási lehetőségei a gyapjúiparban	310-314
Saláta Dénes, Varga Anna, Penksza Károly, Malatinszky Ákos, Szalai Tamás: Agrárerdészeti rendszerek és alkalmazási lehetőségeik a hazai ökológiai gazdálkodásban	315-320
Skoda Gabriella, Kerekes Andrea, Hoffmann Orsolya Ivett, Barta Endre, Rocha, Dominique, Lejard, Véronique, Hiripi László, Bősze Zsuzsanna: Szarvasmarha RCAN2 gén szabályozó régiójában található SNP vizsgálata transzgénikus egérmodellben	321-327

Somoskői Bence, Keresztes Zsuzsanna, Kovács Melinda, Cseh Sándor: T-2 mikotoxin hatása a mitokondriumokra és az apoptotikus folyamatokra egérembrióban	328-334
Soós Mihály, Szakály Zoltán: Testtömeg-menedzselési attitűdök Magyarországon	335-336
Szabó Rubina Tünde, Kovács Alfréd, Kokavecz Gábor, Heincinger Mónika, Horvainé Szabó Mária, Ábrahám Csaba, Mézes Miklós, Weber Mária: Vörösáru /párizsi/ objektív és szubjektív húsminőség vizsgálata	337-343
Szakáli János Miklós, Müller Tamás, Demény Ferenc: Újabb adatok a széles kárász ex situ és in situ védelméhez	344-348
Szalai Tamás, Szalai Dániel, Saláta Dénes: Biogazdálkodás a hazai méhészetekben	349-354
Szöllősiné Bende Réka, Erdélyi Márta, Mézes Miklós, Szabó Rubina Tünde, Koczka Noémi, Horvainé Szabó Mária, Fazekas Natasa, Podmaniczky Béla, Weber Mária: Illóolaj tartalmú készítmény alkalmazása növendék pulykák termelési paramétereinek fokozására	355-361
Szűcs István: A magyar akvakultúra ágazat előtt álló kihívások és fejlesztésének főbb prioritásai	362
Takács Attila, Weber Mária, Szabó Rubina Tünde, Kustos Károly, Fazekas Natasa, Liptói Krisztina: Korai embrióelhalás összehasonlítása SPF (specified pathogen free) és normál tyúktojásnál	363-369
Tarnavölgyi Csilla: Kistermetű, egzotikus macskafélék állatkerti tartásának vizsgálata	370-373
Tóth Tamás: A magyar herpetológia története	374-381
Váradi László: Fenntartható akvakultúra az egészséges táplálkozásért és az egészséges környezetért	382-383
Varga Dániel, Kovács Alexandra: A sótartalom hatása füstölt halfilék minőségi tulajdonságaira	384-390
Vincze Zoltán: Kígyótartási technológiák és rendszerek értékelése	391-392
Weber Mária, Sidó Ilona, Apáti Nagy Gábor, Ábrahám Csaba, Szabó Rubina Tünde, Mézes Miklós, Erdélyi Márta: Tenyészludak termelési paramétereinek javítása gyógynövény-kiegészítésekkel	393-400
II. KÖTET - XIII. RISK FACTOR OF FOOD CHAIN	
Almášiová, Viera, Holovská, Katarína, Cigánková, Viera, Račeková, Enikő: Influence of electromagnetic radiation on selected organs in rats	401-406

Antos, P., Sechman, A.: Cytochrome P450 1A induction in chicken ovarian follicles exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	407
Binkowski, Łukasz J., Marek, Sylwia, Banaś, Joanna, Łaciak, Tomasz, Wojtaś, Włodzimierz, Zyśk, Bartłomiej, Guzik, Marek, Schimscheiner, Lucjan, Stawarz, Robert: Mercury concentrations in the digestive tract of muskrat from southern Poland	408
Boboňová, Ivana, Martiniaková, Monika, Chovancová, Hana, Omelka, Radoslav, Toman, Robert, Hájková, Zuzana, Stawarz, Robert: The effect of bee pollen on macroscopic structure of femora in adult female rats after an experimental addition in diet	409-413
Bojarski, B., Lutnicka, H., Ludwikowska, A.: Hematological alternations in common carp (*Cyprinus Carpio* L.) exposed to mankozeb	414
Capcarová, Marcela, Kolesárová, Adriana, Galik, Branislav, Simko, Milan, Juracek, Miroslav, Toman, Robert, Sirtokin, Alexander V.: Cobalt-induced activation of heat shock protein 70 and antioxidant status in ovarian fragments of rats	415-419
Chovancová, Hana, Martiniaková, Monika, Boboňová, Ivana, Omelka, Radoslav, Adamkovičová, Mária, Stawarz, Robert, Toman, Robert: Osteotoxic effect of simultaneous adminsitration to cadmium and diazinon on bone in adult male rats	420-426
Drážovská, Monika, Šiviková, Katarína, Dianovský, Ján, Holečková, Beáta, Galdíková, Martina: Use of sister chromatid exchanges and comet assay in genetic risk assasment	427-432
Dżugan, M., Lutnicka, H., Lis, M., Droba, M., Niedziółka, J.: Ultrastructural changes in kidneys of newly hatched chicks exposed to cadmium during embryogenesis	433
Emrichova, Jana, Kalafová, Anna, Zbynovska, Katarina, Petruska, Peter, Ondruska, Lubomir, Jurcik, Rastislav, Chrastinova, Lubica, Kováčik, Anton, Schneidgenova, Monika, Čupka, Peter, Capcarová, Marcela: Patulin induced changes in haematological parameters of rabbits fed by strawberry leavess after chronic exposure	434-437
Erdélyi Márta, Ancsin Zsolt, Bócsai Andrea, Balogh Krisztián, Mézes Miklós: Survey of the mycotoxin contamination of feed commodities in different regions of Hungary	438-440
Formicki, Grzegorz, Kopańska, M., Kraska, K., Greń, Agnieszka, Kapusta, Edyta, Muchacka, R., Szaroma, W., Goc, Zofia, Semla, M.: Systemic toxicity of acrylamide in swiss mice	441
Galdíková, Martina, Šiviková, Katarína, Dianovský, Ján, Holečková, Beáta, Drážovská, Monika: Evaluation of chromosomal damage induced by thiacloprid-based insecticide in bovine peripherial lymphocytes in vitro	442-447
Géczi Gábor, Korzenszky Péter, Horváth Márk, Molnár Erik: Heat treatments versus fermentation	448-454

Głogowska, Marta: The concentration of mercury in kidney cancerous and control tissues of human	455-459
Głogowska, Marta, Stawarz, Robert: The content of mercury in body of men treated in Cracow oncology and specialist hospitals	460-463
Goc, Zofia, Kilian, K., Stawarz, R., Formicki, G Grzegorz, Szaroma, W., Greń, Agnieszka, Kapusta, Edyta: Influence of smoking on selected metals and antioxidants in breast milk	464
Greczek-Stachura, Magdalena, Zagata, Patrycja: Investigation of the Paramecium toxicity test for detecting of heavy metals in an aquatic enviroment	465
Greň, Agnieszka, Formicki, Grzegorz, Tvrdá, Eva, Goc, Zofia, Kňažická, Zuzana, Lukáčová, Jana, Lukáč, Norbert, Massányi, Peter, Kapusta, Edyta: Effect of resveratrol on antioxidants in diabetic mice	466
Grešáková, Ľubomíra, Čobanová, Klaudia, Faix, Štefan: Effects of dietary fusarium mycotoxins on activity of antioxidant enzymes in chickens	467-470
Halenár, Marek, Medveďová, Marína, Maruniaková, Nora, Kolesárová, Adriana: Possible effect of amygdalin in combination with deoxynivalenol on secretion activity of porcine ovarian granulosa cells in vitro	471-476
Haščík, Peter, Elimam, Ibrahim, Garlík, Jozef, Bobk, Marek, Čuboň, Juraj: The effect of bee pollen as supplement dietary for meat pH, cooling and freezing loses on broiler chickens meat	477-482
Haščík, Peter, Garlík, Jozef, Elamin, Ibrahim Omer Elimam, Kačániová, Miroslava, Kńazovická, Vladimíra: The effect of the propolis extract on broiler hubbard jv. interal fat	483-489
Holovská, K., Almášiová, V., Cigánková, V.: Xenobiotic - induced peroxisomes in the rabbit liver	490-494
Janan, Janbaz, Hutás, István, Treuer, Ákos, Csépányi, Béla, Páli, Jenő: Attempt to reduce Salmonella contamination in a commercial turkey flock with feed additive premixes	495-500
Kačániová, Miroslava, Capcarová, Marcela, Petrová, Jana, Haščík, Peter, Hleba, Lukáš: Microflora of rabbits after quercetin and T-2 toxin applications	501-506
Kádasi Attila, Kolesárová, Adriana, Maruniaková, Nora, Grossmann, Roland, Alexa, Richard, Štochmaľová, Aneta, Sirotkin, Alexander V.: The effect of resveratrol on porcine ovarian granulosa cell functions	507-511
Kalafová, Anna, Kováčik, Jaroslav, Capcarová, Marcela, Massányi, Peter, Kolesárová, Adriana, Chrastinova, Lubica, Lukáč, Norbert, Schneidgenova, Monika, Čurlej, Jozef, Parkányi, Vladimír, Jurcik, Rastislav, Ondruska, Lubomir: Effect of 8-week nickel and zinc co-administration on chosen haematological parameters in rabbits	512

Kerti Annamária, Morlin Zsófia Márta, Pajor Ferenc, Bárdos László: Determination of hemoglobin content in whole blood and in dried blood spots in lambs	513-516
Kiss Zsuzsanna, Kerti Annamária, Szabó Csaba, Karchesz Krisztina, Bárdos László: Pasta preparation by coloured natural antioxidants	517-523
Kolesárová, Adriana, Maruniaková, Nora, Medveďová, Marína, Halenár, Marek, Kádasi Attila, Marques, Andreia Filipa Tomás, Bulla, Jozef: Assesment of benefical and toxic effects of natural substances on ovarian functions	524-530
Kopańska, M., Formicki, G., Kraska, K., Slanina, T., Lukáčová, J., Čupka, P.: Analysis of Na+/K+ ATPase activity in selected brain structures of mice after intra-peritoneal injections of Streptozotocin	531-537
Kraska, K., Formicki, G., Kapusta, E., Goc, E., Kopańska, M.: The activity of catalase and content of reduced glutathione in testes of mice exposed to acrylamide	538
Kročková, Jiřina, Massányi, Peter, Paál, Dušan, Kováčik, Anton: In vitro effect of taurine on rabbit sperm motility	539-544
Kwolek-Mirek, Magdalena, Zadrąg-Tęcza, Renata: Effects of antioxidants on acrolein-induced oxidative protein damage in the yeast Saccharomyces Cerevisae	545-550
Lis, M.W., Cichy, A., Trzeciak, K.B., Pawlak, K., Dżugan, M., Niedziółka, J.W.: Effect of alfa-tocopherol in ovo supplementation on chick embryo development	551
Lisowska-Lis, A., Lis, M.W.: Application of thermography in cows productivity evaluation: the correlation between the body temperature and milk yield	552
Lukáčová, Anetta, Tvrdá, Eva, Golian, Jozef: Concentration of malondialdehyde (MDA) in meat products during production	553-557
Lukáčová, Jana, Tvrdá, Eva, Lukáč, Norbert: The effect of an in vitro exposure to octylphenol on bovine spermatozoa	558-566
Luptáková, Lenka, Petrovová, Eva, Šťavová, Ľubica: Diagnostcis of Toxoplasma Gondii in milk samples of sheep from eastern Slovakia	567-569
Lutnicka, Hanna, Ludwikowska, Agnieszka, Pecio, Anna, Bojarski, Bartosz: Structural changes in the posterior kidney of fish exposed to mancozeb	570
Nagy Péter, Bakonyi Gábor: Introduction of the ecotoxicologist masters´ degree at SZIU	571
Omelka, Radoslav, Bauerová, Mária, Stawarz, Robert, Formicki, Grzegorz, Baláž, Ivan, Martiniaková, Monika: The content of risk elements in bones of bank vole (*Myodes glareolus*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from Kolinany area (Slovakia)	572-576

Petrovova, E., Mazensky, D., Luptakova, L.: Fibriotic changes in the rabbit liver after pesticide administration	578-582
Petruška, P., Zbyňovská, K., Kalafová, A., Kolesárová, A., Capcarová, M.: Effect of chronic application of quercetin and acute dose of T-2 toxin on content of serum bilirubin and albumins of rabbits	583-588
Skalická, Magdalena, Maskaľová, Iveta: Comparison of the mineral content in different ruminant feeds	589-592
Slanina, Tomáš, Kichi, Leila, Miškeje, Michal, Petrovičová, Ida, Kováčik, Anton, Formicki, Grzegorz, Massányi, Peter: The effect of crude glycerol on canine spermatozoa motility	593-597
Šutiaková, Irena, Kovalkovičová, Natália, Sopková, Drahomíra, Kravcová, Zuzana, Tulenková, Mária: The effect of bisphenol A on sheep lactate dehydrogenase enzyme system in vitro	598-602
Szabó Csaba, Kerti Ananmária, Pajor Ferenc, Póti Péter, Bárdos László: The immunological effect of heat stress in laying hens with use of apple cider vinegar, betaine and their combination in drinking water	603
Toman, Robert, Lukáč, Norbert, Massányi, Peter, Hájková, Zuzana: Changes of blood parameters associated with nickel administration in rats	604-611
Tongel, Peter: Using of rapid electronic tests for mastitis detection	612
Venglovská, Katarína, Čobanová, Klaudia, Grešáková, Ľubomíra: The effect of various manganese sources on egg quality parameters of laying hens	613-618
Vollmannová, Alena, Krížová, Lívia, Poláková, Zuzana, Dániel, Ján, Medvecký, Michal: Hazardous metals and bioactive compounds in cranberry fruits in the first and the second harvest	619-625
Weis, Ján, Hrnčár, Cyril: Effect of probiotic supplementation on performance of different broiler genotypes	626-632
Zadrąg-Tęcza, Renata, Kwolek-Mirek, Magdalena: Assesment of acrolein-induced cellular damage in the yeast Saccharomyces Cerevisiae cells using microscopy techniques	633-639
Zagata, Patrycja, Greczek-Stachura, Magdalena: Acute toxicity of Nickel towards freshwater ciliate Paramecium bursaria	640
Zbynovska, Katarina, Emrichova, Jana, Kalafová, Anna, Petruska, Peter, Ondruska, Lubomir, Jurcik, Rastislav, Chrastinova, Lubica, Kováčik, Anton, Schneidgenova, Monika, Tusimova, Eva, Capcarová, Marcela: Haematological changes in rabbit´s blood after two weeks exposure of patulin	641-645

Zigo, F., Vasil, M., Elečko, J., Farkašová, Z., Bulla, J.: Enterotoxogenic potential the same bacteria of Staphylococcus spp. in mastitis of dairy cows and sheep	646-651
Zyśk, Bartłomiej, Binkowski, Łukasz, Guzik, Marek, Stawarz, Robert, Schimscheiner, Lucjan: Lead and copper content of the roach, white bream and perch organs	652-658

THE INFLUENCE OF LAMENESS OF HOLSTEIN BREED MILK COWS ON THEIR DAIRY YIELD

Andrýsek J., Liprtová L., Falta D.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
xandryse@node.mendelu.cz

Abstract

In this project we were occupied with the influence of lameness on dairy yield of Holstein breed milk cows. Experiment was carried out in Farma Papůvka in Pňovice. 59 cows were diagnosed as having lameness. For comparison, there were 59 milk cows without limping symptoms chosen by random sampling and joined to previous milk cows. As monitored parameter the actual milk yield, the fat content, content of protein and lactose were evaluated. We have found out that milk cows without lameness had average actual milk yield 14,90 kg of milk, average protein content 3,12% and average lactose content 4,67%. Unlike these, milk cows with lameness had actual milk yield 11,48 kg of milk, the protein content 3,31% and lactose content 4,92%. These differences were evaluated as highly statistically significant ($P<0,01$) in every cases. Only the average fat content (with healthy milk cows 4,22% and with affected milk cows 4,48%) was not statistically significant. Based on these results, we can pronounce that the lameness of cattle decreases the yield about 23% in our case. The content of compounds in milk has not changed in largely.

Key words: milk cows, limping, lameness, milk yield, Holstein cattle

Introduction

The abolition of binding stabling has become a turning point in milk cow breeding. Changeover to loose stabling brought many advantages but during the time also negatives occurred. One of the problems which arose after yield increasing, changes in feeding system and stabling, was increasing a number of limping cows due to cloven hooves disease.

Structure extremity of cattle was evolutionarily adapted for walking on pastures i.e. soft surface. Concrete or grid floors of loose stabling do not respond to physiological needs of cattle extremities and together with even hardly perceptible influences the development of cloven hooves disease occurred. Some breeders do not realize the impact of cloven hooves disease on the rentability of breeding, not even in economically inauspicious present.

Good health condition of extremities and cloven hooves is an important prerequisite for successful milk cows breeding. Because milk cow which suffers with extremities pains spends more time by lying and therefore it takes less feed in, produces less milk, loses weight and becomes to have reproduction problems. In dairy cattle breeding the limping is classified together with mastitis and reproduction disorders as one of the most spread production disorders. So that it is convenient to pay attention to prevention since heifer age. This can keep cloven hooves disease on acceptable limits.

Material and methods

Sampling of milk was carried out from November 2011 to May 2012 on Farma Papůvka with Holstein breed milk cows. 118 samples were analysed, actually 59 from limping milk cows and 59 from healthy milk cows. Before each sampling, walk of milk cows was assessed when walking through milking parlour. According to this milk cows were sorted into groups. Two groups were created with each breed. The first group – limping milk cows with visual walking or extremities disorders have lightened during milking. Second group – healthy, without visual marks of limping and extremity lightening during milking. Milk cows from first to third lactation were put on experiment from 45 to 260 day lactation.

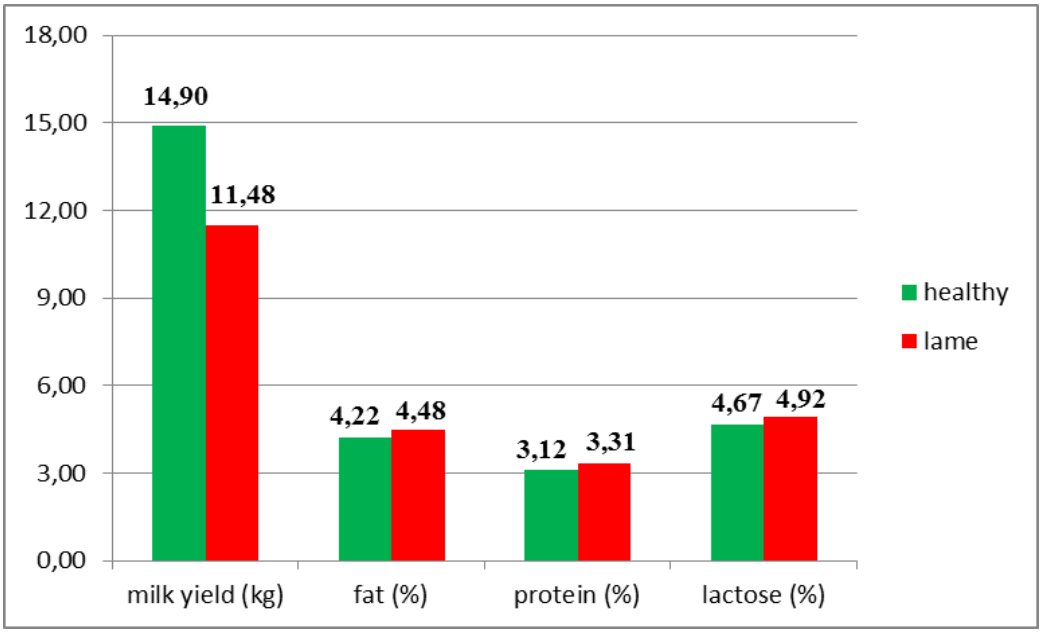
Milk cows which were limping because of irregular extremity stance, with chronic limping and treated milk cows were not included into experiment. Milk was sampled always during the evening milking. After dripping the milk off into vessel, 120 ml of milk was taken into sample container and after ending of milking all the taken samples were cooled down. With chosen milk cows actual amount of drawn milk was recorded. Samples were transported into laboratory of Department of Animal Breeding in Mendel University in Brno the following day where the analyses were carried out. Content of fat (%), proteins (%), lactose (%) were established at each sample using the Julie C5 Scope Elektric apparatus.

Cloven hooves disease diagnostic was carried out according to symptoms which are described in professional literature. After consultation with experts disease diagnosis were made and adjustments of cloven hooves was realized. In the case of need a chirurgical elimination of problem and following treatment was carried out by authorized person.

Results and discussion

Figure 1 shows average values of chosen dairy yield indices comparing healthy and limping milk cows. With milk cows without lameness an average milk yield was 14,90 kg of milk (min. 11 kg and max. 22,30 kg). With limping cows an average milk yield was only 11,48 kg of milk (min. 7,30 kg and max. 17,70 kg). Difference between groups was statistically highly significant ($P<0,01$). An average fat content was with group of healthy milk cows 4,22% (min. 2,93% and max. 5,72%) and with group of limping milk cows 4,48% (min. 2,41% and max. 6,60%). There was no statistically significant difference between healthy and limping milk cows found out. An average protein content was with group of healthy milk cows 3,12% (min. 2,63% and max. 3,52%) and with limping milk cows 3,31% (min. 2,96% and max. 4,10%). There was highly statistically significant difference ($P<0,01$) between healthy and limping milk cows found out. Also content of lactose was analysed. With group of healthy milk cows it was 4,67% in average (min.4,11% and max. 5,25%). Slightly increased was lactose content with limping milk cows 4,92% (min. 4,33% and max. 6,12%). Difference between both groups was also highly statistically significant ($P<0,01$).

Figure 1. **An average values of chosen dairy yield indices**



According to results, with cloven hooves disease of milk cows a yield decreasing occurs. This affirms *Amory et al.* (2008), *Bečvář et al*. (2002), *Hernandez* et al. (2002) and *Nehasilová* (2007), who states a year milk lost due to cloven hooves disease up to 1000 kg. Also *Warnick et al*. (2001) found out that milk production decreased in average about 0,8 kg per milk yield with limping milk cows. Significant relation of milk yield decreasing at walking disorders is then stated by *Hernandez et al*. (2005), *Bicalho et al.* (2008) and *Novák* (2010), who states that limping milk cows have lower food intake and this causes a decrease of milk yield. *Kocak and Ekiz* (2006) monitored changes in milk amount from one milk yield with Holstein cows and found out that mostly decreased milk yield was with limping milk cows in the first week after diagnose in extent of 3 kg of milk. This is also supported by our results which show decreasing of milk amount with healthy milk cows comparing to limping milk cows about 3,42 kg of milk.

Also a slight increase of fat, protein and lactose content with limping milk cows comparing to healthy milk cows was obvious. However, *Juarez et al*. (2003) states that content of fat and proteins in milk is decreased due to worsening moving score of milk cows caused by cloven hooves disease. While in our project we have gained opposite results. Increasing of compounds content in milk could be caused by total milk amount. *Gajdůšek and Klíčník* (1991) state that decreasing of milk amount result an amount of compound content in milk. *Bouška* et al. (2006) than states that stress influences a milk yield negatively. The content of lactose in milk was in physiological range comparing to studies of *Gajdůška* (2003) and *Doležala et al*. (2000). They state a lactose content in milk from 4,55 to 5,30 %. The state of lactose is influenced by phase and order of lactation, higher milk yield and state of health of mammary gland (*Gajdůšek*, 2003).

Conclusion

Rentability of milk cows breeding is decided by many influences. Largely, cloven hooves disease participates on it. Many professionals in our country and many others are focused on this topic because only healthy milk cows with healthy extremities are able to produce such amount of milk which is predicted by its genetic potential.

With the aim to assess the influence of walking disorders i.e. cloven hooves disease on the milk yield of Holstein cows, the experiment with milk cows on Farma Popůvka was carried out. The influence of cloven hooves disease on drawn milk amount, fat content, protein content and lactose content was monitored.

We found out that milk cows without lameness had average actual milk yield 14,90 kg of milk, average protein content was 3,12 % and average lactose content was 4,67 %. To the contrary, milk cows with lameness had actual milk yield 11,48 kg of milk, protein content 3,31 % and lactose content 4,92 %. These differences were assessed as highly statistically significant ($P<0,01$) in every cases. Only the average content of fat (with healthy milk cows 4,22 % and with milk cows with lameness 4,48 %) was not statistically significant.

According to gained results, we can state that cattle lameness decreases in our case dairy yield about 23%, while the content of compounds did not changed largely. So, it is important to pay attention to cattle lameness because it is reflected in breeding economy and last but not least in welfare of milk cows.

References

Amory J.R., Barker Z.E., Wright J.L., Mason A., Blowey R. W. A Green L.E. (2008): Associations between sole ulcer, white line disease and digital dermatitis and the milk yield of 1824 dairy cows on 30 dairy cow farms in England and Wales from February 2003–November 2004. Preventive Veterinary Medicine, 83. 3-4. 381–391.

Bečvář O., Divoký L., Doležal O., Král E. A Mikulka P. (2002): Základy péče o paznehty. Tiskárny B.N.B., Velké Poříčí, 48.

Bicalho, Warnick L.D. A Guard C.L. **(**2008): Strategies to Analyze Milk Losses Caused by Diseases with Potential Incidence Throughout the Lactation: A Lameness Example. Journal of Dairy Science, 91. 7. 2653–2661.

Doležal O., Hlásný J., Jílek F., Hanuš O., Vegricht J., Pytloun J., Matouš E. A Kvapilík J., (2000): Mléko, dojení, dojírny. Agrospoj Praha, 241.

Gajdůšek S. (2003): Laktologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 84.

Gajdůšek S., Klíčník V. (1991): Mlékařství (návody do cvičení). Vysoká škola zemědělská, Brno, 95.

Hernandez J., Shearer J.K. A Webb D.W. (2002): Effect of lameness on milk yield in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association. 220. 5. 640-644.

Hernandez J., Garbarino A.E.J., Shearer J.K., Risco C.A.A., Thatcher W.W. (2005): Comparison of milk yield in dairy cows with different degrees of lameness. Journal of the American Veterinary Medical Association. 227. 8. 1292–1296.

*Juarez S.T., Robinson P.H., DePeters E.J., Price E.O***.** (2003): Impact of lameness on behavior and productivity of lactating Holstein cows. Applied Animal Behaviour Science, 83. 1. 1-14.

*Kocak O., Ekiz B***.** (2006): The Effect of Lameness on Milk Yield in Dairy Cows. Acta Veterinaria Brno. 75, 1, 79-84.

Nehasilová D., (2007): Nové trendy v oblasti chovu dojených krav. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, 34–37.

*Novák M***.** (2010): Vliv výživy na vznik laminitidy. Zemědělec, 18, 32, 14–15.

Warnick D., Janssen G.L., Guard A.G. (2001): The Effect of Lameness on Milk Production in Dairy Cows. Journal of Dairy Science., 84. 9. 1988–1997.

THE EFFECT OF LEPTIN GENE ON BEEF EFFICIENCY OF CZECH FLECKVIEH CATTLE

[1]Filipčík R., [2]Voříšková J., [3]Dufek A., [1]Hošek M., [1]Kleinová J.

[1]Mendel University in Brno, Department of Animal Breeding, Zemedelska 1, 61300 Brno, Czech Republic
[2]Unioversity of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic
[3]Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic
radek.filipcik@mendelu.cz

Abstract

Leptin is a hormone affecting the regulation of body composition, energy balance and meat quality in mammals. The objective of this study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms in coding region for leptin gene with carcass and beef quality of Czech Fleckvieh bulls (n = 75). Three experimental groups of these animals were created depending on different leptin genotypes (CC, n=25; TC, n=26 and TT, n=22). Bulls with TT genotype had the lowest ($p<0.05$) content of intramuscular fat (1.77 ± 0.13%) in beef. The content of total protein (CC = 21.25; CT = 21.20; TT = 20.87%) and collagen (CC = 2.57; CT = 2.27; TT = 2.42 g.100g-1) was not affected ($p>0.05$) by leptin gene, but there was significant effect of leptin gene on the colour of beef. Meat had the brightest red colour (L* = 33.87–36.77; a* = 9.03–10.12; b* = 7.95–9.17), which is desireable for buyers, consumers.
Key words: Czech Fleckvieh cattle, leptin, beef quality

Introduction

Meat quality is of great importance to the beef industry where the consumer is willing to pay more for superior products (*Shackelford et al.* 2001*; Dekkers and Hospital*, 2002). Traditionally trait improvement in livestock has used quantitative genetics theory to determine animals with high genetic merit. This selection approach is most effectively implemented for highly heritable traits that are easily measured. Meat quality traits can usually only be measured post-slaughter and often have low heritabilities (*Gill et al.,* 2010*).* Marker assisted selection has the potential to increase the rate of genetic improvement. Markers found in various candidate genes linked to economically relevant traits have been identified and incorporated into commercially available genetic tests for meat quality. The leptin gene located on bovine chromosome 4, encodes leptin, a peptide hormone, which is synthesized and secreted by adipose tissue (*Zhang et al.* 1994). Leptin is a hormone affecting the regulation of body composition, energy balance and meat quality in mammals (*Tian et al.* 2013). The concentration of leptin could be seen as an indicator of marbling, back fat depth and yield and quality grade in feedlot cattle (*Geary et al.* 2003). Markers at promoter regions of the bovine leptin gene have been shown to be associated with carcass and meat quality traits (*Nkrumah et al.* 2005).
The aim of this study was to evaluate associations of leptin gene on beef quality traits in Czech Fleckvieh cattle.

Material and methods

The experiment was carried out on beef farm in southern Moravia, the Czech Republic. The experimental animals, 75 pure-bred Czech Fleckvieh bulls, were loose-housed in pens with slatted floors from the age of 6 months till slaughter. Three experimental groups of these animals were created depending on different leptin genotypes (CC, n=25; TC, n=26 and TT, n=22). Blood samples (2 ml) were collected into tubes with EDTA. Blood was stored at -20 ^{0}C. Genomic DNA was isolated from blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). The quality of DNA was verified by agarose gel electrophoresis in 1% gel visualized with ethidium bromide. Genotypes were determined based on molecular genetic analysis of singel-nucleotide polymorphism (SNP) in the exon 2 of the leptin gene (transition C → T) (*Buchanan et al.,* 2002). For testing, we used our own methodology. PCR primers were designed based on GenBank U50365 sequence (FW: 5'TCGTTGTTATCCGCATCTGA 3 ', REV: 5'TACCGTGTGTGAGATGTCATTG 3'). The PCR was performed in 12.5 μl volumes containing 25 ng of bovine genomic DNA, 1x HotStarTaq Master Mix (Qiagen) and 0.2 μM of each forward and reverse primer. A PCR thermal profile consisted of pre-denaturation at 95 °C for 2 min; followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at temperature 56°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s; and final extension at 72°C for 7 min. The obtained PCR products of 278 bp in size were verified on 3% agarose gel and resequenced using the ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer. The polymorphic locus (C/T) is located at position 204 of the fragment. Genotypes were determined based on the sequence. They were fed an identical feed ratio based on an ad libitum intake of maize silage and a limited amount (3 kg per bull per day) of a concentrate which consisted of 50% crushed barley and 50% of soya meal with a mineral and vitamin additive. Bulls were slaughtered at the age of 620 days. The average weight gain during fattening was 822 ± 108 g per day. The carcasses (weight ranged from 395 to 463 kg) were classified to the class of meatiness "U" and "R" and the class of fattiness "2". The beef samples (*musculus longissimus lumborum et thoracis*) were excised from carcass at the half cutting level between 9th and 10th rib and analysed. For chemical analyses, dry matter was determined in 5 g samples pre-dried at 60 °C for 2 h, mixed with dry sea sand and dried at 105 °C for 6 h. Ash content was measured gravimetrically after burning the sample (2 g) in a muffle laboratory oven (LMH 11/12; LAC Rajhrad, Czech Republic) at 550 °C for 8 h. Protein (Kjeldahl nitrogen×6.25) and collagen content was determined according to the AOAC methods (2000 and 1996, respectively). Myoglobin concentration was measured as described by *Hornsey* (1956). Intramuscular fat (IMF) was determined gravimetrically after spiking 50 g of the MQF sample with 5 ml of the internal standard solution (2.5 mg of C15:0/ml isooctane; Supelco) and extraction with petrol ether in a Soxhlet extractor for 6 h. Water holding capacity was determined in 2 g of the MQF samples according to *Honikel* (1998). Meat colour was estimated based on the L*a*b* system (lightness, redness, yellowness; Centre Internationale de l'Eclairage, 1976) using a Konica Minolta CM-2600d spectrophotometer containing an integrated spectral component, a D65 illuminator and a 10° observer. Cut surface was exposed to the air at ambient temperature (blooming) for 1 h before the colour was measured. Experimental data were assessed using STATISTICA software, version 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), where the genotypic effects of leptin gene on meat quality parameters was carried out using the GLM procedure.

Results and discussion

The chemical analysis of the MLT (*Table 1*) revealed several significant differences between leptin genotypes. The TT samples had the lowest content of dry matter (26.14 ± 0.11%). A significantly ($p<0.05$) higher level of dry matter (27.03 ± 0.27%) was found in CT genotype. Content of the total protein was from 20.87% (TT genotype) to 21.25% (CC genotype). No differences in protein content were observed by *Velik et al*. (2008) between Fleckvieh and Fleckvieh x Charolais. *Bartoň et al.* (2010) cite the same content of protein in the Czech Fleckvieh bulls (21.18 ± 1.3 %). The lowest ($p>0.05$) rate of collagen (2.57 ± 0.15 g.100g^{-1}) was detected in beef Czech Fleckvieh cattle with CC genotype for leptin gene. *Dubost et al*. (2013) published lowest content of collagen in beef. Authors presented significant differences ($p<0.05$) among Aberdeen Angus (4.69 g.100g^{-1}), Limousine (3.73 g.100g^{-1}) and Blond d´Aquitaine (3.61 g.100g^{-1}). The same results have already been shown by *Christensen et al*. (2011) and *Jurie et al*. (2011). Significant ($p<0.05$) differences were approved between genotype CT (2.51%) and CC (1.84%), respectively CT (2.51%) and TT (1.77%) in intramuscular fat (IMF) content. *Scollan et al*. (2006) claim that lean beef has low IMF content typically 2–5% and in many countries this is regarded as being "low in fat". *Nürnberg et al*. (2005) found out no differences in IMF contents between German Holstein and German Simmental bulls. By contrast, the differences in the IMF content caused by breed were reported a.g. by *Bureš et al*. (2006) and *Cuvelier et al*. (2006).

***Table 1*: Nutritional quality traits in Czech Fleckvieh bulls**

Trait	Genotypes					
	CC		CT		TT	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
Dry matter (%)	26.43^{a}	0.15	27.03^{b}	0.27	26.14^{a}	0.11
Intramuscular fat (%)	1.84^{a}	0.16	2.51^{b}	0.33	1.77^{a}	0.13
Total protein (%)	21.25	0.14	21.20	0.15	20.87	0.15
Collagen (g.100 g^{-1})	2.57	0.15	2.27	0.12	2.42	0.08
Ash (%)	1.07	0.01	1.05	0.01	1.08	0.01

a, b: means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$

***Table 2*: Technological quality traits in Czech Fleckvieh bulls**

Trait	Genotypes					
	CC		CT		TT	
	LSM	± SE	LSM	± SE	LSM	± SE
Water holding capacity (%)	81.97^{a}	1.14	81.39	0.83	79.01^{b}	0.51
pH_{48}	5.79	0.09	5.71	0.06	5.62	0.05
Myoglobin ($mg.g^{-1}$)	3.84^{a}	0.14	3.63	0.11	3.45^{b}	0.11
L*	33.87^{A}	0.76	34.51^{A}	0.63	36.77^{B}	0.53
a*	9.03^{a}	0.37	9.89	0.30	10.12^{b}	0.42
b*	7.95^{A}	0.36	7.99^{A}	0.31	9.17^{B}	0.29

a, b: means with different superscripts are significantly different at $p<0.05$, respectively A, B: means with different superscripts are significantly different at $p<0.01$

The TT samples had the lowest ($p<0.05$) content of water holding capacity (79.01 ± 0.51%) than meat from group of bulls with genotype CC (81.97 ± 1.14%). The same trend, declining value from genotype CC (5.79) to TT (5.62), was found in pH_{48}. *Tian et al*. (2013) approved significant ($p<0.05$) differences in pH of beef from Simmental bulls between genotype TT and CC. Accelerated pH decline is associated with the development of low water holding capacity (*Huff-Lonergan and Lonergan*, 2005). Statistically significant effect of leptin genotypes on the colour of beef was found. The brightest red meat was obtained from genotype TT (L* = 36.77 ± 0.53; a* = 10.12 ± 0.42) and the darkest meat from genotype CC (L* = 33.87 ± 0.76; a* = 9.03 ± 0.37). The same trend was found in yellowness (b*) value (CC = 7.95 < CT = 7.99 < TT = 9.17). A comparable results of the colour of beef evaluation were reported by *Huuskonen et al*. (2010). *Li et al*. (2013) indicated no significant ($p > 0.05$) effect of leptin gene on colour of beef. *Kadim et al*. (2004) and *Weglarz* (2010) reported relationships between the value of colour parameters L*, a* and b* in different slaughter seasons of the year.

Conclusions

The effect of leptin gene on beef quality was proved in Czech Fleckvieh cattle population. Bulls with TT genotype had the lowest content of intramuscular fat in beef, meat had the brightest red colour, which is desireable for buyers, consumers. The content of the total protein and collagen was not affected by leptin gene, but there was a significant effect of leptin gene on the colour of beef.

Acknowledgements

This study was supported by project No. QI91A055 which is financed by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

References

Bartroň, L., Bureš, D., Kudrna, V. (2010): Meat quality and fatty acid profile of the musculus longissimus lumborum in Czech Fleckvieh, Charolais and Charolais x Czech Fleckvieh bulls fed different types of silages. Czech Journal of Animal Science, 55. 479-487.

Buchanan, F.C., Fitzsimmons, C.J., Van Kessel, A.G., Thue, T.D., Winkeman-Sim, D.C., Schmutz, S.M. (2002): Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetics Selection Evolution, 34. 105-116.

Dekkers, J.C.M., Hospital, F. (2002): The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. Nature Reviews. Genetics, 3.22−32.

Dubost, A., Mocol, D., Meunier, B., Lethias, C., Listrat, A. (2013): Relationships between structural characteristics of bovine intramuscular connective tissue assessed by image analysis and collagen and proteoglycan content. Meat Science, 93. 378–386.

Honikel, K.O. (1998): Reference methods for the assesment of physical characteristics of meat. Meat Science, 49. 447–457.

Hornsey, H.C. (1956): The color of cooked cured pork. 1. Estimation of the nitric oxidehaem pigments. Journal of the Science of Food nad Agriculture, 7. 534 – 540.

Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M. (2005): Mechanisms of water-holding capasity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. Meat Science, 71. 194 – 204.

Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., Sanudo, C., Richardson, R.I., Nute, G.R., Olleta, J.L., Panea, B., Alberti, P., Juarez, M., Hocquette, J.F., Williams, J.L. (2011): Relationship between collagen characteristics, lipids contentand raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen european breeds. Meat Science, 87. 61 – 65.

Geary, T.W., McFadin, E.L., MacNeil, M.D., Grings, E.E., Short, R.E., Funston, R.N., Keisler, D. H. (2003): Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. Journal of Animal Science, 81. 1–8.

Gill, J.L., Bishop, S.C., McCorquodale, C., Williams, J.L., Wiener, P. (2010): Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. Meat Science, 86. 985 – 993.

Huuskonen, A., Jansson, S., Honkavaara, M., Tuomisto, L., Kauppinen, R., Joki-Tokola, E. (2010): Meat colour, fatty acid profile and carcass characteristics of Hereford bulls finished on grazed pasture or grass silage-based diets with similar concentrate allowance. Livestock Science, 131. 125 – 129.

Jurie, C., Picard, B., Micol, D., Listrat, A., Kammoun, M., Horcquette, J.F. (2011): Muscle characteristics from young bulls of different beef breeds. In 57th ICoMST, M. Science, Ghent, Belgique, 243 – 324.

Kadim I.T., Mahgoub, O., Al-Ajmi, D.S., Al-Maqbaly, R.S., Al-Mugheiry, S.M., Bartolome, D.Y. (2004): The influence of season on quality characteristics of hot-boned beef m. longissimus thoracis. Meat Science, 66. 831 - 836.

Nkrumah, J.D., Hansen, C., Keisler, D.H., Li, C., Irving, B., Wang, Z., Moor, S.S. (2005): Relationship between serum leptin concentration and BW, feed intake, ultrasound traits and carcass merit of hybrid beef cattle. Journal of Dairy Science, 88. 167 – 167.

Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Meade, M.K., Reagan, J.O., Byrnes, B.L., Koohmaraie, M. (2001): Consumer impressions of Tender Select beef. Journal of Animal Science, 79, 2605−2614.

Tian, J., Zhao, Z., Zhang, L., Zhang, Q., Yu, Z., Li, J., Yang, R. (2013): Association of the leptin gene E2-169T>C and E3-299T>A mutations with carcass and meat quality traits of the Chinese Simmental-cross steers. Gene, 518. 443 – 448.

Velik, M., Steinwidder, A., Frickh, J.J., Ibi, G., Kolbe-Romer, A. (2008): Effect of ration, sex and breed performance and meat quality of cattle from suckler cow systems. Zuchtungskunde, 80. 378 – 388.

Weglarz, A. (2010): Meat quality defined based on pH and colour depending on cattle category and slaughter season. Czech Journal of Animal Science, 55, 548 - 556.

Zhang, Y.J., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 372. 425–432.

EFFECT OF INCREASING TEMPERATURE AND CHANGES IN RELATIVE HUMIDITY ON COMPOSITION AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF BULK MILK SAMPLES FROM CZECH FLECKVIEH BREED

Javorová, J., Falta, D., Velecká, M., Andrýsek, J., Večeřa, M., Studený, S., Chládek, G.

Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy,
Department of Animal Breeding
613 00 Brno (CZ). Zemedelska 1
Javorova.J@seznam.cz

Abstract

Objective of this research was monitored effect of increasing temperature and changes in relative humidity on composition and technological properties of milk. During the period of 9.6.2013 to 21.6.2013 were analysed 13 bulk milk samples from morning milking (sampled daily) obtained in herd of Czech Fleckvieh cows from farm GenAGRO Říčany, a.s. (GPS 49°12'32.319"N, 16°23'42.666"E). Monitored climatic factors were follows: average diurnal temperature (ADT), relative humidity (RH). Monitored milk parameters were follows: content of fat, protein content, lactose content, solids-non-fat content, milk yield, specific density, active acidity, titratable acidity, freezing point of milk, rennet coagulation time and curd quality. It was also found that with increasing ADT statistically highly significantly ($P<0.01$) increases active acidity ($r = 0.80$) and rennet coagulation time ($r = 0.78$). Amount of milk fat was increasing very highly significantly ($r = 0.88$; $P<0.001$). With increasing ADT statistically significantly ($P<0.05$) decreases milk yield ($r = -0.65$) and specific density of milk ($r = -0.66$). Titratable acidity was decreasing statisticaly highly significantly ($r = -0.75$; $P<0.01$). It was not found statistically significant ($P>0.05$) difference between RH and other measured parameters.
Key words: Temperature, relative humidity, milk composition, technological properties, Czech Fleckvieh

Acknowledgments: The study was done thanks AF MENDELU IGA TP 2/2013.
Abbreviation key: ADT – average diurnal temperature, F – milk fat, FP – freezing point, MY – milk yield, L – lactose, P – milk protein, pH – active acidity, CQ – curd quality, RCT – rennet coagulation time, RH – relative humidity, SD – specific density, SNF – solids-non-fat, TA – titratable acidity,

Introduction

Dairy cows are better adapted to conditions of low temperatures than high temperatures (*Knížková, Kunc,* 2006). Thermal comfort zone of cattle ranges from 10 to 16 °C (*Chládek*, 2004). With increasing milk yield of dairy cows increases the amount of produced heat (*Purwanto et al.*, 1990). In the case of heat stress is reduced feed intake, leading to a reduction of milk yield and changes in milk composition (*Kudrna et al.*, 2004). Dairy cows exposed to high

temperatures, often in conjunction with high relative humidity (RH) or direct sunlight usually respond to reduction of milk production (*Her et al.,* 1988). The main source of humidity in the stable are animals themselves, as well as wet areas and water resources. The amount of evaporation depends mainly on the temperature, the degree of saturation of water vapor and air flow (*Šoch et al.,* 2003). *Dolejš et al.* (1994) indicate the optimal RH for all categories of cattle from 50 to 70% for dairy cows in free stall barn a maximum value of RH 85 %. According to *Kadzere et al.* (2002) is already RH 65% risk for the development of heat stress. The most important climatic factors for the assessment of animal welfare are temperature and relative humidity (*West,* 2003; *Zimbelman et al.,* 2009).

Milk composition, as well as the technological properties of milk is influenced by many factors. It depends on climatic conditions, as well as other effects associated with individuality of dairy cows, nutrition, stage of lactation and others (*Doležal et al.,* 2000). In the Czech Republic was in the years 2011 and 2012 found that dairy cows of Czech Fleckvieh breed reached average milk yield 6766 kg per lactation with 4% of fat and 3.49% of protein (*Anonym*, 2012).

Material and methods

During the period of 9.6.2013 to 21.6.2013 were analysed 13 bulk milk samples from morning milking (sampled daily) obtained in herd of Czech Fleckvieh cows from farm GenAGRO Říčany, a.s. with free stall barn (GPS 49°12’32.319”N, 16°23’42.666”E). This period was chosen with regard to the rising average diurnal temperature in stable. Cows were fed total mixed ration ad libitum and were in various stage of lactation.

Analysis of samples was performed in the laboratory of Department of Animal Breeding at Mendel University in Brno. Content of milk protein (P), milk fat (F), lactose (L), solids-non-fat (SNF) and specific density (SD) was measured on instrument Julie C5 Automatic (Scope Electric) working on the principle of thermo analysis. Active acidity (pH) was measured by a pH meter CyberScan 510. Titratable acidity (TA) was detected by the methodology Soxhlet-Henkel titration of the sample with sodium hydroxide. Freezing point (FP) of milk was measured using an automatic cryoscope Cryostar 1 (Funke Gerber). Rennet coagulation time (RCT) was measured using nefelo-turbidic sensor of milk coagulation according to the methodology of *Přibyla and Čejna* (2006). Curd quality (CQ) was measured after incubation of milk with rennet according *Gajdůšek* (1997) and then placed in classes from 1 to 5. Lower number means higher quality. Milk yield (MY) from morning milking were recorded using a program Fastos 2000. Average diurnal temperature (ADT) and relative humidity (RH) represent the arithmetic mean of the temperatures in the control days, measured every 15 minutes using 3 sensors with HOBO data logger (Onset Computer). For statistical analysis were used programs MS Office Excel 2003 and STATISTICA 10.

Results and discussion

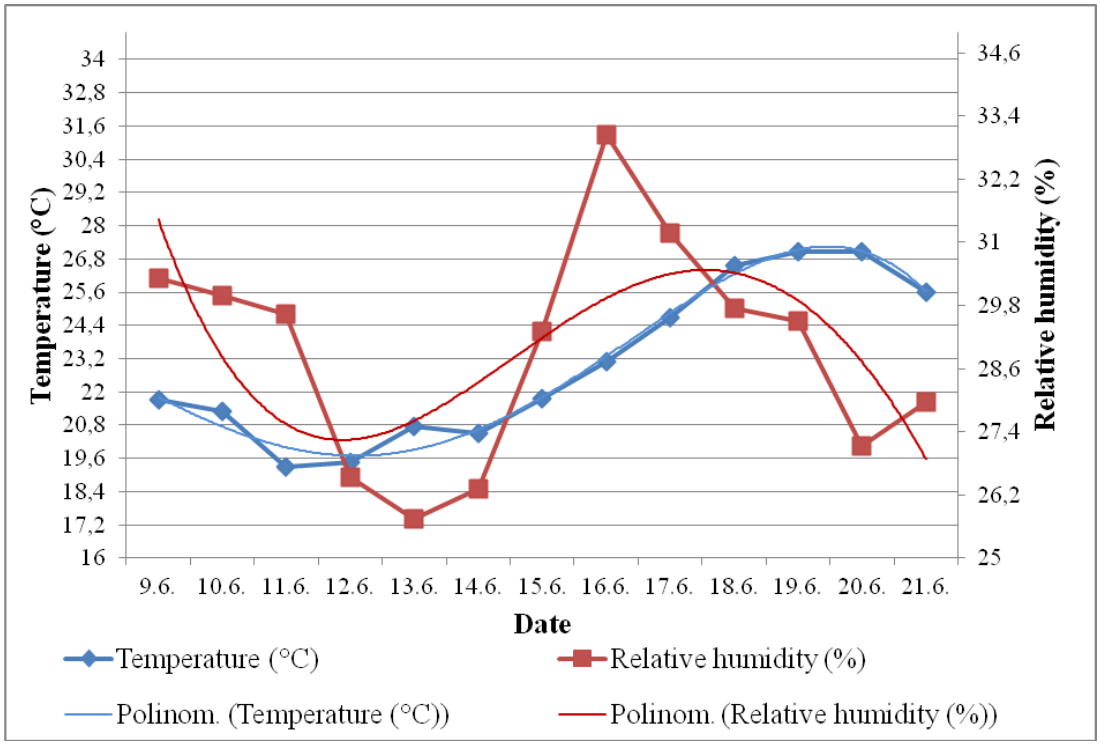
Table 1 illustrates average values of the measured parameters. Average ADT in monitored period was 22.99 °C, with minimum value 19.30 °C a maximum value 27.08 °C. Opinions on the border of thermal comfort and stress are different. *Dolejš et al.* (2002) states that dairy cows are not in thermal comfort zone at temperatures above 16 °C. *Chládek* (2004) considered temperature in thermal comfort zone to 16 °C. On the other hand *Roenfeld* (1998) indicates thermoneutral zone temperature between 5 ° C to 25 ° C. Average RH was measured 28.96% with the minimum value 25.75% and the maximum value 33.05%. *Novák et al.* (1996) states that too dry air (RH

below 35%) have a negative effect on dairy cows (dries the mucous membranes of respiratory tubes and reduces the effect of anti-infective natural barriers). *Figure 1* shows the relationship between ADT and RH during monitored period.

***Table 1*: Average value of the measured parameters (n=13)**

	Unit	$\overline{x}$	Min.	Max.	S_x
ADT	°C	22.99	19.30	27.08	2.88
RH	%	28.96	25.75	33.05	2.11
P	%	3.20	3.13	3.29	0.05
F	%	3.93	3.12	4.44	0.43
L	%	4.77	4.68	4.91	0.06
SD	$kg.l^{-1}$	1.0295	1.0286	1.0309	0.0007
SNF	%	8.69	8.53	8.94	0.12
pH	-	6.67	6.57	6.76	0.06
TA	°SH	6.02	5.50	6.44	0.28
FP	°C	-0.526	-0.529	-0.524	0.002
RCT	sec	217	195	241	16.38
CQ	class	2	1	3	0.60
MY	kg	7405	6485	7858	399.29

***Figure 1*: Relationship between ADT and RH during monitored period**



Average values of the measured parameters are shown in *table 1*. *Table 2* illustrates relationship between climatic parameters (ADT and RH) and milk parameters. Average MY per monitored period was detected 7405 kg with minimum value 6485 kg and maximum value 7858 kg. For MY and ADT was calculated correlation coefficient r = -0.65, which was evaluated as tight, statistically significant (P<0.05) relationship, meaning that with increasing ADT decreases MY. With this conclusion agree *Novák, Rožnovský* (2008), *Zejdová* (2012) found slightly tight correlation relationship r = -0.207. Average content of F was measured 3.93%, with minimum value 3.12% and maximum value 4.44%. For the content of F and ADT was found correlation coefficient r = -0.88, indicating a very tight, very highly statistically significant (P<0.001) relationship. This result is in contrast to the results of many authors. *Drevjany et al*. (2004) and *Javorová* (2012) found that high temperatures have a negative influence on the content of F, while the low temperature causes an increase in the content of F. *Doležal, Abramson* (2009) and *Gajdůšek* (2003) add that this decrease has resulted the heat stress. Average pH value was found 6.67 with minimum value 6.57 and maximum value 6.76. In the relationship of ADT and pH was statistically highly significant difference (P<0.01) and tight correlation relationship r = 0.80. Average value of TA was detected 6.02 °SH. The lowest measured value was 5.50 °SH, the highest 6.44 °SH. Between TA and ADT was found statistically highly significant difference (P<0.01) with a correlation coefficient r = -0.75. *Polák et al.* (2011) found not statistically significant relationship (P>0.05). Average value of RCT during monitored period was 217 sec. Minimum value was measured 195 sec and maximal value was 241 sec. Between RCT and ADT was found statistically highly significant difference (P<0.01) with a correlation coefficient r = 0.78, indicating a close dependence. On the contrary *Polák et al.* (2011) found in they research correlation coefficient r = -0.39 (P<0.01). *Čejna, Chládek* (2006) states that the milk with faster RCT have more favorable properties for cheese making. Among ADT compared with all other measured parameters (content of P, L, SNF, FP and CQ) were not found statistically significant differences (P>0.05).

Among RH and all measured parameters were not found statistically significant differences (P>0.05). *Falta et al.* (2011), however, in his research reached the statistical difference between RH and milk composition (P, F, L). According to *Polák et al.* (2010) RH does not affect on milk composition and technological properties. Results of *Zejdová* (2012) showed a negative correlation between MY and RH r = -0.49. *Falta et al.* (2009) states that the effect of RH on MY is very low (r = -0.06).

***Table 2*: Relationship between climatic parameters (ADT and RH) and milk parameters**

	P	**F**	**L**	**SD**	**SNF**	**pH**	**TA**	**FP**	**RCT**	**CQ**	**MY**
ADT	-0.35	0.88***	-0.31	-0.66*	-0.29	0.80**	-0.75**	-0.40	0.78**	0.36	-0.65*
RH	0.14	0.05	0.12	0.06	0.13	-0.01	-0.06	-0.05	0.23	-0.02	0.31

*= P<0.05, **= P<0.01, ***= P<0.001

Conclusions

Based on the analysis of the effect of rising temperature in the barn and changes in relative humidity on milk production, composition and technological properties of bulk milk samples from dairy cows of Czech Fleckvieh breed was found:

- with increasing average diurnal temperature in stable statistically highly significantly increases active acidity and rennet coagulation time, amount of milk fat was increasing very highly significantly.
- with increasing average diurnal temperature in stable statistically significantly decreases milk yield and specific density of milk, titratable acidity was decreasing statisticaly highly significantly.

Acknowledgement

The study was done thanks AF MENDELU IGA TP 2/2013.

Literature

Anonym (2012): Výsledky mléčné užitkovosti kontrolního roku. Svaz chovatelů českého strakatého skotu 2011-2012 (cit. 1.8.2013) http://www.cestr.cz/clanky-vysledky-kontroly-uzitkovosti-podle-plemen-a-plemenne-knihy.html

Čejna, V., Chládek, G. (2006): Porovnání dojnic holštýnského a montbeliardského plemene, Náš chov. Profi Press s. r. o., Praha, č. 1, 22–24.

Dolejš, J., Toufar, O., Knížek, J. (1994): Vliv mikroklimatických podmínek v uzavřených stájích na užitkovost skotu. Mze ČR, Informační list. 01.01.16.10/1994. 10.

Dolejš, J. et al. (2002): Změna produkčních a etologických charakteristik při tepelném stresu dojnic, Farmář. Profi Press s.r.o., Praha,č. 9,44–45.

Doležal, O. et al. (2000): Mléko, dojení, dojírny. 1. vyd. Agrospoj Praha, 241.

Doležal, O., Abramson, S. (2009): Výživa a krmení při eliminaci tepelného stresu (1.), Náš chov. Profi Press s. r. o., Praha, č. 8, 26 – 28.

Drevjany, Kozel, Padrůněk (2004): Holštýnský svět. 1. vyd. Zea Sedmihorky, s. r. o. ve spolupráci se Zemědělským týdeníkem, 344.

Falta, D., Erbez, M., Loukotová, J., Chládek, G. (2009): Effect of maximal micro-climatic values in stable on milk production of holstein cows on 2nd lactation, Animal Welfare, Ethology and Housing Systems. [online]. In Animal Welfare, Ethology and Housing Systems. sv. 1, s. 59--63. URL: http://www.animalwelfare.szie.hu/.

Falta, D., Polák, O., Chládek, G. (2011):Effect of stable climate on milk content and technological properties of bulk tank samples in Czech pied cattle, Animal Welfare, Ethology and Housing Systems. [online]. In Animal Welfare, Ethology and Housing Systems. 2011. sv. 7, č. 2, s. 143--151. URL: http://www.animalwelfare.szie.hu/sites/default/files/cikkek/201102/AWETH2011143151.pdf.

Gajdůšek, S. (1997): Mlékařství II: (cvičení). 1. vyd. MZLU Brno, 84.

Gajdůšek, S. (2003): Laktologie. 1. vyd. MZLU Brno, 2003, 84.

Her, E., Wolfenson, D., Flamenbaum, I., Folman, Y., Kaim, M., Berman, A. (1988). Thermal, productive, and reproductive responses of high yielding cows exposed to short-term cooling in summer. J. Dairy Sci., 71. 1085–1092.

Chládek, G. (2004): Vliv chovatelského prostředí na kvalitu mléka, s. 11–13. In KUCHTÍK, J. Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 40.

Javorová, J. (2012): Změna obsahu tuku v bazénových vzorcích mléka v průběhu roku a její vliv na technologické vlastnosti. Diplomová práce (knihovna Mendlovy univerzity v Brně), MENDELU, Brno, 68.

Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., Maltz, E. (2002): Heat stress in lactating dairy cows: a review. Livestock Production Science 77,59 – 61.

Knížková, I., Kunc, P. (2006): Teplotní profil krávy a telete, Náš chov. Profi Press, s. r. o., Praha, č. 5, 71–72.

Kudrna, V. et al. (2004): Tepelný stres a výživa, Farmář. Profi Press s.r.o., Praha, č. 8, 44–46.

Novák, P.; Kubíček, K.; Opatřil, M.; Šoch, M.; Zeman, J.; Fišer, A. (1996): Ustájení dojnic ve vztahu k hygieně dojení. Sborník tezí přednášek z mezinárodní konference "Current problems in production and technology of milk, ZF JU České Budějovice, 134 – 135.

Novák, P., Rožnovský J. (2008). Vliv klimatických změn na organizmus hospodářských zvířat. Náš chov, 6. 60-61.

Polák, O., Falta, D., Zejdová, P., Chládek, G. (2010): Vliv průměrných denních teplot ve stáji na složení a technologické vlastnosti bazénových vzorků mléka v letním období. Sborník příspěvků z konference Den mléka 2010, ČZU v Praze, s. 14

Polák, O., Falta, D., Zejdová, P., Večeřa, M., Studený, S., Chládek, G. (2011): Effect of barn microclimate on milk content and technological properties of bulk tank samples in czech fleckvieh cows during the whole year. [CD-ROM]. In MendelNet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students Conference. 593--601.

Přibyla, L., Čejna, V. (2006): Porovnání vizuální a nefelo – turbidimetrické metody pro měření syřitelnosti mléka, s. 110–111. In Den mléka 2006. ČZU Praha, 172.

Purwanto, B. P., Abo, Y., Sakamoto, R., Furumoto, F., Yamamoto, S. (1990): Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. J. Agric. Sci. (Camb.) 114:139–142.

Roenfeld, S. (1998): You can 't affoer to ignore heat stress. Dairy Manage. 35 (5), 6 – 12.

Šoch, M., Basík, M., Novák, P., Vráblíková, J. (2003): Vliv relativní vlhkosti vzduchu a ochlazovací hodnoty prostředí na mléčnou produkci krav. Sborník z mezinárodní bioklimatické konference "Functions of energy and water balances in bioclimatological systems". Bratislava.

West, J. W. (2003): Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle, J. Dairy Sci., 86. 2131 – 2144.

Zejdová, P. (2012): Vliv extrémních hodnot stájového prostředí na chování a mléčnou užitkovost dojnic holštýnského plemene skotu. Dizertační práce (in MS, dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně), MENDELU, Brno, 128.

Zimbelman, R. B., Rhoads, R.P., Rhoads, M.L., Surf, G.C., Baumgard, L. H., Collier, R. J. (2009): A Re-Evaluation of the Impact of Temperature Humidity Index (THI) and Black Globe Humidity Index (BGHI) on Milk Production in High Producing Dairy Cows. Department of Animal Sciences The University of Arizona. Southwest Nutrition & Management Conference February 26. & 27. 2009.

ORGANIC FARMING AND ISSUE OF FOOD SAFETY IN THE CZECH REPUBLIC

Kuchtík[1], J., Šustová[2], K., Zapletal[3], D.

[1]Department of Animal Breeding, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic.
[2]Department of Food Technology, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic.
[3]Department of Animal Husbandry and Animal Hygiene, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic.

Abstract

Organic farming (OF) in the Czech Republic (CZ) does not have a long tradition, as far as the first organic farms (OF) were established at the end of 1989. Between 1989-1997 the development of OF in CZ was slow however since 1998, due to the reintroduction of financial support for OF, there was a radical development of OF found out while this trend has lasted to the present. Specifically at the end of 2012 in CZ there were 3934 registered OFs farming to total 488.658 ha, which represents an 11.40 % share of total agricultural land (AL). The main organic areas are traditionally the less favourable highland and upland areas when the dominant form of land-use is using of permanent pastures (PP), whose share amounted in recent years about 83% of the total area of organically farmed land. This fact is also associated with dominant position of suckler cows breeding and relatively strong position of sheep breeding.

The foundation of the food safety (FS) system in the CZ were laid in 2001, however, in January 2010, the Czech government drawn conclusions on the new "Food Safety and Nutrition Strategy for 2010-2013" when the FS has for a long time ranked among the priorities of the CZ. In the CZ the FS system is coordinated by the Ministry of Agriculture (MoA) and the Ministry of Health, in cooperation with other ministries and other state administration institutions. The risk assessment is conducted by independent state as well as non-governmental research institutes together with colleges and universities. An important role in the process of risk communication is played by non-governmental organisations, professional and consumer associations.

Organic farmers and organic food producers must be registered with the Ministry of Agriculture. Inspection of businesses involved in OF is carried out by 3 control bodies (KEZ, o. p. s., ABCERT AG and Biokont CZ, s. r. o.) authorized for this activity by the MoA.

On the Czech market organic food from abroad are dominant. Organic foods are purchased above all in supermarkets and hypermarkets, and their range is relatively wide and consists mainly of milk and dairy products, bakery products, tea, beef, fruits and vegetables. However range of some organic foods on the Czech market is insufficient (eg eggs) and some are not produced by domestic producers at all (eg oil).

The quality of organic foods is the result of the quality of agricultural and food systems, including controls of their health safety. As a result of ongoing affairs with food quality in the domestic market the State Veterinary Administration run this year a Food Safety Information Center Web site, which informs consumers about the results of current inspections. The vast majority of identified inconvenient foodstuff on the Czech market relates to conventional production while the defective

organic foodstuff were found out only sporadically. However, on the other hand it should be noted that the share of organic food in total food and drink consumption is in the CZ long term under 1 %.

Introduction

Organic farming is a relatively big phenomenon both in European and Czech agriculture while the period from 1990 to the present can be called as a period of radical development of organic farming (OF) both in EU and in the Czech Republic (CR). The period from the year 2000 to the present is also a period when generally more and more coming to the fore the issue of food safety, especially in the context with increasing number of different scandals concerning food safety.

The main aim of our study was to assess the development of organic farming and the issue of food safety in the CR.

Development of organic farming in the Czech Republic from 1990 to the present.

In the period from 1991 to 1997 the development of OF in the CR was relatively slow (*Table 1*), while in 1997 only 211 organic farms were registered and their total area was only about 0.5% of the total area of agricultural land (AL). This fact was mainly affected by reduction of financial support in 1992. However, in 1998, financial support was reintroduced, which is subsequently reflected in a relatively radical increase in the number of organic farms and a significant enlargement of the organic land. This trend has essentially lasted until the present, while at the end of 2012 in the CR were registered 3 934 organic farms farming to total 488 658 ha, which represents an 11.40 % share of total AL. On the other hand, it should be noted that not all organic farms are still included in organic farming because for example during the year 2011 around 240 organic farms ceased their activity. The main reasons for termination of organic activities are not precisely known, but administratively demanding and strict controls represent a major problem for some organic farmers. From time to time are also found serious shortcomings in the keeping of organic standards on the farms, which ultimately led to the cancellation of registration. However it is necessary to add to the above mentioned that in the same year there were 649 new organic farms registered in organic farming (*Hrabalová et al*., 2012).

***Table 1*: The development in the number of farms and land area in organic faming in the CR.**

Year	Total number of organic farms	Total area of organic land (ha)	Percentage of total area of agriculture land (%)
1991	132	480	-
1997	211	20 239	0.47
2000	563	165 699	3.86
2005	829	254 982	5.98
2010	3 517	448 202	10.55
2012	3 934	488 658	11.46

Source: The Ministry of Agriculture of the CR

The main areas of OF in the CR are less favorable mountain and submountain areas, where about half of these areas are now farmed organically. In terms of land use a dominant position of permanent pastures (PP) is evident (*Table 2*), while its share in recent years amounted about 83% of the total area of organically farmed land in the country. This dominance is, in our opinion, mainly affected by high proportion of land at higher altitudes (about 1/3 of land in the CR is situated at an altitude higher than 500 m above sea level), economic problematicity of cereal production in these areas and also relatively good level of subsidies for PP (71 €/ha). With the dominance of PP is also associated a dominant position of breeding of suckler cows and a relatively strong position of sheep breeding in the Czech organic livestock (*Kuchtík et al*., 1997). As for organic arable land, in 2008 its share for the first time exceeded 10% from the total area of organic land and in the future further gradual increase in its share is expected, primarily due to growth in demand for organic feed and seed respecting the European regulations for OF farming, which supports reduction of the share of permitted conventional feed. Due to the optimal economy of livestock on an organic farm an ideal solution is a mixed farm with its own crop production, permanent pastures and breeding of ruminants, respectively with additional pig or poultry production (*Šarapatka, Urban et al.*, 2005). Relatively good level of subsidy per hectare of arable land (155 €) and growth in consumer demand for organic products manufactured from organic crops grown on arable land are also important prerequisites for the future enlargement of organic arable land in the CR. In recent years, there has been also found out a slight increase of area of permanent cultures (orchards, vineyards and hop fields). However, in the European context, the current proportion of permanent crops in the CR is insignificant, despite the increase in the level of subsidies for these crops to 849 €/ha. As a conclusion to this part it is necessary to add that land use in Czech OF is significantly different from that of the total land use in the CR while in this case about 38% of the total country land area is arable land and the PP represent only about 12% .

***Table 2*: Development of size of organic land since 2001 in the CR.**

Year	Arable land (ha/ %)	Permanent pastures (ha/%)	Permanent cultures (ha/ %)	Other land (ha/ %)
2001	19 164/ 8.8	195 633/ 89.7	963/ 0.5	2 354/ 1.1
2003	19 637/ 8.3	231 683/ 90.9	928/ 0.4	2 747/ 1.1
2005	20 766/ 8.1	209 956/ 82.4	820/ 0.3	23 440/ 9.2
2010	57 937/12.27	369 272/ 82.38	5 939/ 1.33	18 054/ 4.02
2012	58 489/11.96	407 219/ 83.33	7 683/ 1.57	17 371/ 3.63

Source: The Ministry of Agriculture of the CR

In 2001, the average size of Czech organic farm was about 333 ha, but from this year this area has declined steadily, while in 2011 it was approximately 124 ha. However despite this decline, the CR is among the countries where the average size of organic farm is significantly higher than the European average, which is at about 40 ha. In this context, it should be added that for big Czech organic farms are characteristic large areas of PP with a dominant breeding of

suckler cows or sheep, or a combination of both. Neverthelesss, the fact remains, see *Table 3*, that about half of the organic land is farmed only by about 260 organic farms (cooperatives, limited companies etc), while on the other hand about 2 440 organic farms farm on areas to a maximum of 50 ha when these farms are mainly family-type specialized usually in one production (goats, wine production, herbs, etc.)

***Table 3*: Organic farm size in 2011.**

Size (ha)	Organic farms		Acreage	
	Number	%	ha	%
0-10	950	14.3	4 226	0.9
10-50	1 493	38.1	37 810	7.8
50-100	523	13.3	36 993	7.7
100 – 500	688	17.6	153 666	31.8
500 – 1 000	182	4.6	126 554	26.2
1000 - 2000	79	2.0	106 524	22.1
2000 and more	5	0.1	17 211	3.6

Source: MoA (data always as at 31.12. of given year); compiled by IAEI

One of the strong motives of OF is to maintain employment in rural areas, especially in the LFA. It is generally assumed that in the organic farming will work more workers per 100 ha of land than in the case of conventional farming, which is mainly explained by lower labor productivity in organic farms. Nevertheless, in the Czech OF, this assumption is not fulfilled because at OF in 2010 one Annual Work Unit (AWU) farmed on cca 48 ha of land while in agriculture in total it was only 32 ha. Thus, on 100 ha of AL this ratio was 2.08 AWU in OF versus 3.12 AWU in agriculture in total. Within the long-term development is however registered growth of employment in OF when in 2007 per 100 ha there were registered 1.32 AWU while in 2010 it was already 2.08 AWU.

From a comparison of the position of crop and livestock production in the Czech OF the dominance of livestock production significantly results. With the inclusion of all animals raised on Czech organic farms in 2011 there were raised 322 000 pieces of ruminants, which is about 178 000 of livestock units (LU) and livestock load was around 0.45 LU/ha (*Hrabalová et al*., 2012). The most important breeding in Czech OF (*Table 4*), is cattle breeding, namely breeding of suckler cows followed by sheep breeding. Relatively important productions are also goat and horse breeding but pig and poultry organic productions can be considered as minor.

Biofoods and food safety

Organic food is the main product of Czech OF, and these must be produced with materials derived from OF, under the conditions determined by law that meets the specific requirements for quality and safety (eg without the use of artificial fertilizers, GMO etc.) and must be stored and transported separately from other raw materials and food in areas and under conditions that allow their unambiguous identification and preservation of their quality.

***Table 4*: Number of most important farm animals on organic farms in 2011 in the Czech Republic**

Animal category	Number of organics farms	Number of organically reared animals
	2011	2011
Horses	515	4 093
Cattle – all categories	1 378	174 644
Cattle over 2 years	1 347	98 346
Of which: dairy cows	88	5686
Suckler cows	1 271	79 298
Sheep	655	79 657
Goats	221	6 317
Pig	19	1748
Poultry	44	37 348

Source: IAEI Statistical survey 2010 and 2011

Act No. 344/2011 came into force in the CR on 1. 1. 2012, amending the existing Act No. 242/2000 Coll. on OF which defined OF and to set criteria for labeling products as "organic farming product". The amendment was approved mainly on the basis of new EU legislation on OF, namely Council Regulation (EC) No. 834/2007 and Commission Regulation (EC) No. 889/2008.

From most of studies dealing with why generally customers buy organic food results that they are bought because they are, compared to products from conventional agriculture, free of chemical additives, better and more environmentally friendly and above all healthy or healthy safe (*Kubáňová*, 2007). Respecting abovementioned it can be stated that generally the issue of health food safety is becoming a one of the priorities of the consumer, while food safety includes hygiene of food production, control mechanisms, monitoring of food chains and feed safety. In general it can be stated that to ensure food safety contributes government organizations and institutions financed by the state, particularly by the creation of legislation, continuous and consistent monitoring of health safety and quality, long-term monitoring of contaminants, application of scientific knowledge into practice, and by informing and educating consumers. Health Food Safety is also a fundamental principle of European food policy, which guarantees the protection of consumer health. As for CR, the foundation of the food safety system were laid there in 2001 (Resolution of the Government of the CR No 1320), however, in January 2010, the the Czech government drawn conclusions on the new "Food Safety and Nutrition Strategy for 2010-2013" when the food safety has for a long time ranked among the priorities of the CZ. In a long-term perspective the „Food Safety and Nutrition Strategy 2010-2013.“ seeks to strengthen the protection and promotion of health as well as the legitimate consumers' interests. In connection with that it aims to increase the public confidence in the system ensuring safe food, in its quality and nutritional values which is logical due to increasing number of different safety scandals concerning foods that have been registered in recent years in the CR. By the way the most famous scandals of recent years which concerned the CR were so-called methanol affair or salt affair.

In the CZ the food safety system is coordinated by the Ministry of Agriculture (MoA) and the Ministry of Health, in cooperation with other ministries and other state administration institutions. The risk assessment is conducted by independent state as well as non-governmental research institutes together with colleges and universities. An important role in the process of risk communication is played by non-governmental organisations, professional and consumer associations. To communicate with consumers since 2002 there has been established a Food Safety Information Centre operated by the Food Authority of MoA.

When finding food of animal origin, which represents a risk to human health, is operated Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), which ensures rapid transfer and exchange of information between the CR and the EU and also among individual members in the CR. Therefor, through the RASFF are transmit information, whose purpose is to prevent the introduction into circulation or withdraw from circulation the foods or the feeds which present a risk to human health and also have been exported outside the territory of the individual state.

In the CR organic farmers and organic food producers must be registered by the MoA. Inspection of businesses involved in OF is carried out by 3 control bodies (KEZ, o. p. s., ABCERT AG and Biokont CZ, s. r. o.) authorized for this activity by the MoA. These control bodies also issue certificates which confirm the origin of products and carried out checks of producers, processors and wholesalers of organic food. The inspectors of monitoring organizations excercise regular and random controls on organic farms and at processors and wholesalers, while at least once a year the whole chain of production, processing and distribution undergo by complete control. In 2011 approximately 5 000 inspections were carried out in all organic farms of which 76 inspections were unannounced. The most significant shortcomings identified during controls were incomplete accounts, using of conventional seed without a valid exception, interventions carried out on animals without a valid exception or the use of substances unapproved for OF (*Hrabalová et al*., 2012). Finally, it should be added that in 2001 the Czech Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture (ÚKZÚZ) also carried out inspections, in the form of official controls according to Regulation (EC) 882/2004 on official food and feed controls.

The quality of organic foods is the result of the quality of agricultural and food systems, including controls of their health safety. As a result of ongoing affairs with food quality in the domestic market the State Veterinary Administration run this year a Food Safety Information Center Web site, which informs consumers about the results of current inspections. The vast majority of identified inconvenient foodstuff on the Czech market relates to conventional production while the defective organic foodstuff were found out only sporadically, which is a good sign. However, on the other hand it should be noted that the share of organic food in total food and drink consumption is in the CZ long term under 1 %.

Conclusion

As for the development of organic farming in this case can be stated that in the CR was registered in recent years relatively radical development of this way of farming while the main is livestock production. As for the food safety, its issue is a priority Czech government, and to solve this issue was created "Food Safety and Nutrition Strategy for 2010-2013". In general it can be stated that the situation in the CR regarding food safety is relatively good, but in the last period has been registered the growth of various affairs relating to above all food safety of conventional origin. On the other hand the food safety of Czech organic products is relatively high

nevertheless their production is relatively low. Finally, respecting above mentioned, it is possible to state that the basic problem of food safety on the Czech market is not insufficient legislation or lack of controls, but, even though sporadically, the lack of responsibility of some degrees (producer, importer, processor or retailer) for food safety.

Acknowledgements
This study was supported by NAZV KUS QJ1210302.

References

Food Safety and Nutrition Strategy for 2010-2013. [online]. [cit. 2013-10-01]. Available from: http://eagri.cz/public/web/file/44930/Strategie_BP_EN.pdf

Hrabalová, A., Valeška, J., Vejvodová, A., Leibl, M., Hlava, J., Kettnerová, M. 2012. Yearbook 2011 - Organic agriculture in the Czech Republic. Ministry of Agriculture of Czech Republic, Praha: 92 p.

Kubáňová, J. 2007. Biopotraviny v kontextu ideologie zdraví. Thesis, Masaryk University in Brno, Faculty of Social Studies: 7-8.

Kuchtík, J., Žižlavská, S., Horák, F., Kučera, J., 1997: Growth ability and carcass value of lambs reared on common grazing of cattle and sheep. Czech Journal of Animal Science, 42, 7: 293-298.

Šarapatka, B., Urban, J. et al., 2005. Ekologické zemědělství II. Díl – in Czech., PRO-BIO Šumperk 2005: 27-28.

Act No. 344/2011. [online]. [cit. 2013-10-01]. Available from in Czech: http://www.apic.cz/5364-novela-zakona-o-ekologickem-zemedelstvi.html

HEAVY METALS – ACCUMULATION AND REPRODUCTIVE TOXICITY

Peter Massányi, László Bárdos, Norbert Lukáč, Robert Stawarz, Grzegorz Formicki, Robert Toman, Zsolt Forgács, Marcela Capcarová, Adriana Kolesárová, Jiřina Kročková, Anna Kalafová, Jaroslav Kováčik

Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic
Szent István University, Gödöllő, Hungary
Pedagogical University, Kraków, Poland
National Institute of Chemical Safety, Budapest, Hungary

Abstract

Pollution of the environment and contamination of animals including game with cadmium is serious problem in most countries. Increasing concern about environmental pollution calls for advanced and rapid methods to estimate ecological toxicity. Xenobiotics, including heavy metals, exist in nature as complex mixtures of compounds with possible interactions. Animal studies on the toxicity of heavy metals have been widely used as model to simulate the impacts of environmental pollution on the human health. It has been reported that many metals have negative effects on the reproduction in animals.

Accumulation of heavy metal

Concentration of lead, cadmium and mercury was evaluated in liver and kidney of brown hare in relation to season, age and sex. During a year, an average lead, cadmium and mercury concentrations in studied organs were the highest in winter period. Significantly higher cadmium concentrations in liver and kidney of adult brown hares were detected in comparison with juvenile individuals. In comparison of cadmium concentrations in various animal species, generally higher concentration in kidneys was found. The highest concentration was detected in brown hare kidney and the lowest in reproductive organs and muscular tissue. Comparison of wild and farm animals shows higher cadmium concentrations in wild animals.

Reproductive toxicity of heavy metals

In this study histological alteration of rabbit female reproductive organs after an experimental cadmium administration were analyzed. After a cadmium administration changes in the number of follicles with less than 2 layers as well as more than 2 layers of follicular (granulosa) cells and antral follicles were detected. The number of atretic follicles was significantly higher in all experimental groups with cadmium administration. The relative volume of growing follicles was significantly decreased and that of stroma significantly increased in experimental groups compared to control, directly suggesting the effect of cadmium on folliculogenesis. In comparison with ovaries, alterations detected in oviduct and uterus was weaker. Obtained data of in vitro experiments were confirmed also in in vitro conditions. The results of these studies proved negative effect of cadmium on the ovarian structure on the level of light as well as electron microscopy.

After experimental cadmium administration to mice dose dependent accumulation of cadmium in testes was found. Morphometric analysis detected weak decrease of germinal epithelium and increased relative volume of interstitum. After a lead and mercury administration to rats, dilatation of blood capillaries in interstitium, undulation of basal membrane and occurrence of empty spaces in seminiferous (germinal) epithelium of testis was observed. Similar alterations cause also the cobalt and nickel administration.

VARIANCES OF DIRECT AND MATERNAL GENETIC EFFECTS FOR MILK YIELD AND IT COMPOSITION IN A HERD OF FRIESIAN COWS IN EGYPT

Mostafa[1], *M.A.*, *Beder*[2], *E.A.*, *Khattab*[3] , *A.S.*, *Tőzser* [4], *J*

[1]Animal production Department, Faculty of Agriculture, Mansour University,
[2]Animal Production Research Institute, Ministry of Agriculture, Dokk, Cairo, Egypt,
[3]Animal production Department, Faculty of Agriculture, Tanta Univ., Egypt,
[4]Institute of Animal Husbandry, Szent Istvan University, H- 2013 Gödöllő Páter K. u. 1., Hungry
Adelkhattab@yahoo.com

Abstract

A total of 3748 normal lactation records of Friesian cows kept at Sakha farm, belonging to Animal production Research Institute, Ministry of Agriculture, Dokki, Cairo, Egypt during the period from 2000 to 2006 were used in the present study. Data was analyzed by using Multiple Traits Derivative Free Restricted Maximum Likelihood (MTDFREML) according to Boldman et al. (1995) using repeatability animal model. Two models were used. Model 1 includes month and year of calving and parity as fixed effects and direct genetic, maternal genetic, covariance between direct and maternal genetic and residual as random effects. Model 2 is similar to Model1, while additive maternal and covariance between direct and maternal effects were omitted from the model.

Estimates of heritability for 305 day milk yield, lactation period, fat % and protein % were 0.33, 0.02, 0.16 and 0.64, respectively for model 1, while the values were 0.34, 0.03, 0.17 and 0.65, respectively as estimated from model 2. The removal of additive maternal genetic effects and covariance between direct and maternal genetic effects from the model increased estimates for heritability of additive genetic effects by 0.01, for the four traits. Therefore, the additive maternal genetic effect and covariance between direct and maternal genetic effects do not seem to make important contributions to the phenotypic variance for milk yield and it is composition.

Introduction

Maternal effects have been defined as any influence from a dam on it is offspring, excluding the effects of directly transmitted genes that affect performance of the offspring (*Legates*, 1972). In mammals, environmental variation in the offspring is partially due to genetic variation of some other traits from the dams, such that quantitative traits can be influenced by two genetic components, animal genotype (direct genetic effect) and dam genotype (maternal genetic effects). The maternal genetic effects are not important for yield traits of dairy cattle (*Schutz* et al., 1992 ; *Albuquerque* et al., 1998 and *Khattab* et al., 2005). *Khattab* et al. (2005) with 2095 lactation records of Friesian cows in Egypt, found that means estimates of the effects of maternal genetic variances and direct maternal covariances as a fractions of phenotypic variances for 305 d MY were 0.01 and 0.02, respectively. The objectives of the present study were to quantify the contribution of additive direct and maternal genetic effects to phenotypic variance of milk yield and milk composition in a herd of Friesian cows in Egypt.

Material and methods

Source of data

Data used in the present study were collected from the history sheets of Friesian cows maintained at Sakha Farm, belonging to Animal production research Institute, Ministry of Agriculture, Dokki, Cairo, Egypt. The data comprised 3748 normal lactation records spread over the period from 2000 to 2006, representing in parities from 1 to 6. Abnormal records of cows affected by diseases such as mastitis and udder troubles or reproductive disorders were excluded. Animals were grazed on Egyptian clover (*Trifolium alexandrinam*), berseem, during December to May. They were fed concentrate mixture along with wheat or rice straw and limited amount of clover hay when available during the rest of the year. Cows producing more than 10 kg a day and cow a pregnant in the last two months were supplemented with extra concentrate. Heifers were first inseminated at 18 months of age. In subsequent lactations, cows were initially inseminated 60- 70 days postpartum. Cows were machined twice a day. Sires which had 5 daughters or more were included in the genetic analysis. Cows were artificially inseminated randomly to ensure that no specific sires were bred to certain good or poor dams. Traits studied are 305 day milk yield, lactation period, fat % and protein %.Fat and protein percentages estimated using system of Milko – Scan 130 series. Type 10900.

Analysis

The records were analyzed by Multiple Trait Derivative Free Restricted Maximum Likelihood **(MTDFREML**) according to *Boldman et al* (1995), using repeatability animal model. Two models were used, *Model 1*, includes month of calving, year of calving and parity as fixed effects and direct genetic, maternal genetic, covariance between direct and maternal genetic, permanent environmental and residual as random effects. Model 2 is similar to Model 1, but excluding additive maternal and covariance between additive direct and maternal effects. *Table 1* shows the data structure considered in the analysis.

***Table 1*: Structure of data used in analysis, means, standard deviation (SD) and coefficient of variability (CV %) for 305 day milk yield (305 d MY), lactation period (LP), fat % (F %) and protein % (P %)**

Traits	Mean	SD	CV %
305 d MY, kg	3558	119	40
LP, d	301	172	48
F %	3,7	0,82	22
P %	2,60	0,51	20

Observations

No. of records	3748
No. of sires	50
No. of cows	428
No. of dams	191
Animals in relationship matrix (A^{-1})	669
Mixed Model Equations (MME)	5460
No. of iterations	11789

Results and discussions

Means of 305 d MY, LP, F % and P % , standard deviations (SD) and coefficients of variability (CV %) are presented in table 1. Means of 305 d MY, LP, F % and P % were 3558 kg, 301 d, 3.7 % and 2.60 % (Table 1). The present means of 305 d MY and LP were higher than those found by *Yener* et al. (2006) working on another set of Friesian cows in Egypt, reported that means of 305 d MY and LP were 2806 kg and 293 d, respectively. While the present means were lower than those reported by *Khattab* and *Atil* (1999) working on another set of Friesian cows in Egypt, found that means of 305 d MY and LP were 3709 kg and 367 d, respectively. Overall mean of F % was similar to that reported by *Albuquerque* et al**.** (1998) (3.7) working on Holstein Friesian. While The present mean of F % was lower than those found by Islam et al.(2008) (4.28%). The overall mean of P % was lower than those reported by *Jairath* et al. (1995) (3.15) on Canadian Holstein and *Islam* et al. (2008) (3.11) on Holstein Friesian. The difference between the present estimates and those reported by other studied could be due to differences in climatic and management. Herds could be possibly the genetically different or be caused by different models used.

The large CV % value for 305 d MY (40 %) reflects a great variation between individuals in such an important productive trait.

Variance components and means for variance and covariance components as ratio of phenotypic variances from model 1 and 2 are in *Table 2*. The variance for additive maternal genetic effects were 4, 2,5 and 7 % of phenotypic variance for 305 d MY, LP, F % and p %, respectively and the covariance between maternal and direct genetic effects were 0.07, 0.01, 1 and 2 % for the same traits respectively. Thus, these effects did not contribute importantly to phenotypic variance. Similar results were obtained by *Albuquerque et al*, (1998) analysis milk traits (milk, fat yield and fat %) reported that the variance of additive maternal genetic effects varied from 0.8% to 1.0 % of phenotypic variance and the covariance between maternal and direct genetic effects varied from 0.7 % to 2.5 %. Also, *Schutz et al***,** (1992) using an animal model estimated small values for ratios of variance for maternal genetic effects to phenotypic variance for milk yield (2.58 %) and fat % (6.5 %0 and for covariance between maternal and direct effects for milk yield (5.99 %). In addition, *Khattab et al*, (2005) with another set of Friesian cows in Egypt, found that the variance for additive maternal genetic effect and covariance between maternal and direct genetic effects for 305 d MY are 1 % and 2 %, respectively.

Maternal genetic effects have been described in domestic mammals such as swine *Southwood and Kennedy*, 1990) and beef cattle (*Dodenhoff et al*, 1990**)** and represent an environmental effect on the growth of offspring from birth to weaning. However, dairy calves are separated from their dams at birth so that the influence of the dam would be only through intrauterine environmental (Albuquerque et al., 1998). In addition, uterine environmental and the maternal colostrums may also contribute to the maternal genetic effects **(***Khattab et al*, 2005).

***Table 2*: Phenotypic and genetic variance and covariance for 305 day milk yield 9305 d MY), lactation period (LP), fat percent (F %) and protein percent (P %) using two models**

Model	**g^2**	**m^2**	**gm**	**e^2**	**Total**
Model 1					
305 d MY	25.52 (0.33	2.91 (0.04)	-0.58 (0.007)	49.82 (0.64)	77.67
LP	2.58 (0.02)	1.80 (0.02)	-0.02 (0.001)	113.47 (0.96)	117.83
F%	4.71 (0.16)	1.41 (0.05)	-0.36 (0.01)	24.14 (0.81)	29.90
P%	9.40 (0.64)	0.98(0.07)	-0.26 (0.02)	4.47 (0.31)	14.59
Model 2					
305 d MY	26.40 (0.34)			50.20 (0.66)	76.60
LP	3.10 (0.03)			114.47(0.97)	117.57
F%	5.10 (0.17)			25.10 (0.83)	30.20
P%	11.20 (0.65)			5.90 (0.35)	17.10

G^2= additive genetic effect, m^2= additive maternal genetic effect, gm= covariance between direct and maternal.

Heritability estimates for 305 d MY, LP, F % and P % as estimated from model 1 (Full model) are 0.33±0.02, 0.02 ±0.01, 0.16±0.04 and 0.64±0.13, respectively (*Table 3*), while the corresponding values as estimated from model 2 are 0.34, 0.03, 0.17 and 0. 65, respectively (*Table 2*). The removal of additive genetic maternal effects and covariance between direct and maternal effects from the model (*Model 2*) increased estimates of heritability of direct genetic effects by 0.01 for all traits studied (*Table 2*). Similar results are reported by *Albuquerque et al*, (1998) found that heritability estimates of direct genetic effects increased by 0.014, 0.021 and 0.046 for milk yield, fat yield and fat %, respectively, when additive genetic maternal effects and covariance between direct and maternal genetic effects are removed from the analysis. The same authors also concluded that, some confounding between direct and maternal genetic effects should be expected because the dam that contributes the maternal genetic effect also transmits half of her genetic value for direct effects in her daughter. Some cows do not have lactating daughters, and many sires do not have any lactating granddaughters. Also, *Schutz et al*, (1992) and *Khattab et al*, (2005) arrived at the same conclusion, reported that maternal genetic effects are not important for yield traits of dairy cattle.

***Table 3*: Estimates of heritability (direct and maternal) and genetic correlation among 305 d MY, LP, F % and P % as estimated from model 1*.**

	g^1	g^2	g^3	g^4	m^1	m^2	m^3	m^4
g^1	**0.33±0.02**							
g^2	0.16±0.01	**0.02±0.01**						
g^3	-0.10±0.01	-0.12±0.02	**0.16±0.04**					
g^4	-0.13 ±0.01	-0.18±0.02	0.45±0.14	**0.64±0.13**				
m^1	-0.07±0.02	-0.13±0.03	0.15±0.10	-0.52±0.18	**0.04±0.01**			
m^2	0.06±0.02	C	-0.19±0.18	-0.11±0.07	0.06±0.00	**0.01±0.00**		
m^3	-0.07 ±0.01	-0.09±0.02	-0.14±0.07	-0.16±0.04	-0.17±0.01	-0.24±0.01	**0.05±01**	
m^4	-0.18±0.02	-0.08±0.02	0.09±0.01	-0.07±0.03	0.37±0.01	0.42±0.01	-0.30±010	**0.06±0.01**

*

305 d MY, LP, F %, P%, g1, g2,g3,g4, m1,m2,m3 and m3 are 305 day milk yield, lactation period, fat %, protein %, direct heritability for 305 d MY, direct heritability for LP, direct heritability for F %, direct heritability for P %, maternal heritability for 305 d MY, maternal heritability for LP, maternal heritability for F % and maternal heritability for p %, respectively.

Direct heritability estimates for 305 d MY, LP, F % and P % as estimated from model 1 (full model) are 0.33, 0.02, 0.16 and 0.64, respectively (Table 3). The present estimates are within the range of recorded value with an animal model (i.e., *Albuquerque* et al., 1998; *El- Arian* et al., 2003 ; *Yener* et al., 2006 and *Usman* et al., 2012) and ranged from 0.07 to 0.0.33. The moderate estimates of heritability for 305 d MY and F % and high estimate of heritability for P %, suggests that more efforts could be made to bring about improvement milk yield and it is composition through individual selection as well as better managerial practices. Low heritability estimates for LP indicate that this trait is affected mainly by environmental factors.

The results in table 3 show that the genetic correlation between 305 d MY and LP was positive and being 0.16+0.01 and in the desirable direction indicating that high yielding cows are also have the longer LP. Whereas the genetic correlation between 305 d MY and each of F % and P% were negative and being -0.10 ± 0.01 and - 0.13 ±0.01, respectively. Also, the genetic correlation between LP and each of F and P % were negative and being – 0.12 ±0.02 and – 0.18 ±0.02, respectively (Table 3). The present results indicated that selection for milk yield and lactation period would lead to slight decrease fat and protein percent. While, genetic correlation between F and P % was positive (0.45±0.14). Similar results are reported by *El- Arian* et al. (2002), *Yener* et al. (2006) and *Usman* et al. (2012). Also, maternal genetic correlation among milk traits studied are in most cases negative and small.

According to small amount of additive maternal genetic effects for 305 d MY, LP, F % and P %(Table 2), it could be concluded that the additive maternal genetic effects and the covariance between additive maternal and direct genetic effects do not seem to make important contributions to the phenotypic variance of milk traits, probably because the important environmental influence of the dams on their calves is from conception to birth.

References

Albuquerque, L. D.;Keown, J.F.;Van Vleck, L.D (1998) Variances of direct genetic effects, maternal genetic effects and cytoplasm inheritance effects for milk yield, fat yield and Fat percentage. J. Dairy Sci., Vol 81: 544- 549.

Boldman, K,G.; Kriese, L. A.; Van Vleck, L.D.; Kachman, S. D.(1995) A manual for use of MTDFREML , Department of Agriculture/ Agricultural Research Service, Lincoln, 120 pp.

Dodenhoff, J.; Van Vleck, L.D.; Gregory, K.E. (1999) Estimation of direct, maternal and maternal genetic effects for weaning weight in several breeds of beef cattle. J. Anim.

El- Arian, M.N.; El- Awady, H.M.; Khattab, A.S. (2003) Genetic parameters and breeding values of milk production traits by using animal model in a herd of Holstein Friesian Cows in Egypt. 53rd Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Cairo, Egypt, 1-4 September, 2003.

Islam, M.R.; Hassan, M.N.; Siddiki, M.S.R.; Khan, M.A.S.; Islam, M.A. (2008) Determination of quality of milk from different genotype of dairy cows. Bangladesh. J. Anim. Sci., 37:53.

Jairath, L.K.; Hayes, J.F.; Cue, R.I.(1995) Correlations between first lactation and lifetime performance traits of Canadian Holsteins. J. Dairy Sci., 78:438.

Khattab, A.S.; Atil, H.(1999) Genetic study of fertility traits and productive in a local Friesian cattle in Egypt. Pakistan J. of Biol. 2:1178.

Khattab, A.S.; Atil, H.; Badawy L. (2005) Variances of direct and maternal genetic effects for milk yield and age at first calving in a herd of Friesian cattle in Egypt. Arch. Tierz. Dummerstorf. 48:24-31.

Legates, J.E. (1972) The role of maternal effects in animal breeding. IV. Maternal effects in laboratory species. J. Anim. Sci., 35: 1294-1302.

Schutz, M. M.; Freeman, A.E.; Beitz, D.C.; Mayfield , J.E. (1992) The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. J. Dairy Sci., 75:1331-1341.

Southwood, O. I.; Kennedy, B.W. (1999) Estimation of direct and maternal genetic variance for litter size in Canadian Yorkshire and Landrace Swine using an animal model. J. Anim. Sci., 68:1841-1847.

Usman, T.; Guo, G.; Suhail, S.M.; Wang, Y. (2012) Performance traits study of Holstein Friesian cattle under subtropical conditions. J. of Animal and Plant Sci., 22:92.

Yener, S.M.; Akman, N.; Khattab, A.S.; Hussein, A. (2006) Genetic aspects for productive reproductive traits for Friesian cows in Egypt. 57th Annual meeting of the European Association for Animal Production, Antalya, Turkey.

THE EFFECT OF THE AGE, BODY WEIGHT AND LABOUR UTILIZATION OF DOGS TO THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PARAMETERS OF THEIR EJACULATE

Paldusová, M., Hošek, M., Filipčík, R., Máchal, L.

Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy,
Department of Animal Breeding
613 00 Brno (CZ), Zemedelska 1
paldusovamisa@gmail.com

Abstract

In this study the quality of ejaculate from 20 male dogs of 8 different breeds was evaluated. The dogs were divided into groups according to the age, body weight and labour utilization. We focused on these parameters: volume of ejaculate, sperm activity, concentration of sperm, morphologically normal sperm, total number of sperm with changes on the head and changes on the flagellum. Based on the results can be stated that, in case of the quantitative and qualitative parameters of dog ejaculate, the age and body weight had the greatest influence. In case of the age, as well as body weight, was found statistically highly significant difference ($P \leq 0.01$) in these follows evaluated parameters: morphologically normal sperm and total number of sperm with changes on the head. Another, significant difference ($P \leq 0.05$) was proved in volume of ejaculate and concentration of sperm. Between sperm activity as well as total number of sperm with changes on the flagellum was not found statistically significant differences ($P \geq 0.05$) with measured parameters. Effect of labour utilization is shown by worst results of police dogs in all evaluated parameters.
Key words: dog ejaculate, volume, sperm activity, concentration of sperm, age, body weight

Acknowledgement
The research was supported by IGA TP 2/2013

Introduction

In the Czech Republic, there are approximately 3 million dogs of different breeds bred. The most important assumption for successful breeding work becomes as quality control of their reproduction. Thanks to reproduction, insemination and cryopreservation, it is possible to preserve file of required properties to the coming years. Be it in the form of progeny, overflowing with these properties from some individuals, or in the form of preserved genetic materials. Thanks to modern methods used in the evaluation of ejaculate, we can determine semen quality, and thus, to some extent affect the chance of successful fertilization. Special attention should be given to the total number of sperm in the ejaculate, their activity and concentration. This examination should precede the stud and it would be advisable to perform it after long pause in reproduction, before re-inclusion of the dog in reproduction. The results of these tests should primarily serve breeders as feedback for their objective assessment of availability of dog breeding.

Material and methods

We evaluated the 117 samples of ejaculate from 20 male dogs of 8 different breeds (Australian Shepherd, Belgian Shepherd Groenendael, Belgian Shepherd Malinois, Belgian Shepherd Tervueren, Border Collie, Irish Setter, German Shepherd, Spitz) and 2 representatives of crossbreeds. The dogs were divided into groups according to the age (A: < 2 years; B: 2 - 6 years; C: > 6 years), body weight (A: < 10 kg; B: 11 - 25 kg; C: > 25 kg) and labour utilization (A: family dogs; B: sports-used dogs; C: police forces). Ejaculate were collected by manual manipulation in plastic tubes. Immediately after collection macroscopic examination was made for all samples, which included to find out volume of ejaculate, sperm activity and concentration of sperm. Volume of ejaculate was measured using the calibration cup and sperm activity then by subjective method according to the percentage of motile sperm in the native ejaculate. We evaluated the percentage of sperm with a progressive direct movement after the head. Concentration of sperm was evaluated by the haematocytometry method using Bürker chamber. Next, we evaluated the total number of morphologically normal sperm and the total number of pathology sperm, which were characterised in greater detail by changes on the head and changes on the flagellum. Monitored characteristics were expressed in weighted average and standard deviation.

Results and discussion

Table 1 shows the evaluation of the effect of the age, body weight and labour utilization of the individual on semen quality. More precisely to its macroscopic parameters, which are: volume of ejaculate, sperm activity and concentration of sperm.

Table 1: **The effect of the age, body weight and labour utilization of dogs to the volume of ejaculate, sperm activity and concentration of sperm in their ejaculate.**

MONITORING FACTOR			n	Volume of ejaculate *(ml)*		Sperm activity *(%)*		Concentration of sperm *(10^3. mm^{-3})*	
				$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x
TOTAL AVERAGE			117	9.16	6.93	74.18	11.68	141.72	98.33
Age	*A*	*< 2 years*	17	11.35^{b}	5.49	68.23	9.51	88.24^{b}	20.30
	B	*2 - 6 years*	77	8.22^{a}	6.75	75.71	12.71	152.19^{a}	107.57
	C	*> 6 years*	23	10.67	8.04	73.47	7.75	146.19	89.94
Weight	*A*	*< 10 kg*	18	5.83^{C}	1.51	80.00	5.15	100.00^{c}	52.13
	B	*10 - 25 kg*	57	8.76^{c}	7.96	73.07	13.18	138.54	72.79
	C	*> 25 kg*	42	11.12^{Ab}	6.26	73.21	10.97	163.93^{a}	133.07
Utilization	*A*	*Family*	44	8.90	6.24	73.63	8.72	100.79^{BC}	54.06
	B	*Sport*	52	10.17^{c}	8.17	76.05	13.69	152.53^{A}	77.44
	C	*Police*	21	7.16^{b}	4.15	70.71	11.32	200.71^{A}	163.89

A, B, C – between values with different letters in a column in each section were proved statistical highly significant differences ($P \leq 0.01$)
a, b, c – – between values with different letters in a column in each section were proved statistical evidential differences ($P \leq 0.05$)

The volume of the ejaculate is not itself an indicator of sperm quality of males. However, its measuring is an essential part of the evaluation of the quality of dog ejaculate (*Root Kustritz*, 2007). *Kvapil and Kvapilova* (2007) report that physiological amounts of dogs ejaculate range from 1 to 40 ml, and the average value is about 7 ml. *Dolezel et al.* (2001) is in his publication something specific. They argue that the average volume of ejaculate from them examined dogs ranged from 4.5 to 8.5 ml. Our measured values mostly exceed this range, because the volume of ejaculate moved in variation range from 5.83 ± 1.51 ml to 11.35 ± 5.49 ml. Between a group of dogs from 10 to 25 kg and group of dogs over 25 kg was found a statistically evidential difference ($P \leq 0.05$). This difference, however, was not as significant as difference found between the groups of dogs less than 10 kg and dogs over 25 kg. Here the statistical difference was highly significant ($P \leq 0.01$).

Progressive moving forward to the head is one of the most important indicators of fertilization ability and is a functional indicator of biological full value of the sperm (*Louda et al*, 2001). *Root Kustritz* (2007) states that, the normal percentage of motile sperm in the ejaculate of normal dog should be 70.00 % or more. This condition was fulfilled by most of our collected individuals, the activity of their sperm was moving in variation ranging from 70.71 ± 11.32 % to 80.00 ± 5.15 %. The only exception was group of dogs under two years old, who achieved only 68.23 ± 9.51 %. This fact was most likely caused by the stress from the first collection in life, or other disturbing influences from the surroundings. The highest activity of sperm (80.00 ± 5.15 %) we registered in the group of dogs weighing less than 10 kg. These dogs also produced the smallest average amount of ejaculate from all evaluated groups (5.83 ± 1.51 ml). The second lowest activity was found in a group of dogs from 10 to 25 kg (73.07 ± 13.18%). This phenomenon was probably due to the fact that to this group were included most of service dogs, their results belonged generally to the worst. Statistically highly significant difference ($P \leq 0.01$) of this factor in their work demonstrated *Vagenknechtova et al.* (2011), when they examinated service dogs achieved activities only 49.4 %. We, however, this difference failed to substantiate statistically.

Dolezel et al. (2001) reported that the concentration of sperm in a healthy dog should be 300. 10^3. mm^{-3} to 800. 10^3. mm^{-3}, while the total ejaculate should contain 300. 10^6 to 32 000. 10^6 sperm (*Kvapil and Kvapilova*, 2007). The most important factors affecting the value considered: herd affiliation, age and sexual activity of dog. The list of these factors is further supplemented *Peña Martínez* (2004) with his arguing that the total number of sperm in the ejaculate can also be negatively affected by a lack of sexual stimulation in the absence of female dog, stress or pain due to sampling. *Root Kustritz* (2007) stated that rather than belonging to a breed, the sperm production, volume and total number mainly related with the size of the testes of the individual. As the total number of sperm in the ejaculate, is directly proportional to the size of tested tissue. So, in general, breeds of large dogs have a total number of sperm in the ejaculate bigger than small breeds (*Kvapil and Kvapilova*, 2007). This fact was also proved in our study, that between the group of dogs to 10 kg and a group of dogs over 25 kg is a statistically significant difference ($P \leq 0.05$). The average concentration of sperm of examined individuals proportionally increased with increasing of ejaculate quantity and body weight of individuals (100.00. 10^3. mm^{-3} < 138.54. 10^3. mm^{-3} < 163.93. 10^3. mm^{-3}). Lowest values again reached the group of dogs under two years old (88.24. 10^3. mm^{-3}) and the best results the dogs in reproductive peak, i.e. group of dogs from two to six years old (152.19. 10^3. mm^{-3}). Even among these two groups was found significant difference ($P \leq 0.05$). *Root Kustritz* (2007) reported the age of six years as the maximum limit of high reproduction ability, because already in advanced age the sperm production is decreasing and the percentage of moving sperm miss reducing. In our experiment,

this tendency, although slightly, managed to record. On the other hand, even in a group of dogs older than six years, then individuals over the reproductive peak, we have measured the concentration of sperm over the overall average (146.19. 10^3. mm^{-3}) and sperm activity values above the minimum required (73.47 ±7.75 %), which is certainly pleasing result for their owner. Eventually, highly statistically significant difference ($P \leq 0.01$) was found in the factor of labour utilization, where family dogs reached values of 100.79. 10^3. mm^{-3}, sports-used dogs 152.53. 10^3. mm^{-3} and dogs from group of police forces 200.71. 10^3. mm^{-3}.

Table 2 shows the evaluation of the effect of the age, body weight and labour utilization of the individual on the morphological status of dog sperm.

Table 2: **The effect of the age, body weight and labour utilization to the morphological status of dog sperm**

MONITORING FACTOR			n	Normal sperm (%)		Changes on the head (%)		Changes on the flagellum (%)	
				$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x
TOTAL AVERAGE			117	76.44	12.18	4.64	3.45	10.87	7.30
Age	*A*	*< 2 years*	17	76.29^{C}	19.22	8.58^{C}	4.06	8.64	3.93
	B	*2 – 6 years*	77	73.74^{C}	10.31	4.88	2.90	12.01	8.06
	C	*> 6 years*	23	85.60^{AB}	5.77	0.91^{A}	0.54	8.69	5.70
Weight	*A*	*< 10 kg*	18	71.16^{B}	8.86	6.50	3.91	12.55	7.41
	B	*10 – 25 kg*	57	80.93^{AC}	9.54	2.14^{C}	1.80	10.12	7.26
	C	*> 25 kg*	42	72.62^{B}	14.42	7.29^{B}	5.90	10.90	7.35
Utilization	*A*	*Family*	44	80.50^{BC}	10.32	3.32	1.19	9.84^{c}	6.19
	B	*Sport*	52	75.03^{A}	13.17	5.78	1.09	10.33	6.61
	C	*Police*	21	71.42^{A}	11.03	4.57	2.08	14.38^{a}	9.99

A, B, C – between values with different letters in a column in each section were proved statistical highly significant differences (P≤ 0.01)
a, b, c – between values with different letters in a column in each section were proved statistical evidential differences (P≤ 0.05)

Johnston et al. (2001) reported that dogs ejaculate should have a minimally 80.00 % of morphologically normal sperm. The effect of the age has been shown by highly statistically significant difference ($P \leq 0.01$) between the results of the groups of dogs older than six years (85.60 ± 5.77 %), group of dogs from two to six years of age (73.74 ± 10.31 %) and group of dogs younger than two years (76.29 ± 19.22 %). Also, in assessing the impact of body weight on the percentage number of morphologically normal sperm, was found highly statistically significant difference ($P \leq 0.01$), and that between group of dogs from 10 to 25 kg against to the two remaining groups. Finally, we should mention even the effect labour utilization, which was demonstrated by highly statistically significant difference ($P \leq 0.01$), between family dogs and dogs from group of police forces in this case.

Pathological changes in the shape of sperm heads are the most common abnormalities in disorders of spermatogenesis. In most cases, accompanying the emergence of degenerative and inflammatory processes in the testes. By a healthy individual, quantum of these anomalies can´t

be a bigger than 5.00 % *(Louda et al,* 2001*)*. Best result was found in the group of dogs over six years of age (0.91 ± 1.04 %). This value showed a highly significant difference ($P \leq 0.01$) with results of dogs from the group of dogs to two years of age. In fact, results these dogs (8.58 ± 17. 06 %) were the worst of all evaluated groups.

The largest number of defects in the formation of sperm cells was demonstrated in the construction of flagellum. The proportion of these changes were moving in a variation range from 8.64 ± 3.93 % to 14.38 ± 9.99 %, with an overall average of around 10.87 ± 7.30 %. Significant difference ($P \leq 0.05$), was detected only in effect of labour utilization, and that between the family dogs (9.84 ± 6.19 %) and a group of police dogs (14.38 ± 9.99 %).

Conclusion

Our results show that, in case of the quantitative and qualitative parameters, the age and body weight had the greatest influence. Volume of ejaculate increased with increasing body weight observed dogs. A similar tendency we have registered even at average concentration of sperm, when the concentration was well balanced, with the exception of the youngest dogs and dogs weighing less than 10 kilograms body weight. The low quality of ejaculate was proved in a group of dogs from the youngest age, their results most likely reflected the stress of the first sample in life. Effect of the labour utilization is shown by worst results of police dogs in all evaluated parameters.

References

Doležel, R., Vitásek, R., Senior, D. F. (2001): Poruchy reprodukčního systému. In: Svoboda, M., Senior, F. D., Doubek, J., Klimeš, J. et al.: *Nemoci psa a kočky: 2. díl*. Brno: Noviko, a.s. 1253–1358 s. ISBN 80-902595-3-7.

Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. N. S. (2001): Canine and Feline Theriogenology. In: *Peña Martínez, A. I.* (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Animal Reproduction Science, 82 – 83. 209–224 s.

Kvapil, R., Kvapilová, R. (2007): *Průvodce psí reprodukcí*. Praha: J. Špičák – Tok. 78 s. ISBN 978-80-86177-21-2.

Louda, F. et al. (2001): *Inseminace hospodářských zvířat: se základy biotechnických metod*. 1. vydání. Praha: TIRA, s.r.o. 230 s. ISBN 80-213-0702-1.

Peña Martínez, A. I. (2004): Canine fresh and cryopreserved semenevaluation. Animal Reproduction Science, 82–83. 209–224 s.

Root Kustritz, M. V. (2007): The value of canine semen evaluation for practitioners. Theriogenology, 68. 329–337 s.

Vágenknechtová, M., Hošek, M., Máchal, L., Chládek, G. (2011): The influence of external and internal factors on the quality of semen collection and qualitative indicators of semen in the dog (Canis familiaris). Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, LIX, No. 6, 373 – 380 s.

EFFECTS OF LAMBING ON THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE TRAITS OF MILK OF NATIVE SHEEP ON THE NATURAL PASTURE IN A SUBMONTANE REGION

[1]Petra Pešinová, [1]Antonín Vejčík, [1]Miroslav Maršálek

[1]Department of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, South Bohemia University, Studentská 13, 370 05, České Budějovice, Czech Republic
peta.pesinu@seznam.cz

Abstract

The study investigated the effects of the number of lambs, month of lambing and parity on the milk components of Original Valachian sheep. The flock is kept in the altitude of 600 m above sea level on outside grazing in area composted of Poaceae predominantly, Plantagineceae and Papilionaceae. Totaly were evaluated 276 samples from 69 pieces ewes lambed in March (12) April (35) May (19) June (3). The mean of labms was 1.71 and of parity 2.41. Lambs were weaned 12 hours before mechanical milking - Method ET (Animal Recording ICAR, 2012). It was found by analysis of variance the number of lambs had significant effect ($P<0.01$) on the content of fat. Month of lambing as same as parity had significant effect ($P<0.01$) on the milk yield, contents of fat, crude protein, casein and urea concentration in milk and not significant effect on the content of lactose and number of somatic cell count. Multiple comparison tests not determine significant differences between the number of lambs (1, 2, 3) on the content of fat. Differences in milk yield were between parity 3rd and 1st, 2nd, 4-8th, in fat, crude protein and casein content were significant ($P<0.05$) between ewes on 4-8th and 1st, 2nd lactation.
Keywords: lambs, milk, parity, sheep, traits

Introduction

The Czech Republic is without a sheep dairying tradition. Consumers in this central european country have developed a taste for sheep cheeses. Increasingly small breeders of sheep is trying to developt domestic production of cheeses with the hope of tapping into the gowing demand for sheep milk cheeses. Production and marketing is limited. The main production limitation has been low milk yields of domestic breeds. The most frequent breeds in sheep dairy flocks in the Czech Republic are Lacaune and East Friesian. The cost of breeding of these sheep breeds in conditions of central european countries are higher for farmers in comparison with the lowlands of the countries of southern Europe. Many of them are looking for alternatives breeds that costs are minimized and the produce to be the most profitable. In the Czech Republic the breeding of native breeds of sheep is supported through subsidies which turn out to be a very good source of income. The breed Original Valachian sheep is included in the genetic resources of sheep in our country. Valachian sheep is a hard resistant very well to adverse weather conditions with good walkability, accustomed to mountaine conditions, appreciating well pasture. Valachian sheep is possible to breed for milk, meat and wool. Traits of milk production are

affected by the complex genetic factors through nutrition and breeding technology to climatic influences.

The effect of the parity and stage of lactation on milk composition in different sheep breeds were studied by *Sevi et al*. (2000), *Aganga et al.* (2002), *Nuda et al*. (2003), *Oravcová et al.* (2007), *Kuchtík et al.* (2011).

The aim of study was investigation the effects of the number of lambs, month of lambing and parity on the milk components of Original Valachian sheep.

Matherial and Methods

The flock is kept in the altitude of 600 m above sea level on outside grazing in area of Novohradske Mountains composted of Poaceae predominantly, Plantagineceae and Papilionaceae.

The sampling was realized in April, May, June, July and August (throughly from the 2nd third of lactation). The control of milk production of Original Valachian sheep was conducted once month during lactation, at 4-5 weeks interval. The lambs were weaned 12 hours before milking (ET method) (*Animal Recording ICAR*, 2012). Animal were machined-milked. Sheep milk yield of less than 0.1 litre was not included in the statistical evaluation.

The average number of dairy ewes was 69 pieces ewes lambed in March (12) April (35) May (19) June (3). The mean of labms was 1.71 and of parity 2.41. Assessment of the fat content, crude protein, casein, lactose, dry matter was carried out by method infrared spectrometry (Combifoss FT 6000-Milkoscan FT 6000). The somatic cell count were analyzed on the apparatus Fossomatic 5000. The direct specific enzymatic method UREAKVANT was used for the routine determination of the urea in milk (UM) (by Central Laboratory in České Budějovice).

The obtained results were analyzed by statistical methods in Statistica 10. Cz. The effect of number of lambs, month of lambing and parity on the milk production, on the content of basic components and on the quality traits was tested single-factor analysis of variance. Statistical significance was tested using the F-test. A more detailed evaluation of results of analysis of variance (method of multiple comparisons) was used the Schéffe test to determine the significant differences between group means in an analysis of variance setting.

Results and Discussion

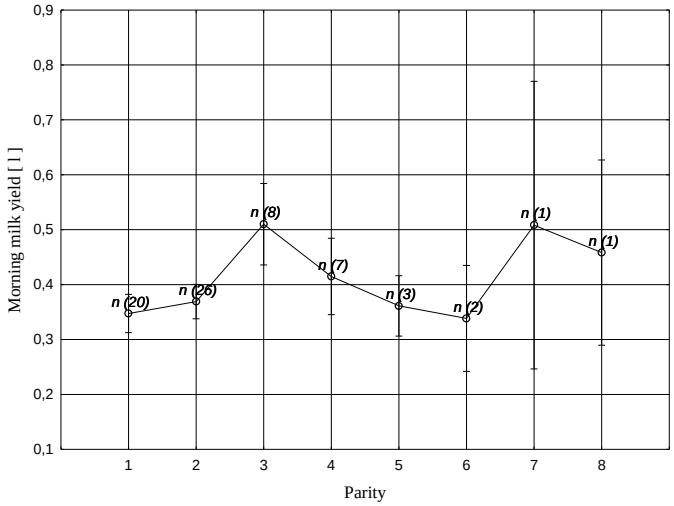
Parity tested by analysis of variance had significant effect ($P<0.05$) on the milk yield, contents of fat, crude protein, casein and urea concentration in milk and not significant effect on the content of lactose and number of somatic cell count (*Table 1*) in Original Valachian sheep. The parity influenced almost all the variables considered significantly, except casein/total protein, α-lactoglobulin, immunoglobulin, somatic cell count. Total protein, casein and whey protein tended to increase with parity (*Nudda et al.* 2003). An increase of these protein with age has been reported for the Churra breed (*Fuertes et al.* 1998). In Original Valachian sheep the content of crude protein, of casein and of fat indicated increase in ewes till the second lactation and than decline, while the lactose content showned decresed trend. The highest yields were for ewes on the third lactation (*Table 1, Figure 1*) *Fuertes et al.* (1997) found the highest milk yield for ewes edged 2.5 yr. The highest values for fat, protein, casein and lactose contents were obtained coindicting with smaller yields and lower lactose concentrations in Churra ewes.

***Table 1*: Milk yield, milk composition and somatic cell count classified according the parity in Original Valachian sheep**

Parameter	Parity				MS	SEM	SS	F-value
	1	2	3	4-8				
	Means							
Morning milk yield [l]	0.35	0.37	0.51	0,40	0.22	0.010	0.7	8.051***
Fat [g.100g^{-1}]	6.48	6.65	6.27	5.90	7.03	1.202	21.1	5.085**
Crude protein [g.100g^{-1}]	5.83	6.07	5.67	5.40	5.52	0.064	16.6	5.057**
Casein [g.100g^{-1}]	4.33	4.49	4.22	4.01	2.88	0.615	8.6	8.214 ***
Lactose [g.100g^{-1}]	5.21	5.18	5.13	5.16	0.06	0.031	0.2	0.221
Somatic cell count [1000.ml^{-1}]	232	226	286	199	48058	18.68	144175	0.535
Urea concentration [mmol.l-1]	7.66	7.12	7.95	8.20	16.52	0.094	49.6	7.244***
SC 10^3 [$\log_{10}$]	2.18	2.18	2.14	2.09	0.10	0.024	0.3	0.669

Mean= average arithmetic value, MS = Means squares, SEM= Standard error of the mean, SS= Sum of Square, significancy *P<0.1, **P<0.05; ***P<0.01.

***Figure 1*: Morning milk yield in Original Valachian sheep affected by parity (number of lactation)**



n = number of recorded ewes

Somatic cell count per 1ml was not effected by parity (P>0.05), ranging from 199 to 286.10^3 in Original Valachian sheep. Parity age was highly significant (P<0.001) for urea concentration in milk. *Sevi et al.* (2000) published average values were acceptably low, ranging from 249 to 321.10^3 the somatic cell count in milk per 1ml of milk in parities 3 and 1, respectively.

Month of lambing was observed to have a significant (P<0.01) effect on all milk constituents, except lactose (*Table 2*).

***Table 2*: Milk yield, milk composition and somatic cell count classified according the month of lambing in Original Valachian sheep**

Parameter	Month of Lambing				MS	SEM	SS	F-value
	March	April	May	June				
	Means							
Morning milk yield [l]	0.34	0.36	0.44	0.45	0.16	0.17	0.5	5.704***
Fat [g.100g^{-1}]	6.90	6.56	5.90	5.60	13.16	1.20	39.5	10.004***
Crude protein [g.100g^{-1}]	6.02	6.00	5.44	4.98	8.03	1.07	24.1	7.548***
Casein [g.100g^{-1}]	4.46	4.45	4.02	3.74	4.48	0.61	13.5	13.485***
Lactose [g.100g^{-1}]	5.17	5.18	5.16	5.40	0.17	0.52	0.5	0.614
Somatic cell count [1000.ml^{-1}]	232	222	257	145	38201	298	114603	0.425
SCC 10^3 [$\log_{10}$]	2.21	2.14	2.17	2.07	0.07	0.38	0.2	0.483
Urea concentration [mmol.l^{-1}]	7.16	7.43	8.17	7.88	12.83	1.56	38.5	5.530**

Mean= average arithmetic value, MS = Means squares, SEM= Standard error of the mean, SS= Sum of Square, significancy *P<0.1, **P<0.05; ***P<0.01.

The trend of month of lambing for milk components were mainly determined by both pasture availability and its quality and also be a correlative of stage of lactation. Nevertheless, temperature and photoperiod could have had an important influence because ewes grazed pasture for many hours per day (*Carta et al.* 1995). Day length before lambing was found to have a significant effect on milk production in which prepartum short days had a positive effect on milk production in the following lactation (*Pollott and Gootwine*, 2004). A similar positive effect of short days on milk production was found in dairy cattle (*Aharoni et al.* 2000).

The urea concentration was affected by month of lambing i Original Valachian sheep. In the study of *Ramin et al.* (2010) mean of UM concentration increased inconstantly from 6.1 to 17.7 mmol.l^{-1} within 135 days of lactation. Count of somatic cell contained in milk was the lowes in in last month of our study probably by low number of ewes lambed in June (3). An increase in SCC values in late-lactation has been documented in both individual and mass milk). When it is not caused by mammary infections, a high milk SCC may be the result of a reduced milk yield or of a functional alteration of the mammary gland tissue caused by the shorter survival of epithelial cells that are supplied with fewer nutrients at the end of lactation (*Sevi et al.* 2004).

Our study showed that analysis of variance of factor the number of lambs had significant effect (P<0.05) on the content of fat. Litter size for Original Valachian sheep in the present study was average of 1.71 lambs born per ewe lambing. Consistent differences in milk composition associated with the number of lambs were observed, but the differences were not statisticaly significant (P>0.05) (*Snowder and Glimp*, 1991).

The contents of fat crude protein and casein was higher in ewes with singles. Lactose content and concentration urea in milk was higher in Original Valachian ewes with multiple birth (*Table 3*).

***Table 3*: Milk yield, milk composition and somatic cell count classified according the number of lambs in Original Valachian sheep**

Parameter	Number of lambs			MS	SEM	SS	F-value
	1	2	3				
	Means						
Morning milk yield [l]	0.37	0.39	0.36	0.01	0.010	8	0.395
Fat [g.100g^{-1}]	6.64	6.31	5.88	4.79	0.072	388	3.372**
Crude protein [g.100g^{-1}]	5.99	5.74	5.59	1.97	0.064	309	1.739
Casein [g.100g^{-1}]	4.41	4.27	4.18	0.70	0.037	103	1.861
Lactose [g.100g^{-1}]	5.14	5.19	5.29	0.16	0.031	73	0.586
Somatic cell count[1000.ml^{-1}]	241	220	304	43.10^{3}	18.676	227.10^{5}	0.479
Urea concentration [mmol.l^{-1}]	7.52	7.61	8.02	1.25	0.094	667	0.511
SC 10^{3} [log$_{10}$]	2.19	2.13	2.23	0.10	0.024	37	0.704

Mean= average arithmetic value, MS = Means squares, SEM= Standard error of the mean, SS= Sum of Square, significancy *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.01.

Fat content was found lower in ewes giving birth to multiplies, probably as a result of dilution effect (*Othmane et al.* 2002). *Oravcová et al.* (2007) published in contrast, protein content was found lower in ewes giving birth to singles (Tsigai and Improved Valachian sheep). Multiple comparison tests not determined significant differences between the number of lambs (1, 2, 3) on the content of fat. Morning milk yield tended to vary more in dependence on litter size (1, 2). In triplets was the mean of morning milk yield the lowest. It is reasonably affected by low pieces of ewes with triplets. The effect of number of lambs on the count of somatic cell and urea concentrations in milk was not significant in Original Valchian sheep.

Conclusion

The effect of number of lambs was significant only on the content of fat in milk in Original Valchian sheep. Month of lambing as same as parity affected the milk yield, contents of fat, crude protein, casein and urea concentration in milk and not significant effect on the content of lactose and number of somatic cell count. From the results of our study we conclude that the highest yield were for ewes on the third lactation. Ewes in their first and second lactation had the smallest total milk yield, whereas during the third and later lactation, they had their greatest lifetime milk yield. These findings can be recomended for breeders to carry out selection up to 4 years of age. Ewes on the third lactation also to begin with milking for efficient dayring production to obtain an economical level of viable sheep breeding.

Aknowlegements

Authors wish to thank Mr. J. Vejčík and his wife Jana for realizing of sampling on his sheep farm. Thanks are due to Mrs. Helena Pešinová from Central Laboratory of Madeta a.s. in České Budějovice and whole team of lab with helping of analyses of raw sheep milk.

Supported by Ministry of Education, Youthand Sports of the Czech Republic (project MSM 6007665806) and GAJU (project 022/2010/Z).

References

Aharoni, Y., Brosh, A. and Ezra, E. (2000): Prepartum photoperiod effect on milk yield and composition in dairy cows, J. Dairy Sci., 83. 2779–2781.

Aganga, A. A., Amarteifio, J. O., Nkile, N. (2002): Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk, J. Food Compos. Anal., 15. 533−543.

Carta, A., Sanna, S. R., Casu, S. (1995): Estimating lactation curves and seasonal effects for milk, fat and protein in Sarda dairy sheep with a test day model, Livestock Prod. Sci. 44. 37- 44.

ICAR (2012): Intrenational agreement of recording practices, Available at www.icar.org.

Fuertes, J. A., Gonzalo, G., Carriedo, J. A., San Primitivo, F. (1998): Parameters of test day milk yield and milk components ford airy ewes, J. Dairy Sci., 81. 1300-1307.

Kuchtík, J., Šustová, K., Urban, T., Zapletal, D. (2008): Eff ect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes, Czech J. Anim. Sci., 53. 55−63.

Nudda, A., Feligini, M., Battacone, G., Macciotta, N. P. P. (2003): Effects of lactation stage, parity, β-lctoglobulin genotype and milk SCC on whey protein compositon in Sarda dairy ewes, Ital. J. Anim. Sci., 2. 29-39.

Oravcová, M., Margetín, M., Peškovičová, D., Daňo, J., Milerski, M., Hetényi, L., Polák, P. (2007): Factors affecting ewe's milk fat and protein content and relationships between milk yield and milk components, Czech J. Anim. Sci., 52. 7. 189-198.

Othmane, M. H., Carriedo, J. A., De la Fuente, L. F., San Primitivo, F. (2002): Factors affecting test-day milk composition in dairy ewes, and relationships amongst various milk components, J. Dairy Res., 69. 53-62.

Pollott, G. E., Gootwine, E. (2004): Reproductive Performance and Milk Production of Assaf Sheep in an Intensive Management System, J. Dairy Sci., 87. 3690- 3703.

Ramin, A. G., Aghazadeh, A., Karamian, T., Ramin, S. (2010): Correlations of dietary crude protein and gross energy on blood glucose and urea, milk urea and lactose concentrations in lactating ewes, Acta Vet. Brno, 79. 369-375.

Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A., Muscio, A. (2004): Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality, Small Rumin. Res., 51. 251-259.

Sevi, A., Taibi, L., Albenzio, M., Annicchiarico, G. (2000): Efefct of parity on milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes, Small Rumin. Res., 37. 99−107.

Snowder, G. D., Glimp, H. A. (1991): Influence of breed, number of suckling lambs, and stage of lactation on ewe milk production and lamb growth under range conditions, J. Anim. Sci., 69. 923-930.

STATISTICA 10 *CZ*, StatSoft CR s.r.o.

THE EFFECT OF TEMPERATURE IN THE STABLES ON RESTING BEHAVIOR OF CZECH FLECKVIEH COWS

Večeřa, M., Falta, D., Chládek, G.

Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy,
Department of Animal Breeding
613 00 Brno (CZ), Zemedelska 1
milan.vecera@mendelu.cz

Abstract

The aim of study, the effect of temperature in the stables on resting behaviour of czech fleckvieh cows was evaluated. The frequency of standing cows and cows lying on the right and left side (laterality) was determined. Experiment was conducted in farm GenAgro Ricany a. s. (49°12´30.370´´N, 16°23´43.092´´E). Observation was carried out at weekly intervals from 8. 6. 2011 to 30. 5. 2012, at 10.00 AM (48 observations). The objective of monitoring was one section - one quarter of stable (n = 98 cows). The temperature in the stables was recorded by HOBO data loggers and divided into 8 temperature zones (< -5.0 °C to 25.1 < °C). A total of 4 704 observations were analysed. In case of the temperature in stables, high statistically significant difference ($p < 0.01$) was found between standing (inside and outside the cubicle) and lying (on the left and on the right side) cows. Furthermore, it was found that lying cows had favor left side more than the right. In the group of temperatures from - 4.9 to 5 °C was proved highly statistically significant difference ($p < 0.01$). In the group of temperatures from 10 to 20 °C was found only statistically significant difference ($p < 0.05$) and in the group of temperature from 5.1 to 10 and 20.1 to 25 °C was not proved statistically significant difference ($p > 0.05$). Based on the results can be stated that, the temperature in the stables had a great influence on resting behaviour of Czech Fleckvieh cows.

Keywords: cows, laterality, standing, lying, temperature in the stables

Acknowledgments: This research was supported by grant project FA MENDELU IGA TP 2/2013.

Introduction

Although the process of domestication brought about a number of important, or even essential, changes in farm animal performance or exterior, their environmental requirements remained relatively invariable throughout their phylogenesis. The impact of environmental factors on domesticated animals is extremely complex and difficult to define. The more altered the original environmental conditions, the greater responsibility of the breeder to provide adequately for animals' needs (*Chládek*, 2004).

Barn microclimate is, together with nutrition, type of housing and animal handling, one of the main factors affecting an animal organism. It affects cows' welfare and performance and consequently herd profitability. The barn microclimate is defined by air temperature, relative

humidity, air velocity and content of various components –gasses, dust, microorganisms (*Matějka*, 1995). According to *Bílek* (2002) barn temperature is the most influential factor. A negative impact of high temperature is enhanced by air humidity *Koukal* (2001). With increasing relative humidity, heat tolerance and stress resistance of cows decreases (*Doležal et al.*, 2003). Temperature-Humidity Index (THI) accounts for the combined effects of temperature and relative humidity (*West*, 2003). In order to maintain good welfare of cows it is essential to analyse their behavioural responses to barn microclimate changes.

Materials and method

The aim of study, the effect of temperature in the stables on resting behaviour of czech fleckvieh cows was evaluated. The frequency of standing cows and cows lying on the right and left side (laterality) was determined. Experiment was conducted in farm GenAgro Ricany a. s. (49°12´30.370´´N, 16°23´43.092´´E). Observation was carried out at weekly intervals from 8. 6. 2011 to 30. 5. 2012, at 10.00 AM (48 observations). The objective of monitoring was one section - one quarter of stable (n = 98 cows). A total of 4 704 observations were analyzed. Barn airspace temperature represents the average of the temperatures in the control days and divided into 8 temperature zones (< -5.0 °C to 25.1 < °C). It was measured every 15 minutes by 3 sensors with HOBO data logger (Onset Computer). To the resulting program was used MS Office Excel 2003 and Statistic 10.0.

Results and discussion

All dairy cows (n = 4 704) were divided into 8 temperature zones. Most of individual monitoring was in the group with temperature between 15.1 – 20 °C (n = 980), least in the group with temperature lower than -5 °C (n = 196). From *Table I.* is evidently, that there is high statistically significant difference between lying and standing cows ($p < 0.01$). At temperature from -4.9 to 25,1 < °C there were statistically significant more lying dairy cows than those, who were standing ($p < 0.01$). At temperature < -5 °C there was similar trend in preferation, but the difference was´t statistically significant ($p > 0.05$). When the preferation of left side and right side (laterality) was compared, we find out, that from overall count of lying cows (n = 3 138) 1 733 was lying on the left side and 1 405 on the right side. This difference was high statistically significant ($p < 0.01$). There was also high statistically significant difference in temperature zone from -4.9 to 5 °C, when more cows were lying on the left side ($p < 0.01$). In temperature zones from 10.1 to 20 °C and in the zone 25 < °C, there was again bigger part of cows lying on the left side and this difference was statistically significant ($p < 0.05$). The difference in other zones was´t statistically significant ($p > 0.05$).

The combination of lying behavior and the barn temperature revealed that the cows standing in hot days produced the highest quantity of milk ($p < 0.05$) while in cold days the lowest. An increase in barn temperature and humidity causes a decrease in dry matter intake (DMI) and thus also in milk production (*West*, 2003). Cows spend on average 13 h/d lying down (Houpt, 1998). Tucker et al. (2004) specified the range between 9.4–14.7 h/d, with an average lying bout of 0.9–1.4h. The proportion of cows lying down (CCI) should exceed 85% in free stall barns with adequate management (*Grant*, 2009; *Rae*, 2012). We found out a considerably lower number of lying cows (CCI = 58 %) which could probably be related to high temperatures. At

temperatures exceeding 20 °C the number of cows lying down decreases, thus affecting CCI values (*Zejdová et al*., 2011). It is generally acknowledged that the body of a standing cow offers a much greater surface for heat loss than that of a lying cow. This corresponds with the fact that our cows standing in the hot period produced more milk than those standing in the cold period.

A non-significant tendency towards a left-side preference was also found by *Hrouz et al.* (2007) where 53–70 % of their experimental animals preferred the left side to rest on. *Tucker et al*. (2009) observed a left-side laterality in free-housed dry cows; however, the authors admited that cows in pens or on pasture may exhibit no laterality. Although the cows show no overall laterality as a group, they still may have a strong preference as individuals (*Gibbons et al*., 2012). *Zejdová et al*. (2011) found out that older cows (lactation 4 and older) preferred left side more often than younger cows (lactation 2 and 3). In our experiment, the cows preferring the left side had a higher milk production. We speculated that this was due to the anatomical differences in the left and right lung. A greater respiration capacity of the right lung allowed better lung ventilation in cows lying on their left side.

Table I.: **The effect of temperature in the stables on resting behavior**

monitored aktivity				Temperature zones (°C)								∑
				< -5	**-4.9 to 0**	**0.1 to 5**	**5.1 to 10**	**10.1 to 15**	**15.1 to 20**	**20.1 to 25**	**25.1 <**	
amount of cows				196	392	392	882	686	980	784	392	4704
aktivity	**place**											
lying	**in box**	**left**	**	47	180^{A}	160^{A}	360	266^{a}	318^{a}	259	143^{a}	1733^{A}
		right	**	52	112^{B}	107^{B}	311	218^{b}	259^{b}	237	109^{b}	1405^{B}
	out of box	**left**	NS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		right	NS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
standing	**in box**		**	83	83	96	182	156	323	236	108	1267
	out of box		**	14	17	29	29	46	80	52	32	299
lying overall			**	99	292^{A}	267^{A}	671^{A}	484^{A}	577^{A}	496^{A}	252^{A}	3138^{A}
standing overall			**	97	100^{B}	125^{B}	211^{B}	202^{B}	403^{B}	288^{B}	140^{B}	1566^{B}

*Values within the row differ if marked with * (P < 0.05) and ** (P < 0.01) or difference is not significant (NS)*

Values within the column differ if marked with different letters a, b (p< 0.05); A, B (p< 0.01) or difference is not significant (NS)

Conclusion

It was confirmed, that the temperature inside the stables has influence on the resting behavior of dairy cows. At the temperature from 5 to 20 °C more cows were lying. The cows tended to rest lying down rather than standing but not quite to the extent quoted in literature. The barn temperature had effect on the proportion of lying and standing cows.

References

Bílek, M., 2002: Welfare ve stájích pro skot, (Welfare in barns for cattle, in Czech), Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 32 s. ISBN 80-7271-112-1.

Chládek, G., 2004: Složení mléka jako levný a účinný prostředek pro hodnocení chovného prostředí dojnic. (Milk composition as a cheap and efficient tool for evaluation of housing facilities for dairy cows, in Czech). In: HANUŠ, O. a kol. Aktuální problémy řízení v chovu skotu. (Ccurrent problems of cattle farming, in Czech). Rapotín. Agrární komora Olomouckého kraje, Okresní agrární komora Šumperk, s. 56–60.

Doležal, O., Dolejš, J., Knížková, I., Kunc, P., Bílek, M., Černá, D., 2003: Komfortní ustájení vysokoprodukčních dojnic. (Comfort housing for high performance dairy cows, in Czech). Výzkumný ústav živočišné výroby, Uhřiněves. ISBN 80-86454-28-2.

Gibbons, J., Medrano-Galarza, C., Passille, A. M., Rushen, J., 2012: Lying laterality and the effect of IceTag data loggers on lying behaviour of dairy cows. Applied Animal Behaviour Science, 136 (2): s. 104–107. ISSN 0168-1591.

Grant, R., 2009: A quick check for cow comfort. Dairy basics. Excerpts from William H. Miner Agricultural Research Institute Farm Report, September 2009.

Houpt, K. A., 1998: Domestic behaviour for veterinarians and animal scientists, 3rd ed. Iowa state University Press, s. 98–103. ISBN 0-8138-1061-2.

Hrouz, J., Mácha, J., Klecker, D., Veselý, P., 2007: Etologie hospodářských zvířat. (Ethology of farm animals, in Czech). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 185 s. ISBN 978-80-7157-463-7.

Koukal, P., 2001: Výživa dojnic v teplém počasí podle zkušenosti z léta 2000, (Nutrition of dairy cows during periods of hot weather, experiences from the summer of 2000, in Czech). Farmář, 9: 75–76. ISSN 1210-9789.

Matějka, J., 1995: Teplotní a vlhkostní poměry stájí pro skot v zimě, (Ethology of farm animals, in Czech). Náš chov, 12, s. 22– 23. ISSN 0027-8068.

Rae, B., 2012: Dairy Diagnostic Tool Box. Worksheet 9: Calculating Cud Chewing Index & Cow Comfort Quotient. University of Minnesota [on line]. Dostupné z: http://www.ansci.umn.edu/dairy/toolbox/toolbox.htm.

Tucker, C. B., Weary, D. M., Rushen, J., Passillé, A. M., 2004: Designing Better Environments for Dairy Cattle to Rest. Advances in Dairy Technology (2004) Volume 16, s. 39.

Tucker, C. B., Cox, N. R., Weary, D. M., Spinka, M., 2009 : Laterality of lying behaviour in dairy cattle. Applied animal behaviour science, 120 (3-4): s. 125–131, SEP 2009. ISSN 0164-1591.

West, J., W., 2003: Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. Journal of Dairy Science 86, 2131 – 2144. ISSN 0022-0302.

Zejdová, P., Falta, D., Chládek, G., Máchal, L., 2011: Effect of lactation stage, its number, current milk performance and barn air temperature on laterality of holstein dairy cows laying behaviour. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis (5) 2011, s. 315–321. ISSN 1211-8516.

CHANGE OF STABLE MICROCLIMATE DURING THE SPRING AND SUMMER AS A CRITERION OF WELFARE AND ITS EFFECT ON MILK YIELD, COMPOSITION AND QUALITATIVE INDICATORS AS HOLSTEIN DAIRY COWS

Velecká, M., Javorová, J., Falta, D., Večeřa, M., Andrýsek, J., Chládek, G.

Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy,
Department of Animal Breeding
613 00 Brno (CZ), Zemědělská 1
Milena.velecka@mendelu.cz

Abstract

The aim of this research was to evaluate the change of microclimate as a criterion of welfare and its effect on average milk yield, composition and qualitative indicators in milk at the turn of spring and summer. Overall 25 bulk tank milk samples were analyzed in the period of 27. 5. 2013 to 20. 6. 2013. Samples were taken every day. The farm is situated in Žabčice (GPS49°0'51.786"N, 16°36'14.809"E). Measured properties were microclimate: barn airspace temperature (BAT), relative humidity (RH); average morning milk yield; milk composition: fat content (F), solids non-fat (SNF), protein content (P), lactose content (L) and qualitative indicators: active acidity (AA), titratable acidity (TA), density (D), rennet coagulation time (RCT), quality of curd (QC), somatic cell (SC). Based on the correlation of bulk milk samples of Holstein breed was found with increasing BAT increases AA ($r = 0.84$, $P < 0.01$), RCT ($r = 0\ .73$,), reduces TA ($r= -0.87$, $P < 0.01$). In bulk milk samples was observed with increasing RH increases AA ($r = 0.44$, $P < 0.01$) and reduces TA ($r = -0.47$, $P < 0.01$). Other analyzed parameters were not affected by microclimate.
Key words: Holstein, milk composition, milk quality, welfare, microclimate

Acknowledgments: This research was supported by grant project FA MENDELU IGA TP 2/2013.

Introduction

Animal welfare is defined as a condition in which the animal is trying to cope with their environment *(Webster, 2005*). Quality of stable environment, nutrition, housing systems and the quality of care among are the main factors that affect the animal organism and affect their well-being and milk production (*Matějka, 1995*). Pressure is growing from the public on livestock farmers, in complying with the conditions of welfare and protection against maltreatment in many European countries. If the animals to behave in the environment in the thermo neutral zone, it would be ideal in terms of welfare. It is practically impossible (*Doležal et al., 2010*). Cows can keep a constant body temperature. This stability is relative. Hypothermia or hyperthermia can be caused enormous decrease or increase barn airspace

temperature (*Brestenský et al., 2006*). Heat stress will become more important in livestock due to the forecast of continuing global warming (*Doležal et al., 2010*). Cows receive less energy from food at high temperatures. In the body occurs an energy deficit and reduces the yield of milk at high temperatures (*Brestenský et al., 2006*).

Relative humidity is the second main indicator of the quality of stable microclimate next to environmental temperature (*Šoch et al., 2003*). Seasonal and daily fluctuations in values of humidity are repressed influence of production of heat and water vapor animals accommodated and ventilation air in the breeding barn (*Doležal et al., 2004*).

The amount of evaporation depends mainly on the temperature, the degree of saturation of water vapor and air flow. High relative humidity has a negative impact on the welfare and performance of dairy cows (*Šoch et al., 2003*). Yield of Holstein cows is dynamically increased in recent years. This requires a re-analysis of the basic parameters of their milk. In addition to traditional content components (protein, fat, lactose and solids non-fat) come to the fore, indicators related to technological properties of milk as his rennet coagulation time, quality of curd and titratable acidity (*Čejna and Chladek, 2004*).

Materials and method

Measured samples came from University farm in Žabčice (GPS49°0’51.786”N, 16°36’14.809”E), which reared with Holstein breed. During the 25 days (from 27. 5. 2013 to 20. 6. 2013) were collected daily bulk milk samples after the morning milking.

Milk samples were analyzed next day after taking in the laboratory at department of Animal Breeding at Mendel University in Brno. Measured parameters were chosen: fat content (%), protein content (%), lactose (%), density (kg.l-1) and solids non-fat (%) with MilkoScope Julie C5 Automatic from Scope-Electric. Rennet coagulation time was determined using a "Nephelo-turbidimetric milk coagulation sensor" (*Přibyla and Čejna, 2006*). The test was performed using the preparation Laktochym 1:5000 (from the company Milkom, Inc. based in the Tábor, CZ) in the dose of 1 ml per 50 ml milk (after the dilution of the renneting agent in the ratio 1:4). Quality of curd was evaluated after 60 minutes of incubation of 50 ml of renneted milk at 35 °C and compared with tabular values (*Gajdůšek, 1997*) using the scale from 1 (the best) to 5 (the worst). Active acidity was measured by pH-meters Testo AG - testo 206. Titratable acidity was measured in a milk sample of 100 ml using an alkaline solution up to light pink colour of the mixture (in ml of the 0.25 M NaOH x $100ml^{-1}$). Barn airspace temperature represents the average of the temperatures in the control days. It was measured every 15 minutes by 3 sensors with HOBO data logger (Onset Computer). Relative humidity in barn was recorded the same sensors and in the same intervals like barn airspace temperature. To the resulting program was used MS Office Excel 2003 and Unistat version 5.1

Results and discussion

Values of mean, minimum, maximum and standard deviation of data from analysis of cow’s milk composition, qualitative indicators and barn airspace temperature, relative humidity are shown in Table I. It was selected for 25 days with a range of average daily temperatures in the barn from 17.47 ° C to 25.95 ° C, with an average daily temperature in the barn 20.82 ± 2.47 ° C. This means that in some periods the monitored cows were exposed to a heat stress. Temperature 20 ° C is considered a risk for the creation of heat stress (*Zejdová et*

al., 2013). Relative humidity was measured from 71.83 % to 77.88 %, with an average of 75.69 ± 1.80%, in these days. Relative humidity in the barn should be in the range of 40 – 80 %. The relative values should not exceed 85% in the barn. Harmful air is too dry (below 35 %) - which occurs very rarely in our conditions (*Zejdová et al., 2013*). The average morning milk yield was found from 17.46 to 20.11 liters, with an average of 19.14 ± 0.70 liter of milk.

***Table 1*: Mean, minimum, maximum and standard deviation of quantity, composition and average morning milk yield, properties of milk, barn airspace temperature and relative humidity on farm**

Parameter		$\bar{x}$	Min	Max	SD
BAT	**°C**	20.82	17.47	25.95	2.47
RH	**%**	75.69	71.83	77.88	1.80
AMMY	**liter**	19.14	17.46	20.11	0.70
F	**%**	3.78	3.34	4.19	0.22
SNF	**%**	8.54	7.98	9.08	0.29
D	**kg.m^{-3}**	1.0291	1.0273	1.0310	0.0010
P	**%**	3.13	2.94	3.34	0.57
L	**%**	4.69	4.38	4.98	0.16
RCT	**second**	207	185	270	20
QC	**class**	2	1	3	0.45
AA	**pH**	6.60	6.41	6.79	0.13
TA	**°SH**	5.83	5.18	6.16	0.27

BAT – barn airspace temperature, RH – relative humidity, AA – active acidity, TA – titratable acidity, F – fat content, SNF – solids non fat, D – density, P – protein content, L – lactose content, RCT – rennet coagulation time, QC – quality of curd, , AMMY – average morning milk yield

Measured parameters were fat content, protein content, lactose content and solids non-fat content and density. The average values of fat content and its standard deviation for the whole period under study were 3.78 ± 0.22 %. The minimum of value of fat content is 3.34 % and the maximum value was 4.19 %, on the other hand. Values of solids non-fat content were ranged from 7.98 to 9.08%, with an average of 8.54 ± 0.29 % in the samples. The density of the milk samples was determined from 1.0273 to 1.0310 kg.m^{-3}, with an average of 1.0291 ± 0.001 kg.m^{-3}. Next milk component was measured protein content. The lowest value of the protein content was observed 2.94 %, the highest protein content was 3.34 %, with an average value of 3.13 ± 0.57 %. Last measured milk component was lactose content. The lowest value of the lactose content was 4.38 %, while the highest value of the lactose content was 4.98%. The time needed to coagulate milk proteins ranged from 185 to 270 seconds, with an average time of 207 ± 20 seconds in the period. Quality curd ranged from class 3 to class 1, with an average of grades 2 ± 0.45 classes. Active acidity was observed from pH 6.41 to pH 6.79, with an average pH of 6.60 ± 0.13. Last monitored a qualitative indicator was titratable

acidity. The lowest value of titratable acidity was 5.18 °SH, while the highest value was observed 6.16 °SH. The average value of titratable acidity was 5.83 ± 0.27 °SH.

Barn airspace temperature and humidity index were compared with the average morning milk yield, composition and quality of milk indicators in Table 2.

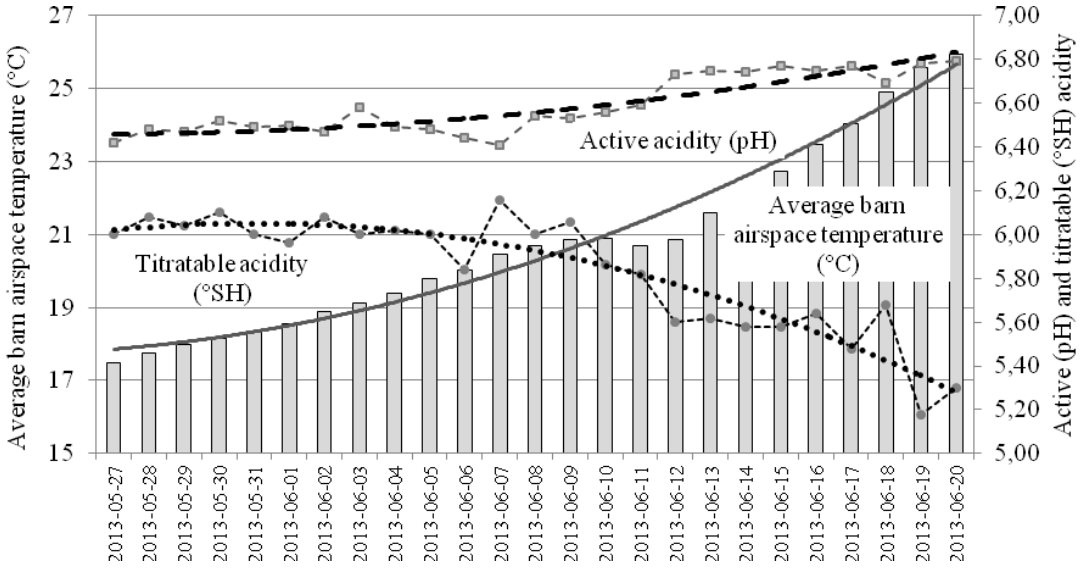
***Table 2*: Correlation between barn airspace temperature, relative humidity and yield, composition and qualitative indicators of milk**

		Parameter of microclima	
		BAT	**RH**
Parameter of qunitity, composition and quality of milk	**AA**	0.84**	0.44*
	TA	-0.87**	-0.47*
	F	-0.35 N.S.	0.07 N.S.
	SNF	-0.36 N.S.	-0.38 N.S.
	D	-0.33 N.S.	-0.34 N.S.
	P	0.06 N.S.	-0.02 N.S.
	L	-0.36 N.S.	-0.38 N.S.
	RCT	0.73**	0.33 N.S.
	QC	0.29 N.S.	0.17 N.S.
	AMMY	-0.15 N.S.	-0.39 N.S.

*Signification: N.S. = non signifiant (P > 0.05); * = (P < 0.05); ** = (P < 0.01)*

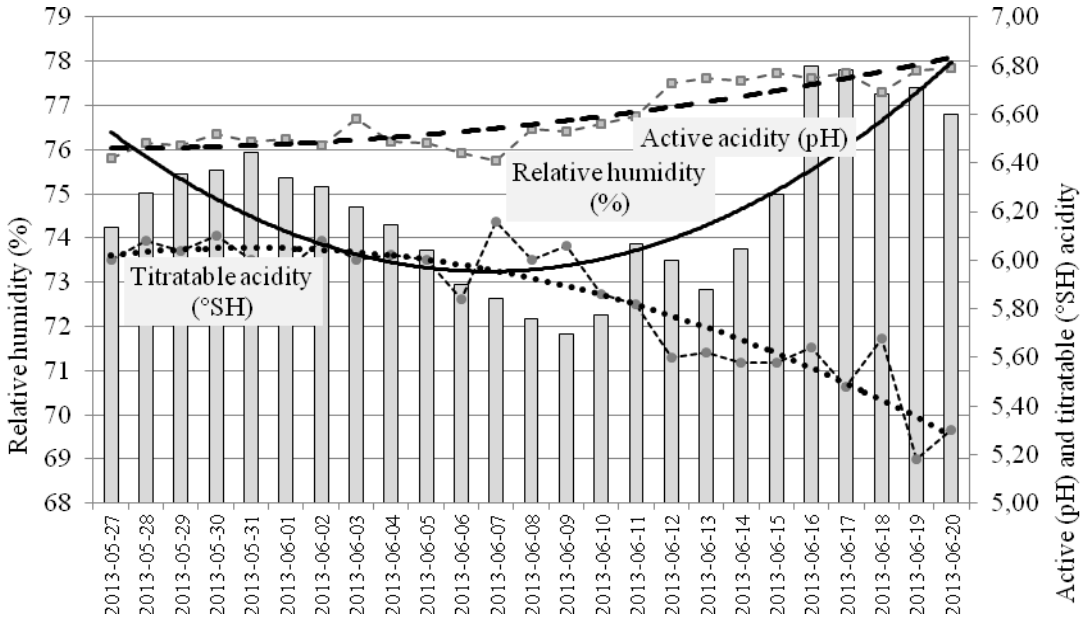
Based on the correlation of bulk milk samples of Holstein breed was found that with increasing average barn airspace temperature increases active acidity ($r = 0.84$, $P < 0.01$) (*Figure 1*). Further it was found out that there was a possitive correlation between average barn airspace temperature and rennet coagulation time ($r = 0.73$, $P < 0.01$). Polak et al. (2011) reached the same findings on the effect of temperature on rennet coagulation time. Rennet coagulation time is considered the most important technological properties of milk (*Čejna, 2008*). Effect of heat stress is manifested by changes in microbiological and chemical properties of milk (*Dolejš et al., 2006*). In milk samples was found that with increasing average barn airspace temperature reduces titratable acidity ($r = -0.87$, $P < 0.01$) (Figure 1). Titratable acidity of milk is dependent on the chemical composition of milk, especially protein, phosphate and citrate (*Gajdůšek, 2003*). Another correlation between average daily temperature and other monitored parameters were not statistically significant ($P > 0.05$).

***Figure 1*: Effect of average barn airspace temperature on active a titratable acidity in milk**



Based on the correlation of bulk milk samples of Holstein breed was found with increasing relative humidity increases active acidity ($r = 0.44$, $P < 0.01$) and reduces titratable acidity ($r = -0.47$, $P < 0.01$) (*Figure 2*). Dietary electrolyte balance is especially important in locations where environmental temperatures exceed 24 ºC and is exacerbated if relative humidity exceeds 50% (*Parks, Graham, 1992*). Other analyzed parameters were not affected by microclimate ($P > 0.05$).

***Figure 2*: Effect of relative humidity on active a titratable acidity in milk**



Conclusion

The aim of this research was to evaluate the change of microclimate as a criterion of welfare and its effect on average milk yield, composition and qualitative indicators in milk at the turn of spring and summer. Based on the correlation of bulk milk samples of Holstein breed was found that with increasing barn airspace temperature increases active acidity, rennet coagulation time, but reduces titratable acidity. In bulk milk samples was observed that with increasing relativity humidity increases active acidity and reduces titratable acidity. Other analyzed parameters were not affected by microclimate.

References

Brestenský, V. , Mihina, Š. (2006): Organizácia a technológia chovu mlékového hovädzieho dobytka. Nitra : Slovenské centrum poĺnohospodárskeho výskumu. 107.

Čejna, V. (2008): Zkušenosti z mlékárna se syřitelnsotí mléka ve vazbě dodavatele mléka. Sborník příspěvků z mezinárodního semináře na téma Výrobní zemědělská praxe potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozotivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků. 9 – 16.

Čejna, V., Chládek, G. (2004): The effect of lactation phase on coagulation time and titratable acidity of Holstein cows milk. Den mléka 2004. Praha: Katedra chovu skotu a mlékařství ČZU v Praze a ISV Praha. 55 - 57.

Dolejš, J. et al. (2006). Změna kompozice bílkovin v mléce dojnic vlivem tepelného stresu. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze. 136-137.

Doležal, O. et al. (2010): Metody eliminace tepelného stresu – významná chovatelská rezerva, Praha. [Online] 19.7. 2010. [Citace: 2. září 2013] http://www.cestr.cz/files/nezarazene_dokumenty/publikace_tepel._stres3.pdf.

Gajdůšek, S. (2003): Laktologie. Brno: MZLU. 84.

Matějka, J. (1995): Teplotní a vlhkostní poměry stájí pro skot v zimě. Náš chov, 12. 22-23.

Parks, J. E., Graham, J. K. (1992): Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38. 2. 209-222.

Polák, O., Večeřa, M., Falta, D., Chládek, G. (2011): Vliv teploty ve stáji na složení a technologické vlastnosti bazénových vzorků mléka dojnic holštýnského plemene. Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VII. Brno: Mendelova universita v Brně. 66 – 68.

Šoch, M. et al. (2003): Vliv relativní vlhkosti vzduchu a ochlazovací hodnoty prostředí na mléčnou produkci krav. Functions of energy and water balances in bioclimatological systems.

Webster, J. (2005): Životní pohoda: kulhání k ráji. Translation: Romana Šonková, 2009. UFAW, Blackwell Publishing.

Zejdová, P., Chládek, G., Falta, D. (2013): Vliv stájového prostředí na chování a mléčnou užitkovost dojnic. [Online] 5.6. 2010. [Citace: 12. září 2013] http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/21/21vliv_prostredi_na_skot_logolink.pdf

JUHTARTÁS JÖVEDELMÉNEK VIZSGÁLATA A SZAPORULATI MUTATÓK TÜKRÉBEN

Abayné Hamar Enikő, Póti Péter

Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
Poti.Peter@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Magyarországon az árutermelő juhállományok jövedelmezőségét - a minőségi bárány előállításon kívül- a bárányszaporulat növelésével, valamint az időszakos piac igényeihez való alkalmazkodással lehet elérni.
Vizsgálatunkban az AKI tesztüzemi rendszerének adatbázisát felhasználva elemezzük az eltérő színvonalon gazdálkodó (egyéni, társas, meghatározó árutermelő) juhászatok költség-jövedelem viszonyait. Modellszámítást végzünk arra vonatkozóan, hogy a szaporulati mutatók javítása hogyan hat a juhágazat jövedelmezőségére.
Vizsgáljuk az anyajuhok szaporaságát különböző keresztezések, takarmányozási módok és elletési idő függvényében. Az eredmények alapján javaslatot teszünk a juhtenyésztés jövedelmezőségének javítására.

Study about the income of sheep keeping affected by prolificacy rates

Abstract

In Hungary, the profitability of commodity producing sheep stock –except the quality lamb production- can be managed by increasing lamb prolificacy as well as by accomodating to market demands.
In our study we analyse the budgets of sheep breeders with different standards (individual, associated, determining good-producer) based on the AKI (Farm Accountancy Data Network) database system.
We create models about how the prolificacy rates affect the productivity of the sheep sector.
In addition we monitor the prolification of ewes depending on crossing, feeding methods, and lambing season.
On the basis of the results we make suggestions to improve the profitability of sheep breeding.

Bevezetés

Az OECD – FAO (2012) hosszú távú előrejelzése alapján, a világ juhhústermelése 21 százalékkal emelkedhet 2021-re, a 2009 és 2011 közötti időszak átlagához viszonyítva. Ausztrália és Új-Zéland jelentősen növelheti termelését és exportját. Az előrejelzés szerint az EU termelése hosszú távon 9%-kal csökken, az import 8%-kal emelkedhet. Ez alapján a magyar bárány kivitele biztosított, főleg Olaszországba (77% részarány) és Törökországba. A

juhállomány 86%-át egyéni gazdaságok, 14%-át gazdasági szervezetek tartják, az arány tíz éve változatlan. A jó lehetőségek ellenére juhtenyésztésünk többnyire veszteséges, főleg a szerény képességű merinó fajta egyeduralkodása, és az alacsony bárányszaporulat miatt.
2012-ben bárányexportunk értéke 11,79 milliárd forint volt 14,12 ezer tonna kivitele mellett.

Irodalmi áttekintés

Cehla (2011) negatív képet fest az ágazatról. Szerinte alacsony és romló paraméterekről beszélhetünk, ami részben a korszerűtlen fajtahasználattal magyarázható. A vágóhidak, feldolgozók hiánya miatt nem keletkezik az ágazatban hozzáadott érték.

Nábrádi és mtsai (2007), valamint *Kukovics és Jávor* (2009) is az alacsony hazai fogyasztásra utal, ami szintén a feldolgozók hiányára és a hiányos marketingre vezethető vissza.

Abayné és mtsai (2012) utal a Nemzeti Vidékstratégia 2012–2020 dokumentumra, amely kiemelt programként kezeli az állattenyésztést. Többek között előirányozza az állattenyésztés arányának növelését, és a feldolgozott formában történő exportértékesítést.

A juhlétszám stagnálása nem véletlen, az eredmény sok esetben még támogatással is negatív. *Cehla és Kukovics* (2011) is ezt erősíti meg, modellszámításuk jó esetben is (támogatással) csak 2 500 Ft/anya jövedelmet mutat. A támogatási lehetőségeket a gazdaságok csak részben tudják kihasználni (*Abayné és mtsai,* 2012).

Cehla (2011) az értékesítés időpontját, a szaporulati arányt és a fajtát tartja a jövedelem szempontjából legfontosabb tényezőnek. Vizsgálatai szerint a született bárányok éven belüli eloszlása húsvét – augusztus – karácsony között az 1 000 anyajuhtól kisebb méretű telepeken 45% - 29% - 36% volt, míg 1 000 anya feletti telepeknél 45% - 28% - 27% az optimális.

A keresztezés hústermelést növelő hatását többen vizsgálták. *Németh* et al. (2007) munkájukban magyar merinó x lacaune F_1 keresztezett anyák hústermelését értékelték és jelentős bárányszám növekedést regisztráltak. *Pajor és mtsai*. (2011) eredményei hasonlók. A legeltetés módja befolyásolja az anyajuhok szaporulati mutatóit és kondícióját. A szakaszos legeltetés jobb hatású a pásztoroló legeltetéshez képest, és az ikerbárányt ellő anyák aránya is növekszik (*Bedő és Póti*, 1999; *Póti és mtsai*, 2012).

A tenyésztésbe vételi idő és a sűrített elletés is jelentős hatást gyakorol az anyajuhok szaporulati mutatóira és az életteljesítményére (*Veress*, 1990). Az ivarzási szezonon kívül (április – május) csak ivarzás szinkronizálással érhetők el megfelelő termékenyülési eredmények, hasonlóan *Mucsi és Túri* (1988), valamint *Veress* (1990) közléseihez.

Nábrádi és mtsai. (2008) szerint nem csak az intenzív juhtartás lehet sikeres. Lehetséges tehát az extenzív tartási mód is hagyományos fajtákkal és jó minőségű termék-előállítással, ami az EU által elvárt táj- és környezetvédelmi feltételeknek is megfelel.

Anyag és módszer

Vizsgálatunk során az AKI tesztüzemi rendszerének a juhágazatra vonatkozó jövedelmezőségi mutatóit elemeztük különböző gazdasági formák esetén. Az adatok alapján modellszámítást végzünk az 1 anyára vonatkozó átlagos termelési értékre.
Korábbi kísérleteink eredményeit felhasználva vizsgáljuk az anyajuhok szaporasági mutatóit befolyásoló tényezőket. (keresztezés, termékenyítési időpont hatása, eltérő legeltetési mód hatása az anyák szaporulati mutatóira)

AKI adatok elemzése

Az anyatartás, báránynevelés – az AKI tesztüzemi rendszerének adatai szerint – hosszú ideje veszteséges (*1. ábra*).

***1. ábra*: Az anyajuhtartás, báránynevelés jövedelme egyéni és társas gazdaságban**



Forrás: saját összeállítás, AKI adatok alapján

Az országos átlag hasonlóan veszteséget mutat, és a meghatározó árutermelő gazdaságok esetében is csak a veszteség mértéke kisebb (*1. táblázat*).

***1. táblázat*: Az anyajuhtartás és báránynevelés ágazati eredménye**

	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Termelési érték Ft/anya	20558	19757	20546	19911	18187	18836	18952	19127	21605	20405	23394	23655	24020	23690
Termelési költség Ft/anya	21587	20716	20319	19719	22006	21349	23818	22599	25129	24612	25016	24272	25659	24403
Fedezeti hozzájárulás Ft/anya	4838	4669	5846	5717	1740	2965	1807	2763	3624	2512	6034	6346	5478	5316
Állami közvetlen támogatás Ft/anya	1251	1387	1256	1248	1781	1905	2248	2294	2567	2497	3051	2885	3285	3049
Ágazati eredmény Ft/anya	-1029	-960	227	192	-3819	-2513	-4866	-3472	-3524	-4207	-1622	-616	-1639	-714

a.) országos átlag
b) meghatározó árutermelő gazdaságok átlaga
Forrás: saját összeállítás, AKI adatok alapján

Tanulmányunkban elsősorban a szaporulat hatását vizsgáljuk a jövedelemre, mivel a gyenge eredmények főleg erre vezethetők vissza. Ezt a *2. táblázat* igazolja, hiszen az elmúlt 7

évben az éves átlagos állatlétszámra (anyajuh/üzem) vetített főtermék kibocsátás (bárány/üzem) rendkívül alacsony (*2. táblázat*).

***2. táblázat*: Átlagos ágazati méret* (anyajuh/üzem) és átlagos főtermék kibocsátás (bárány/üzem) az egyéni és társas gazdaságokban**

	egyéni		társas	
	ágazati méret	**főt. kib.**	**ágazati méret**	**főt. kib.**
2005.	136,02	141,07	549,28	559,24
2006.	119,75	129,09	461,36	601,63
2007.	131,67	124,07	362,88	380,80
2008.	125,34	118,99	279,42	279,18
2009.	205,40	222,67	192,53	189,07
2010.	108,32	109,69	260,06	299,76
2011.	102,41	93,41	1153,04	1085,43

* éves átlagos állatlétszámra vetítve

Forrás: saját összeállítás, AKI adatok alapján

A juhászatok jövedelmezősége a fajlagos (egy főre eső) hozamok növelése és a hasznosítások kombinációja révén fokozható. A jelenlegi gazdasági környezetben az anyáktól nyerhető bárányok száma a jövedelmet döntően meghatározza. Nem közömbös az értékesítés időpontja sem (karácsony, húsvét és augusztus második fele), mert a felvásárlási árak ekkor magasabbak, tehát az értékesítést az ünnepekre kell tervezni.

Az anyák hasznosítását illetően beszélhetünk extenzív, átmeneti és intenzív tartásról. A termelési mutatók jelentős javítása keresztezést is feltételez, a termelés eszközigényesebbé válik, az anyatartás drágul. Erre vonatkozóan végzünk modell számításokat, összevetjük az intenzívebb tartás okozta költségnövekedést, a hozam változásából származó gazdasági előnyökkel. A többletköltségek csak fegyelmezett termelésszervezés mellett térülnek meg, ha ez nem biztosított, a juhászati termelés hatékonysága nem valósul meg.

Intenzív termeléskor megnövekszik a szántóföldi takarmányok iránti igény, ilyenkor a más ágazatokból elvont, pótlólagos ráfordításoknak és a termőterület elmaradt hasznának is meg kell térülnie a juhászati bevételekből. A felsoroltak figyelembevétele és megvalósítása esetén is a juhászat csak a támogatások, és pályázati lehetőségek maximális kihasználásával lehet eredményes (*3. táblázat*).

***3. táblázat*: A juhászat átlagos termelési értéke 1 anyára vetítve, Ft**

Árbevétel	minimum	maximum
Bárány (750Ft/kg) 1,1/anya-1,6/anya 20 kg átlagtömeg	16 500	24 000
Gyapjú (4 kg)	960	960
Trágya (200 kg/anya)	4 000	4 000
Állami támogatás	3 000	3 500
Termelési érték összesen	24 460	32 460
Termelési költség összesen	25 500	27 500
Jövedelem	-1 040	4 960

Forrás: saját összeállítás

A modellszámítás a maximális árbevétel esetén jobb termelési színvonalat feltételez (1,6 bárány/anya) a lehetőségek jobb kihasználását valószínűsíti (3 500 Ft/anya támogatás) és így termelési költségnövekedést (intenzív tartás) is tartalmaz. Ez esetben is csak szerény jövedelemmel számolhatunk.

Saját vizsgálatok

A saját vizsgálatok három, korábban végrehajtott kísérlet eredményét mutatják be. Az *első kísérlet* a tenyésztésbe vételi idő és a sűrített elletés vizsgálatára irányult. A magyar merinó fajta, gyakorlatilag egész éven át termékenyíthető, mégsem használjuk ki ezt a lehetőséget, így a bárányszaporulat alacsony.

A kísérletben 1995. január 1. és 1995. február 10. között született magyar merinó jerkebárányok szerepeltek. A jerkéket 30-35 kg testsúly elérésekor 9,5–10,5 hónapos kor körül termékenyítették először. Az ekkor termékenyült jerkék (n=83) egyedei alkották az I. csoportot. Az éves kor körül nem kellően fejlett állatokat vagy először, vagy ismét termékenyítették, ezek alkották a II. csoportot (n=65).

Az első ellést követően mind a két csoport egyedei átlagosan 8 havonta ellettek, tartásuk és takarmányozásuk azonos módon történt. A tavasz végi termékenyítési szezonban (április – május) ivarzás szinkronizálást alkalmaztak. Az I. csoport első ellése alkalmával 1,02 volt az átlagos bárányszám, a második ellés alkalmával 1,36, amely közel azonos a II. csoport első elléskori bárányszámával (1,3). A további ellésenkénti átlagos bárányszám között alig volt különbség, az első csoportnál 1,37 $\pm$ 0,16, a II. csoportnál 1,38 $\pm$ 0,11 volt a bárányok száma. A vizsgálatok végeztekor (2004. október) az I. csoport egyedei tizennégyszer, a II. csoport egyedei tizenháromszor ellettek. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a magyar merinó jerkék 10-11 hónapos korban tenyésztésbe vehetők, és sűrítve (8 havonta) ellethetők, megfelelő felnevelési, tartási és takarmányozási körülmények között (*Nagy et al., 2005*).

A *második kísérlet* célja a keresztezett (magyar merinó x cigája F_1, magyar merinó x lacaune F_1) genotípusú, valamint fajtatiszta magyar merinó anyajuhok báránynevelő képességének értékelése volt. A vizsgálatot egy árutermelő gazdaságban végezték. Magyar merinó (n=20), valamint (magyar merinó x cigája) F_1 (n=20) és magyar merinó x lacaune) F_1 (n=20) keresztezett anyákat és bárányaikat vizsgálták.

Az anyákat magyar merinó fajtájú kosokkal termékenyítették 2007. évi őszi tenyészidőszakban. Egyedileg mérték a bárányok születési és választási súlyát, valamint kiszámították a bárányok választásig tartó napi súlygyarapodását. A bárányokat 60 napos korban választották. A (magyar merinó x lacaune) F_1 anyáknak volt a legtöbb ikerellése, valamint a legnagyobb szaporulati aránya. A keresztezett genotípusú anyajuhok bárányai választási súlyban, valamint választásig tartó időszakra vetített súlygyarapodásban szignifikánsan felülmúlták ($p < 0,05$) a fajtatiszta magyar merinó bárányokat. A legnagyobb egy anyára jutó értékesített alomsúlyt a (magyar merinó x lacaune) F_1 anyák érték el.

Megállapítható, hogy az értékesített alomsúly növelésére célszerű jó anyai tulajdonságokkal rendelkező fajtákat keresztezési partnerként használni (*Pajor és mtsai,* 2011).

A keresztezett anyák bárányai szignifikánsan jobban gyarapodtak, mint a magyar merinó bárányok. Ennek oka valószínűleg a keresztezett anyák nagyobb tejtermelése.

A *harmadik kísérlet,* különböző legeltetési módok (pásztoroló, illetve szakaszos) hatásának vizsgálatára irányult az anyajuhok kondícióját és szaporulati mutatóit értékelve két gazdaságban („A" és „B").

Vizsgálatra került továbbá, két eltérő termékenyítési időszak hatása az anyajuhok szaporaságára az egyik tenyészetben („B"). A legeltetési vizsgálat során, mindkét gazdaságban, azonos nagyságú (120 ha) legelőterületet osztottak két egyenlő részre (60-60 ha) , az egyiket pásztorolva, a másikat szakaszosan legeltették, gazdaságonként 180 magyar merinó anyajuhval. A legeltetési időszakban vizsgálták az anyajuhok kondícióját, majd miután az anyák júniusban termékenyítésre kerültek, értékelték az egyes szaporasági mutatókat. A „B" gazdaságban ezen kívül a nyári és az őszi termékenyítési időszakok szaporaságra gyakorolt hatását is értékelték. Az anyajuhok kondíciója a szakaszos legeltetés alkalmazása esetén bizonyult kedvezőbbnek. A szakaszos legeltetés alkalmazása 5-10%-kal növelte az anyák kondíció pontszámát a legeltetési időszak alatt, továbbá, mindként gazdaságban, az ikerbárányt ellő anyák aránya jelentősen növekedett, a pásztorolva legeltetett anyákéhoz viszonyítva (*Póti és mtsai,* 2012).

Következtetés és javaslatok

A juhtermelés hazánkban, főleg az alacsony bárányszaporulat miatt nem kielégítő. Az ágazat még támogatással is hosszú ideje veszteséges. Modellszámításunk szerint 1,6 bárány/anya és megfelelő tartás esetén szerény jövedelem elérhető. A korai tenyésztésbevétel és a sűrített elletés javasolható, valamint a lacaune fajta keresztezésbe vonása. A tartásmód vizsgálatánál a szakaszos legeltetési mód javítja az anyák kondícióját és növeli az ikerbárányt ellő anyák arányát.

Irodalomjegyzék

Abayné Hamar E., Szabóné Pap H., Marselek S. (2012): Támogatások a juhtenyésztésben. XXXIV. Óvári Tudományos Nap, Mosonmagyaróvár, 131-137.

Bedő S., Póti P. (1999): A legelő, mint takarmány szerepe a juhtenyésztésben. Állattenyésztés és Takarmányozás, 48. 690-692.

Béládi K., Kertész R. (2005): A tesztüzemek főbb ágazatainak költség- és jövedelemhelyzete 2004-ben. AKI Kiadvány, 4. 1-230.

Béládi K., Kertész R. (2009): A főbb mezőgazdasági ágazatok költség- és jövedelemhelyzete a tesztüzemek adatai alapján 2009-ben. AKI Kiadvány, 4. 1-161.

Béládi K., Kertész R. (2011): A főbb mezőgazdasági ágazatok költség- és jövedelemhelyzete 2011. AKI Kiadvány, 1-141.

Cehla B. (2011): A hazai juhágazat hústermelési tartalékainak feltárása. PhD értekezés Debrecen, 1-163.

Cehla B., Kukovics S. (2011): A juhtartó gazdaságok által igénybevett támogatások nagysága és tendenciái 2004-2009 között. I. Magyar Juhászat, 20. 3. 2-8.

Kukovics S., Jávor A. (2009): A juhágazat stratégiai kutatási terve. In: Kukovics S. – Jávor A. (szerk.) A juhágazat stratégiai kutatási terve. JUHINNOV Platform. K-OVI-CAP Bt., Érd, 2009. 317-343.

Mucsi I., Túri L. (1988): Ivarzás-szinkronizált juhok vemhességi ideje. Állattenyésztés és Takarmányozás, 37. 5. 432-439.

Nagy L., Póti P., Pajor F., Láczó E. (2005): Anyajuhok szaporulati mutatóinak alakulása és azok életteljesítményre gyakorolt hatása a tenyésztésbe vételi idő és a sűrített elletés függvényében. Állattenyésztés és Takarmányozás, 54. 3. 265-271.

Nábrádi A., Ficzeréné Nagymihály K., Abayné Hamar E. (2008): A juhászat fejlődéskövető vizsgálata Heves megye egyes gazdaságaiban. XI. Nemzetközi Tudományos Napok, Gyöngyös, I. kötet, 367-375.

Nábrádi A., Jávor A., Madai H. (2007): A juhágazat helyzete, kilátásai és fejlesztési lehetőségei. Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, Debrecen, 2007, 149.

Németh A., Mihályfi S., Salamon I. Gergátz E., Gulyás L. (2007): A lacaune juhfajta szerepe a magyar juhágazat versenyképességének javításában. AVA3 – Agrárgazdaság, Vidékfejlesztés és Informatika, Nemzetközi Konferencia, március 20-21.

Pajor F., Borbély M., Póti P. (2011): Genotípus hatása az anyajuhok báránynevelő képességére. Állattenyésztés és Takarmányozás, 61. 1. 21-28.

Póti P., Pajor F., Tőzsér J. (2012): Legeltetési és anyajuh használati módok hatása az anyajuhok néhány termelési tulajdonságára. Állattenyésztés és Takarmányozás, 61. 3. 279-284.

Veress L. (1990): A juhok sűrített elletésének néhány biológiai és genetikai összefüggése. Tessedik Sámuel Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, DATE MTK, Debrecen

A MAGAS LAKTÁCIÓS TERMELÉS KULCSA A ZAVARTALAN ELLÉS KÖRÜLI IDŐSZAK

Alföldi László, André Gergely, Süpek Zoltán
alfoldi@holstein-genetika.hu

Összefoglalás

Az ellés körüli időszak problémamentessége alapjaiban határozza meg az adott laktációban termelt tej mennyiségét, és az újravemhesülés esélyét. Az ellés óriási trauma a tehén szervezetének, hatalmas kihívás a szervezet számára. Az ellés utáni időszakban fontos az étvágy, az energia-ellátottság, a kálcium-ellátottság, valamint a szervezet folyadékháztartásának visszaállítása. Ha nem optimálisak a körülmények, súlyos problémák léphetnek fel, amelyekre fokozott figyelmet kell fordítani:

Ellési bénulás

Az ellési bénulás tipikusan ún. hiperprodukciós betegség. Nagy tejtermelésű és a takarmányozásra igényesebb egyedeknél gyakoribb. ahogy minden anyagforgalmi betegség. A tartás, takarmányozás változásával, intenzívebbé válásával egyébként is nőtt az ellési bénulásos megbetegedések száma. Egyre gyakoribb, hogy nem önállóan, hanem más anyagforgalmi zavarokhoz (pl. zsírmobilizációs betegség) társulva jelentkezik.
Fő ok a szervezet kalciumzavara, de kóroktana összetett, több tényező együttes hatása érvényesül.

De mi okozza elléskor a nagymérvű vérkálciumszint-csökkenést?
- Szerepet játszhat az állat elégtelen kálcium-ellátása
- Romolhat a kálcium felszívódása, értékesülése az életkor előrehaladtával, ezért is gyakoribb az ellési bénulás a 3-4. ellés után.
- Az optimálistól eltérő kálcium: foszfor arány és hiányos D3-vitaminnal való ellátottság
- Az elléskori vérkálcium-csökkenés oka a fejéskor tejjel távozó, hirtelen és **nagymérvű kálciumvesztés.**
- A betegségből kigyógyult állatok visszaesése a következő ellésnél valószínűbb.

Tünetei, amikre figyelni kell

Az étvágytalanság, a nehézkes mozgás, a kissé behajlított csánkkal történő bizonytalan lépkedés, nyugtalanság, izomremegés, a fej és a végtagok izmainak meg-megrándulása, gyengébb rángógörcse. Jellemző a farok gyakori emelgetése bélsárürítés nélkül is, bár a bélsárürítések száma megnő. A bendőmozgások gyengék vagy hiányoznak. A kezdeti szakaszban sok tehén először bágyadt, csak később válik ingerlékenyebbé. A gyengeség fokozódik, az állat támolyog, majd lefekszik. Az oldalán fekvő tehén fejét hátraveti, hátulsó lábait mereven kinyújtja, légzése erőltetett, nehezített, nyála gyakran csorog, többször is felállni igyekszik, de eredménytelenül. Ha ilyenkor hőmérsékletet mérünk, azt látjuk, hogy az normális, legfeljebb egy-két tizedfokkal alacsonyabb annál.
Két irányba mehet tovább a probléma: ez az állapot pár órán belül magától megszűnik, vagy a súlyosabb második szakaszba megy át. Utóbbi gyakoribb. A tehén most már a szegycsontján, hason fekszik, fejét oldalra, lapockájára hajtja, orrával az alomra támaszkodik. Ha fejét megemeljük, az szinte "élettelenül", tehetetlenül, tartás nélkül esik vissza. Szemhéja lóg, a szem

csak félig, vagy addig sem nyitott, a pupilla kitágult. A szutyak száraz, a bőr - különösen a tőgy bőre - hűvös, szinte hideg, a végbélben mért hőmérséklet a normális alatti. Az állat légzése nehezített, gyakran nyögés kíséri azt. A keringési zavar jelei egyre kifejezettebbek: petyhüdt a tőgy bőre, a szutyak halványkékes-színű, gyakori a felfúvódás is, mely egyre kifejezettebb.
További súlyosbodásnál kialakul a teljes bódulat. A tehén nyújtott lábakkal, hátraszegett fejjel az oldalán fekszik, a petyhüdt bénulás most már szembetűnő. Nyitott szájából nyelve kilóg, nemcsak nyála, de gyakran bendőfolyadék is csorog, a bőr még hidegebb, a keringési zavar fokozottabb, a testhőmérséklet tovább csökken (35,5 - 37 ^{o}C). A nehezített légzést sípoló hang kíséri. A remegő, "hidegen is izzadó", bódult állat ebben az állapotában néhány órán belül elpusztulhat.

Ketózis

A ketózis a tejelő tehenek szénhidrát- és zsíranyagforgalmi betegsége. A ketózisra jellemző a vércukorszint csökkenése és a ketonanyagok (aceton, acet-ecetsav, vajsav) vérbeni szintjének fokozódása. A ketonanyagok a vizelettel és tejjel ürülnek, ezért a ketózis megállapításához segítséget nyújt a helyszínen is elvégezhető pH-mérés vizeletből.

Mi okozza a ketózist?

A szervezet szénhidrát- és zsírforgalmának zavara, melyben takarmányozási hibák, az ellés és alkati hajlam játszanak szerepet, de kialakulásához más tényezők is hozzájárulnak.
A nagy termelésű tehén ellés után energiahiányos állapotba kerül, mert a gyorsan növekvő tejtermelés és az életfenntartás energiaszükségletét még kifogástalan takarmányozás mellett is csak saját testanyagainak, zsírraktárainak lebontásával tudja kielégíteni. (Ellés után naponta 1,5 kg-ot, összesen 60 kg-ot fogyhat a tehén.) Az energiahiány tovább nő, ha bármely ok miatt a szükségesnél kevesebb takarmányt, főként kevesebb szénhidrátot vesz fel az állat.
Különösen nagy probléma, ha a takarmányadag energiában hiányos, ugyanakkor fehérjében gazdag. Az ilyen takarmány etetése eredményeként nő a szénhidrát-forgalom zavara, a kérődzők élettanilag is alacsony vércukorszintjének további csökkenése, a máj feltűnő elzsírosodása, a normális körülmények között is keletkező ketonanyagok felhasználása, kiürülése, az egyensúly megbomlása következik be. A ketonanyagok nagy része a vizelettel kiürül, kisebbik részét a szervezet energiaforrásként hasznosítja. Ezért a szervezet azokat egy ideig "tolerálni" képes, de csak ideig-óráig, mert lebontásuk korlátozott.

A szárazonállás alatti elhízás szintén betegségre hajlamosít, mert az ellés utáni zsírlebontás itt nagyobb mértékű, a zsírok mozgósítása pedig meggyorsítja a ketonanyagok képződését (a zsírmobilizációs betegség és a ketózis azonos ok miatt jön létre).

Más hajlamosító tényezők: mozgáshiány, stressz-hatások, különböző alapbetegségek, pl.: tőgygyulladás, méhgyulladás, étvágytalansággal járó betegségek, lázas megbetegedések, ellési bénulás, stb. (másodlagos ketózis).

Melyek a ketózis tünetei?

A ketonanyagok jelentős felszaporodása a szervezetben izgalmi tüneteket, súlyosfokú "tudatzavart", kómát okoz. A kép azonban nem ilyen egyszerű! A klinikai tünetek függenek a felhalmozódás mértékétől, a betegség formájától (emésztőszervi, idegrendszeri), attól is, hogy elsődleges vagy másodlagos ketózisról van szó. Típusos esetekben a nagytejű tehén 3-4. ellése után, az ellést követő 6 héten belül, rendszerint a 2-3. héten alakul ki. Az állatok gyorsan soványodnak, mert kezdetben az étvágycsökkenés, előgyomor-renyheség nem jár a tejtermelés lényeges csökkenésével (egy hét alatt akár 50 kg-ot is fogyhat!).

A bélsár száraz és sötét színű, a vizeletürítés gyakoribb, a bőr rugalmatlan, a has felhúzott, az állat igen bágyadt, sokat áll, keveset fekszik, lehelete "émelyítően édeskés". Ezeknél a tüneteknél

persze már a tejtermelés is jelentősen lecsökken. Az emésztőszervi forma néha minden gyógykezelés nélkül is javulni kezd, de a betegség súlyosbodásával megjelennek az idegrendszeri tünetek.

Az idegrendszeri formát mérsékelt izgalmi tünetek vezetik be: evési-ivási rendellenességek (a vizet "harapja", szutyakját hosszabb ideig az itatóedénybe nyomja, a takarmányt nem a nyelvével "kanyarintja", hanem kutya-módon eszi), élénk a szem- és fülmozgása, fokozottan figyel a környezet ingereire, ezekre ijedtséggel válaszol. Máskor az izgalmi tüneteket tompultság, bágyadtság váltja fel, gyakran a kettő keveredik. Jellemző lehet, hogy az állat megszokott gondozójának, gazdájának közeledtére idegesen topog, a jászolba ugrik vagy kötelékéből elszabadulni igyekszik, sőt az izgatottság egészen a dühöngésig fokozódhat. A "tompult" periódusokban félig lehunyt szemmel, fejét a vályúnak támasztva áll, de egyre gyakoribbak a rángó- és merevgörcsök, majd végül bódult állapot alakul ki. Az állat nem lázas, az idegrendszeri formánál gyakori a hasmenés, a bélsár okkersárga színű.

A ketózisos kómás állapot megjelenésében semmiben sem különbözik az ellési bénulástól.

Diagnosztikai értékű lehet az, hogy a beteg állat édeskés acetonszaga olyan erős, hogy már az istállóba lépéskor érezhető. Ilyenkor az izzadság, a hüvelyváladék, sőt a tej is acetonszagú.

A mérsékelt ketonszint-emelkedés gyakran nem is jár klinikai tünetekkel, de ha hosszabb ideig tart, az állat lesoványodik és a tejtermelés csökken. Az ilyen tehénnél gyakoribbak a szaporodási zavarok (pl. a meddőség) és az ellés utáni problémák (elhúzódó involúció, magzatburok-visszatartás, méhgyulladás, tőgygyulladás, stb.). Az enyhébb esetek beavatkozás nélkül is gyógyulhatnak, de - ellentétben a zsírmobilizációs betegséggel - az időben és szakszerűen végzett terápia még a kómában lévő teheneken is segít. A beteg sorsa jórészt attól függ, milyen mérvű a máj elzsírosodása. Jellemző azonban a tejtermelés csökkenése és a hosszan tartó lesoványodás miatti selejtezés.

A cél a megelőzés!!

- Az ellés körüli időben kerüljük a stresszhatásokat! Az idősebb, sok tejet termelő vagy olyan tehén ellését, mely korábban már átesett a betegségen, fokozott figyelemmel kövessük!
- A szárazonállás idején ügyeljünk a megfelelő Ca:P arányra, az közelítsen az 1:1-hez! Kerüljük a vemhesség alatti elhízást tehenünknél, mert - ahogy láttuk - a zsírmobilizációs betegség segíti és súlyosbítja az ellési bénulás kialakulását és lefolyását!
- Különösen kerüljük a szárazonállás alatti elhízást!
- Az abrakhoz szoktatás fokozatos legyen (ellés előtt 2-3 héttel kezdjük)!
- Az ellés körüli időben kerüljük a hirtelen takarmányváltást!
- Kerüljük az ellés utáni nagy energiahiány kialakulását;: szénhidrátokban gazdag takarmányt etessünk (fehérje-szénhidrát arány: 1:5-6), jó minőségű széna legyen az állat előtt!
- A frissen ellett tehénnel itassunk meg 20-25 liter langyos vízben feloldott YMCP drench italt!

Az YMCP előnyei

- az ellés után beindítja a bendőt, javítja az étvágyat
- segít az ellési bénulás megelőzésében, valamint adható az infúziós kezelés mellett vagy helyett
- segít a ketózis megelőzésében, valamint kezelésében
- csökkenti a magzatburok-visszatartás, és
- az oltógyomor áthelyeződés kialakulásának kockázatát.
- segít a sejtregenerációban valamint, a vízháztartás visszaállításában
- kevesebb lesz az anyagforgalmi betegség miatti selejtezés.

Az YMCP összetétele úgy lett kialakítva, hogy a kezelést követő 24 órában a szükséges energia- és kálciumellátást feltétlenül biztosítja!

Az YMCP a következő fő alkotóelemekből áll

Elekrolitok

- kálium-klorid
- nátrium-klorid
- nátrium-bikarbonát
- magnézium
- foszfor
- betain

4 féle (!) kálciumforrás

- calcium-karbonát
- kálcium-propionát
- trikálcium-foszfát
- calcium-laktát

Mikroelem

cink-kelát

5 féle (!) energiaforrás

- dextróz
- szaharóz
- fruktóz
- laktóz
- propilén-glikol

Vitaminok

- A-, D-, E-vitamin
- B-vitamin komplex
- aszkorbinsav
- niacin (nikotinsav)

Élő flóra

- Saccharomyces cerevisae
- Aspergillus Oryzae

Az YMCP itatható azonnal ellés után (*1. kép*) vagy a termelő istállóban. A kezelés történhet drench-pumpával is (*2-3.kép*).



1. kép



2. kép



3. kép

BIOSZENZOR ZEBRADÁNIÓ VONAL PAJZSMIRIGY MŰKÖDÉST ZAVARÓ ANYAGOK MONITOROZÁSÁRA

Bakos Katalin[1], Fetter Éva[2], Csenki Zsolt[1], Kovács Róbert[1], Csepeli Andrea[1], Reining Márta[1], Kovács Balázs[1], Urbányi Béla[1], Stefan Scholtz[2]

[1]Szent István Egyetem, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
[2]Department of Bioanalytical Ecotoxicology, UFZ
Permoserstraβe 15, 04318 Lipcse, Németország
Bakos.Katalin@mkk.szie.hu

Összefoglaló

A civilizáció fejlődésével egyre többféle vegyi anyag jut a környezetbe, amelyek közül számos vegyület hatását még nem, vagy csak kevéssé ismerjük. Több nagy mennyiségben kijutó, hormonháztartást megzavaró anyag is található közöttük, amelyek egy része káros hatással van a pajzsmirigy működésére (goitrogén). A hormonhatású anyagok csoportja kémiai szempontból meglehetősen diverz, ezért csupán a kémiai szerkezet alapján elég nehéz megjósolni egy anyag valós hatásait. A hormonhatás legjobb megközelítéssel élő szervezetekben mutatható ki. A zebradánió (*Danio rerio*) napjainkban egyre népszerűbb modellállat a toxikológiai vizsgálatok során. Genetikai háttere és élettani folyamatainak nagy része nagy hasonlóságot mutat más gerincesekével, az emlősökkel és az emberrel egyaránt. A zebradánió embriók áttetszőek, ezért a fluorescens fehérjékkel létrehozott transzgenikus vonalak jól használhatók a toxikus anyagok vizsgálatában, különösen ha a fluoreszcens jel megjelenése hormonhatással indukálható.
Munkánk során pajzsmirigy zavaró hormonhatású anyagok kimutatására alkalmas zebradánió vonalak kialakítását tűztük ki célul. A pajzsmirigy vagy annak szabályozásában fontos szerepet betöltő, specifikus expressziót mutató gének közül a nátrium-jodid szimporter (slc5a5) és a tireoperoxidáz (tpo) géneket választottuk a transzgenikus vonalak kialakításához, mivel azok promóter régiója pajzsmirigy zavaró anyagokkal indukálható. A gének működését molekuláris módszerekkel validáltuk, majd promóter régiójukkal létrehoztuk a vonalak kialakításához szükséges génkonstrukciókat. A génkonstrukciókat 1-2 sejtes zebradánió embriókba injektáltuk, majd megkezdtük a fluoreszcens fehérje kifejeződésének vizsgálatát különböző, pajzsmirigy zavaró anyagok hatására.
Kulcsszavak: zebradánió (*Danio rerio*), pajzsmirigy, goitrogén anyag, bioszenzor

Biosensor zebrafish for monitoring thyroid disruption

Abstract

As civilization advances, more and more chemicals are released to the environment. The effect of some of these is unknown or scarecly known. Among the released chemicals some are produced in large amounts and are able to interfere with the hormone system, so can disrupt thyroid functions. The group of endocrine disrupting compounds is chemically highly diverse, so hormonal effect can hardly be told on the basis of chemical structure. One of the best approaches to study these effects is to use model organism-based tests. Zebrafish (*Danio rerio*) is currently

more and more popular in toxicology. Its genetic background and physiological processes are highly similar to those of other vertebrates, mammalians and humans. Moreover, zebrafish embryos are transparent, so transgenic fish expressing fluorescent proteins are valuable tools in toxicological studies, especially if the expression of the reporter is inducible by hormonal substances.
The aim of the presented work is to establish zebrafish lines for the detection of thyroid disruptive agents. From the thyroid specific genes important in thyroid functions or their regulation, sodium-iodide symporter (*slc5a5*) and thyroid-peroxidase (*tpo*) were selected for the development of the lines, as their promoter region is inducible by thyroid active substances. The expression of these genes were validated by molecular methods, then gene cosntructs were built with their promoter regions. Constructs were injected into 1-2 cell zebrafish embryos. Induction of the fluorescent signal was started to be tested by thyroid disruptive chemicals.
Keywords: zebrafish: (*Danio rerio*), thyroid, goitrogen, biosensor

Irodalmi áttekintés

A környezetbe kerülő hormonhatású anyagok kémiai szempontból nagy diverzitást mutatnak, így egy környezeti minta kémiai összetétele alapján nem lehet eldönteni, hogy az adott közeg hormonhatású-e. A hatás biztos megállapításához biológiai alapon működő tesztrendszerek szükségesek. Az elmúlt évtizedben számos hormonhatás vizsgálatára alkalmas *in vitro* és *in vivo* tesztrendszert dolgoztak ki. Az *in vivo* tesztrendszerek közül a bioszenzor zebradánió vonalak kiemelkedő fontosságúak. Szerveik és azok működése valamint az egyes folyamatok élettani és molekuláris háttere nagy mértékű hasonlóságot mutat az emlősökével és az emberével. A zebradánió ezért amellett, hogy hatékony modell az ökotoxikológiai vizsgálatokban, segítségével az egyes anyagok vagy minták emberben kialakuló esetleges hatásai is megjósolhatók. A zebradánió embriók áttetszőek, ezért a fluoreszcens fehérjékkel és hormonhatású anyagokra érzékeny promóter régiókkal létrehozott vonalak hatékony bioszenzornak bizonyultak a hormonhatás vizsgálatában (*Scholtz és mtsai*, 2008).

A pajzsmirigy működése klasszikus neuroendokrin szabályozás alatt áll. A hipotalamusz által termelt tirotróp hormonok hatására tiroid stimuláló hormon (TSH) termelődik, amely a pajzsmirigyben tiroid hormonok (TH) termelődését és szekrécióját idézi elő a pajzsmirigy funkcionális egységeiben, a follikulusokban. A follikulusok a zebradánióban az emlősöktől eltérő módon nem egy jól körülhatárolható szervben, hanem elszórtan helyezkednek el a hasi oldalon, azok szöveti felépítése azonban megegyezik a magasabbrendű gerincesekével. Az aktív tiroid hormonok (tiroxin: T4, trijódtrionin: T3) szintén a magasabbrendűektől eltérő módon egy közös prekurzorból, a tiroglobulinból (tg) jönnek létre. A hormonszintézis első lépéseként a follikuláris sejtek jódot vesznek fel a nátrium-jodid szimporteren (nis) és a nátriumfüggetlen klór-jód transzporteren (pendrin) keresztül. A bejutott jódot a tireoperoxidáz (tpo) oxidálja, majd két jódozott tirozin összekapcsolódásával T3 és T4 jön létre.

Goitrogén anyagok kimutatására Jin és munkatársai a közelmúltban (2012) a pajzsmirigy stimmuláló hormon ß alegységével hoztak létre egy transzgenikus zebradánió vonalat (*TSH β:EGFP*), amely hipofízisében zöld fluoreszcens fehérje termelődik. A fluoreszcens jel pajzsmirigyműködést megzavaró anyagok hatására fokozódik, azonban a vonal nem bizonyult elegendően érzékenynek környezeti minták vizsgálatára (*Jin és mtsai,* 2012).
Munkánk célja goitrogén anyagok kimutatására alkalmas, érzékeny bioszenzor zebradánió vonal(ak) létrehozása volt, amelyhez a pajzsmirigyműködés vagy annak szabályozásában fontos

szerepet betöltő, specifikus expressziót mutató gének közül a tiroglobulin (tg), a nátrium-jodid szimporter (slc5a5) és a tireoperoxidáz (tpo) géneket választottuk.

Anyag és módszer

Felhasznált állatok

A kísérleteket zebradánió (*Danio rerio*) halfaj vad típusú vonalán végeztük.

Embriók kezelése, génkifejeződés vizsgálatok

Az embriókat 0,01; 0,25; 0,5; 0,75 és 1mM metimazollal (MMI) valamint 0,01; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mM kálium-perkloráttal ($KClO_4$) kezeltük, 48-120 órás korig. Negatív kontrollként izo vizet használtunk, amelynek összetétele megegyezett a haltartó rendszer vizével.

Kezelésenként harminc, három független kísérletből származó embrióból trizol módszerrel RNS-t izoláltunk, majd a létrehozott cDNS mintákban kvantitatív valós idejű PCR reakcióval vizsgáltuk a tg, az slc5a5 és a tpo gének kifejeződését, amelyet házztartási gén kifejeződéséhez (gapdh) viszonyítottunk és az eredényeket a PCR reakciók hatékonyságával korrigáltuk. A vizsgálatokat Step-One Plus készülékben végeztük (Applied Biosystems).

A gének kifejeződésének helyét whole mount in situ hibridizációval vizsgáltuk, *Thysse és Thysse* (2008) zebradánió embriókra kidolgozott protokollja szerint. A tg esetén egy 914 bp, az slc5a5 génnél egy 595 bp, a tpo esetén pedig egy730 bp hosszúságú próbát használtunk.

Transzgén konstrukciók létrehozása, injektálása, tranziens expressziós vizsgálatok

A génkonstrukciók létrehozásához a tpo és az slc5a5 géneket választottuk, amelyek feltételezett promóter régióját (~ 3500 bp) felsokszoroztuk. A szakaszokat Gateway technikával donor vektorokba, majd a végső, Tol2 karokat hordozó célvektorba klónoztuk. A célvektor korábbi kísérletek eredményeként már hordozta a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt (mCherry). A létrehozott konstrukciókat transzpozáz mRNS-sel együtt mikroinjektálással 1-2 sejtes zebradánió embriók szikállományába juttatuk. Az embriókat 1-10 napos (dpf: days post fertilization) korig 1mM $KClO_4$ és MMI oldatokkal kezeltük. A fluoreszcens jel megjelenését 4, 5, 6 és 10 napos korban vizsgáltuk mCherry szűrő alkalmazásával (LEICA MZ16FA).

Eredmények

A goitrogén anyagokra érzékeny bioszenzor vonal létrehozásához kiválasztott gének kifejeződését a génkonstrukciók megtervezése előtt két módszerrel ellenőriztük kontroll és a tpo és a nis gének működését gátló anyagok teratogén hatást kiváltó koncentrációk alá eső oldataival kezelt zebradánió lárvákban. A funkció gátlását a szervezet az adott gén működésének fokozásával igyekszik kompenzálni. Mind a három vizsgált gén esetében koncentrációfüggő módon nőtt a génkifejeződés mértéke (*1. ábra*), amelyek alapján két gén, az slc5a5 és a tpo tűnt megfelelőnek a konstrukció létrehozásához.

1. *ábra*: A nátrium-jodid szipmorter (slc5a5), a tireoperoxidáz (tpo) és a tiroglobulin gén (tg) kifejeződésének vizsgálata különböző koncentrációjú metimazol és kálium-perklorát hatására.

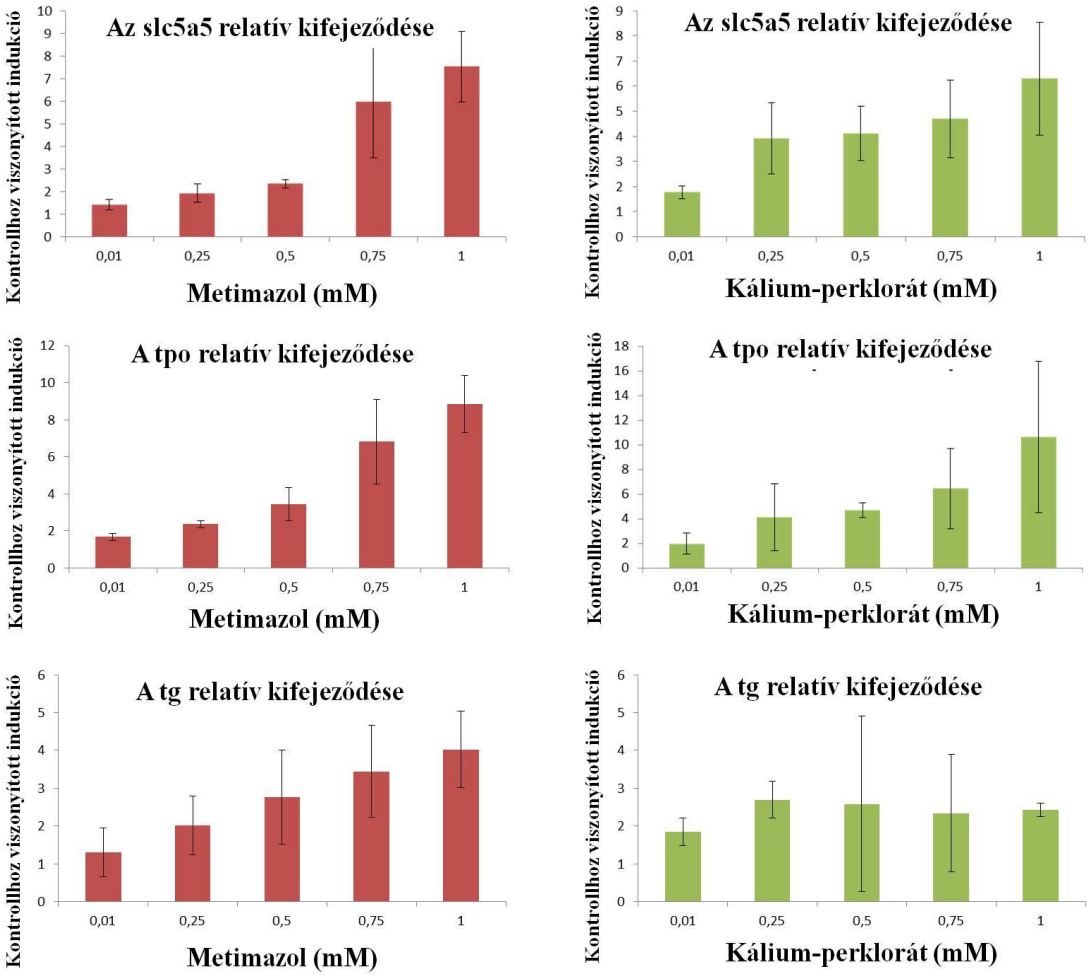


Figure 1. Relative expression of the sodium-iodide symporter (slc5a5), thyreoperoxidase (tpo) and thyroglobuline (tg) following methimazole and potassium perchlorate treatment.

A kiválasztott génjelöltek indukálhatósága mellett a kifejeződés helyét is vizsgálnunk kellett, hogy azt később összevethessük a fluoreszcens jel kifejeződési helyével a génkonstrukciókkal injektált halakban. A whole-mount in situ hibridizáció eredményei alapján megállapítottuk, hogy a három vizsgált gén kifejeződési területe átfed, és kifejeződésük indukálható (*2. ábra*).

***2. ábra:* Az slc5a5, tpo és tg gének kifejeződése 5 napos kezeletlen (A) és 1mM kálium-perkloráttal kezelt (B és C) zebradánió embriókban.**

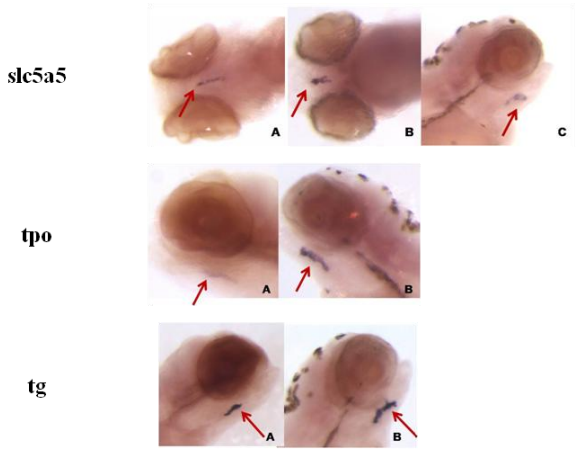


Figure 2. Expression pattern of slc5a5, tpo and tg in 5 dpf (days post fertilization) control (A) and 1mM potassium-perchlorate treated (B and C) zebrafish embryos.

Az eredmények alapján látható volt, hogy a tg alapszintű kifejeződése jóval erősebb és kevésbé indukálható, mint a másik két gén, ezért kevésbé alkalmas a transzgenikus vonal létrehozásához. A génkonstrukciókba a tpo és az slc5a5 gének feltételezett promóter régióját építettük. A konstrukciókat vad típusú zebradánió embriókba injektáltuk, majd a transzgén expresszióját indukáltuk. A tpo esetében csak nagyon gyenge tranziens jelet figyeltük meg, az slc5a5 esetén azonban meglehetősen erős tranziens jelet kaptunk mindhárom anyaggal végzett indukciót követően, azonos területen, a máj fölött. Néhány 4 napos lárvában pajzsmirigy jellegű, pontszerű expressziót is megfigyeltünk.
A máj fölötti expressziót mutató terület azonosítása folyamatban van, de elképzelhető, hogy a szignál a későbbi fejlődési stádiumokban vagy generációkban már nem lesz megfigyelhető.

Köszönetnyilvánítás
A munka Magyar-Német Projektalapú Kutatócserék (DAAD 29836) és Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatásával készül.

Irodalomjegyzék

Ji, C., Jin, X., He, J., Yin, Z. (2012): Use of TSHβ:EGFP transgenic zebrafish as a rapid in vivo model for assessing thyroid-disrupting chemicals. Toxicol. Appl. Pharmacol., 262. 2. 149-155.

Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environ Sci Pollut Res, 15. 394–404.

Thysse C., Thysse B. (2008): High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nature Protocols, 3. 1. 59-69.

TEJ ALAPÚ HIGÍTÓK ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE NYÚL SPERMA MÉLYHŰTÉSÉNÉL

Balogh Laura[1], Kerekes Andrea[2], Debnár Viktória[1], Ray Krisztina[1], Bodó Szilárd[1,2]

1. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
2. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
2100 Gödöllő Szent-Györgyi A. u. 4
bodo.szilard@gmail.com

Összefoglalás

Napjainkra a mesterséges termékenyítés jelentős szerepet játszik a nyúltenyésztésben. A tenyésztők általában friss, vagy hűtött szaporítóanyaggal termékenyítenek, azonban néhány különleges esetben mélyhűtött spermát is felhasználnak. Veszélyeztetett fajták, vagy transzgénikus nyúlvonalak ex situ génmegőrzéséhez gamétabankokat hozhatunk létre. A spermabankok gyakorlati alkalmazásához megbízható mélyhűtési technológiát kell kialakítanunk. A hagyományos mélyhűtési protokollok tojássárgája alapú spermahígítók használatát javasolják. Habár ezen oldatok szűrésével és az antibiotikumok használatával a bakteriális fertőzés megelőzhető, a tojássárgája helyettesítésére kereskedelmi forgalomban kapható csíramentesített fogyasztási tejféléket (ESL, UHT tej) kívántunk kipróbálni egy aszeptikus hígító létrehozásához. Kísérleteinkben a spermiumok túlélési- valamint a termékenyítőképes sejtek arányát a műszalmák felolvasztását követően vizsgáltuk.
Kulcsszavak: sperma mélyhűtés, nyúl, spermabank

Applicability of milk based diluters for cryopreservation of rabbit sperm

Abstract

Because of several advantages, the artificial insemination (AI) becomes an important method of the practice of rabbit breeding. Usually, the breeders use fresh or cooled semen for insemination, but in some special cases cryopreserved semen is applied. It is possible to create a gamete bank for ex situ genetic conservation of an endangered breed or transgenic rabbit lines using cryopreserved semen samples. For the practical application of sperm banking we have to develop a reliable cryopreservation technique. The advice of a conventional cryoprotocol is to use egg yolk based semen diluters. Although filtering and using antibiotics mainly prevents them from bacterial contaminations, we wanted to try using some routinely sterilized, commercial milk (ESL, UHT milk) for replacing egg yolk to create an aseptic diluter. We studied the rate of survival and fertility of sperm treated by different diluters after thawing of the cryopreserved staws.
Keywords: sperm cryopreservation, rabbit, spermbank

Bevezetés

A mesterséges termékenyítés gyakorlata akárcsak néhány intenzív nyúltenyésztéssel foglalkozó európai országban, a magyarországi nyúltenyésztők körében is egyre jobban elterjedt (*Mocé és mtsai, 2003*). Az eljárás előnye, hogy a természetes pároztatás esetén felmerülő állategészségügyi kockázatok mérsékelhetők, a termékenyítéshez az apaállatok száma csökkenthető, s ennek révén a nagyobb szelekciós intenzitás mellett a genetikai előrehaladás is növelhető. A nyúltenyésztők napi gyakorlatában általánosan a 10-20-szorosára higított friss spermával történő termékenyítést alkalmazzák (*Szendrő, 2004*), a mélyhűtésből származó felolvasztott spermával való termékenyítés azonban nem elterjedt eljárás.

Az ex situ génmegőrzés számára a termékenyítőképes szaporítóanyag hosszú távú eltárolása elengedhetetlen. A spermabankok kialakítása transzgénikus állatmodellek kialakítása esetén is nagy szerepet játszik, hiszen a genetikailag módosított vonalak in situ fenntartása mellett a hasznosítás időleges módja miatt a genetikai anyag gamétabankokban történő tárolása jelentősen csökkentheti a vonalfenntartás költségeit. Lényeges szempont, hogy a mélyhűtéssel történő tárolás során a termékenyítőanyag a termékenyítőképességét megőrizze. Ezt többek között a spermiumok mozgékonyságával, motilitásával jellemezhető élő állapot és a sejtek akroszóma membránjának épsége biztosítja. A spermaértékelés gyakorlata a sejtek életképességére irányul, amit viabilitási festéssel illetve motilitás vizsgálattal (szubjektív vagy számítógép segítette spermaértékelési módszer) határoznak meg. A mélyhűtési eljárás gyakorisága és fontossága ellenére a mélyhűtött nyúlspermiumok túlélési aránya ritkán 30% körüli, ami a sikeres termékenyülés feltétele. A spermabankok gyakorlati alkalmazásához olyan megbízható mélyhűtési technológiát kell kialakítanunk, ami eleget tesz ennek a minimális elvárásnak. A termékenyítőanyaggal szemben támasztott másik elvárás a felolvasztott spermaminta kórokozó mentessége. A hagyományos mélyhűtési protokollok tojássárgája alapú spermahígítók használatát javasolják (*Mocé és mtsai, 2003*). Habár ezen oldatok szűrésével és az antibiotikumok használatával a bakteriális fertőzés megelőzhető, kísérleteinkben a tojássárgája helyettesítésére kereskedelmi forgalomban kapható csíramentesített fogyasztási tejféléket (ESL, UHT tej) kívántunk kipróbálni aszeptikus hígító létrehozásához. A hígítók krioprotektív hatékonyságát felolvasztást követően hasonlítottuk össze, a spermaminták festéssel meghatározható, prediktív termékenyítőképességének (felolvasztást követő túlélés és akroszóma integritás) jellemezésével.

Anyag és módszer

Spermavétel

A Hycole bakokat *ad libitum* takarmányozással, napi 12 órás fényperiódust biztosítva állandó 20^{o}C-on, 65-70% relatív páratartalmú állatházban tartottuk. A spermavétel nőstény állatra való ugratással, műhüvely alkalmazásával történt. Kísérleteinket három ismétlésben végeztük. A kinyert spermaminták motilitását szubjektív, fénymikroszkópos megfigyeléssel becsültük meg. A legalább 70%-ra becsült mozgó élősejt arányt elérő mintákat használtuk fel a kísérletekben, ezeket elegyítettük.

Mélyhűtés

A további hígítás számára egyenlő mennyiségeket alakítottunk ki a 9 kezelési csoport számára. A kontroll csoportban az előzetes mélyhűtési kísérleteinkben már alkalmazott hagyományos tojásalapú hígítókat (M1: Weitze Tris, tojássárgája, DMSO; M2: Weitze Tris, tojássárgája, glicerin, DMSO) alkalmaztuk (*Baranyai és mtsai, 2001, Kerekes és mtsai, 2012*). UHT, ESL 1,5% és 2,8%

zsírtartalmú tejek felhasználásával a tojássárgáját térfogatarányosan helyettesítve készítettünk a mélyhűtési folyamat számára a krioprotektánst tartalmazó hígítókat. Az ESL és UHT tejmintákból fagyasztva szárítással tejport készítettünk, amikből rehidratálással szintén négyféle hígítót alakítottunk ki.

A mélyhűtés során a spermamintához eredeti térfogatának kétszeresének megfelelő mennyiségű M1 oldatot adtunk cseppenként. Az elsődleges hígítású elegyet 90 percre 4°C-ra helyeztük, majd a kiindulási térfogattal megegyező mennyiségű M2 hígítóval alakítottuk ki a minta végleges térfogatát. Ezt követően 0,25 ml-s műanyag műszalmákba töltöttük a mintákat és a csöveket polivinilalkohollal zártuk le. A műszalmákat 20 percen át 4°C-on vízszintesen tároltuk, majd folyékony nitrogén gőzébe helyeztük, a folyadék felszín felett 4 cm magasságban képzett tárolón 5 percig. A gyors átfagyási folyamat megkezdését követően az alkalmazott hígítónak megfelelő színkóddal jelölt műszalmákat a folyékony nitrogénbe merítettük és végül a folyékony nitrogénnel töltött mintatároló tartályba helyeztük.

Felolvasztás, fénymikroszkópos vizsgálat

A folyékony nitrogénből kivett műszalmákat 60 másodpercre 37,5°C-os vízfürdőbe helyeztük. A műszalmák tartalmát 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, amikből a festés számára mintákat vettünk.

A termékenyítőképes sejtek arányát a sejtek plazmamembránjának és akroszomájának integritása alapján határoztuk meg, Kovács-Foote féle elő/elhalt és akroszóma membrán-állapot meghatározására alkalmas fénymikroszkópos festést alkalmazva *(Kovács és Foote, 1992)*. A kiértékelést binokuláris fénymikroszkóppal végeztük, 400x nagyítással. A spermiumfej posztakroszómális Chicago Sky Blue/neutrál vörös festékekkel való színeződése alapján állapítottuk meg a sejt élő állapotát, az akroszóma membrán épségére az akroszóma Giemsa/neutrál vörös színezéke utalt. Termékenyítőképes sejtnek a kizárólag a bíborvörös akroszómális, világos posztakroszómális résszel, és sértetlen, rózsaszín farokkal rendelkező sejteket tekintettük. Tárgylemezenként 300 ivarsejt festődését figyeltük meg a Hamupipőke sejtszámláló program segítségével, a sejteket termékenyítőképes és termékenyítésre alkalmatlan (elhalt, vagy élő, de akroszóma-, illetve farokmembrán sérült sejtek halmaza) kategóriákba sorolva (*Nagy és mtsai, 1999*).

Eredmények és értékelés

A kísérleti eredményeinket az *1. táblázatban* foglaltuk össze. Az adatok statisztikai elemzéséhez Khi négyzet próbát használtunk, következtetéseinket erre alapozva fogalmaztuk meg.

1. táblázat: **Túlélő, termékenyítő képes hímivarsejtek aránya a felolvasztást követően a különböző kezelési csoportokban**

Hígítók[2]	Túlélő termékenyítőképes sejtek %-os aránya ± SD[1]				
	ESL 1,5%	UHT 1,5%	ESL 2,8%	UHT 2,8%	Kontroll
Frissen készített[3]	20,6 ± 2,2[a]	14,5 ± 0,7[b]	14,4 ± 3,2[b]	13,7 ± 3,1[b]	23,9 ± 2,4[a]
Rehidratált[4]	16,8 ± 3,1[b]	16,0 ± 3,1[b]	14,9 ± 2,5[b]	14,9 ± 2,8[b]	-

a,b: P>0,01

Table 1: Ratio of fertile, viable spermcells in different treatment groups after thawing
[1]Ratio of survived, fertile cells %± SD, [2]Diluters, [3]Freshly prepared, [4]Rehydrated

Az elemzés alapján csak egyetlen kísérleti kezelési csoport túlélési eredménye nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoport eredményétől (23,9%). A frissen feldolgozott ESL 1,5%-os zsírtartalmú tej alapú hígítóval kezelt spermiumok 20,6 %-a őrizte meg a termékenyítőképességét a Kovács-Foote féle festéssel való értékelés alapján. A többi kezelési csoport eredménye gyengébb túlélésre utalt és az eltérés szignifikánsan különbözött a kontroll csoport eredményétől.

Következtetések és javaslatok

Vizsgálatainkban különböző tej alapú hígítók felolvasztás utáni túlélésre gyakorolt hatását vizsgáltuk, a hagyományos tojássárgáját tartalmazó hígítóval összehasonlítva. Megállapítottuk, hogy a kezelések során az 1,5 %, csökkentett zsírtartalmú ESL tej használatával elérhető a hagyományos hígító alkalmazásakor jellemző túlélési eredmény. A liofilizált, majd rehidratált mintával azonban nem sikerült ezt a hatékonyságot reprodukálni. További kísérletekben kívánjuk tisztázni, hogy az UHT kezelés, illetve a fagyasztva szárítás során milyen tényezők hatása miatt csökken a tej adalék krioprotektív hatása. A továbbiakban egyedi bakoktól származó, elkülönített spermaminták mélyhűtését is tervezzük, mely során alacsonyabb zsírtartalmú (0,5% zsírtartalom) tejjel kívánjuk helyettesíteni a tojás sárgáját az M1 és M2 hígítókban.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet Állatbiotechnológiai Intézetében dolgozó munkatársaknak, hogy lehetővé tették és segítették a kísérletek lebonyolítását. A munkánkhoz a „Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL” és a „Alternatív biotechnológiai módszerek bevezetése a magyar in vitro baromfi- és nyúl génbank fejlesztése céljából. KTIA_AIK_12-1-2013-0002” támogatások nyújtottak segítséget.

Irodalomjegyzék

Baranyai B., Somfai T., Virág Gy., Laczkó L., Ri Hak Chol, Polgár Zs., Gócza E. (2001): Nyúlsperma hosszú távú tárolási lehetőségének vizsgálata. Proc. 13. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 47-53.

Kerekes A., Kriczky N., Kása E., Bősze Zs., Bodó Sz. (2012): Nyúlsperma mélyhűtési protokollok vizsgálata 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 51-4.

Kovács A., Foote R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biot Histoc, 67. 119-124.

Mocé E., Vicente J.S., Lavara R. (2003): Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. Theriogenology, 60. 1. 115-123.

Nagy Sz., Házas G. Bali Papp Á., Iváncsics J., Szász F., Szász F. Jr. , Kovács A., Foote R.H. (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy – Theriogenology 52:1153-1159.

Szendrő Zs. (2004): A nyulak mesterséges termékenyítése. Kistermelők Lapja, 1. 16-17.

A BIVALYTEJ BELTARTALMI ÉRTÉKELÉSE ULTRAHANGOS TEJANALIZÁTORRAL

Barna Brigitta, Holló Gabriella

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézet
7400 Kaposvár, Guba Sándor utca. 40
brigiwrestler@gmail.com

Összefoglalás

Munkánk során a bivalytej beltartalmi értékeinek vizsgálatát tűztük ki célul ultrahangos tejanalizátorral. Mindösszesen 242 tejmintát gyűjtöttünk 2012 február és 2013 augusztusa között, a Balmazújváros melletti Virágoskúton. A tehenek takarmányozása kora nyártól őszig legelőre, míg a tavaszi és téli időszakban lucernaszénára, abrakra és kukoricaszárra alapozott. A tejminták analízisét naponta kétszer, a reggeli és az estei fejés után Ekomilk (Ekomilk ultra pro, Bultech, 2000) ultrahangos tejanalizátorral végeztük el, mértük a zsírtartalmat, zsírmentes szárazanyagot, sűrűséget, fehérjét, vezetőképességet és a fagyáspontot. A statisztikai értékelés SPSS 11.5 programcsomaggal történt, értékeltük a laktáció stádiuma, az életkor (laktáció: >90 nap, 91-180, 181< nap, életkor:6 évnél fiatalabbak, 6-10 év közöttiek, 10 évnél idősebbek), illetve a reggeli és az esti fejés, takarmányozás hatását. A bivalytej átlagos zsírtartalma 9,26%. A legzsírosabb tejet (10,75%) a 181 napnál hosszabb ideje laktáló csoportban mértük. A laktáció stádiuma szignifikáns volt a szárazanyagtartalomra, és a vezetőképességre. Az életkor hatása szignifikáns volt a tej sűrűségére. A takarmányozásnak szignifikáns hatása volt a tej beltartalmi értékeire (zsír, zsírmentes szárazanyag, sűrűség és vezetőképesség). A zsírosabb tejet (10,21%) a téli időszakban mértünk. Az eredmények azt jelzik, hogy a laktáció stádiuma és a takarmányozás nagyobb hatással van a bivalytej beltartalmi értékeire, mint a tehén életkora, valamint az ultrahangos tejanalizátor, mint gyors teszt, üzemi körülmények között alkalmas a bivalytej beltartalmának gyors értékelésére.

Kulcsszavak: bivalytej, ultrahangos tejanalizátor, laktáció stádiuma, életkor hatása, reggeli és esti fejés

Evaluation of gross composition of the buffalo milk using an ultrasonic milk analyser

Abstract

The aim of in our work to determine the main composition of buffalo milk with ultrasonic milk analyser. We collected 242 milk samples from February 2012 to August 2013, next to Balmazújváros, in Virágoskút. The animals fed with alfalfa hay, concentrate and corn-stalk at spring and in the winter period. The animals were in the pasture from early summer to autumn. The tests of the milk samples were done twice a day after the morning and the evening milking and they were measured with Ekomilk (Ekomilk, ultra pro, Bultech, 2000). The following data were recorded: fatness, solids non fat, milk-density, protein, conductivity, freezing point. The statistical analysis was carried out using SPSS 11.5 program. We estimated the effect of lactation stage, age (lactation: >90d, 91-180d, <181d; age: >10yr, 6-10yr, <6yr) or rather the effect of morning and evening milking and feeding. The average percentage of fat was 9.26%. The most

fattiest milk(10.75%)was measured by third lactation stage. The effect of lactation stage was significant on the solids non fat and conductivity. The effect of age was significant on the milk-density. The effect of feeding was significant on the main composition of the buffalo milk (fatness, solids non fat, milk-dendity and conductivity). We measured fatter milk (10.21%) in winter period. These data indicated that the effect of lactation stage and the feeding is higher on milk composition of buffalo than age of cow. Like a fast test, the ultrasonic milk analyzer is suitable for the fast rating of the buffalo milk among works conditions.
Keywords: Buffalo milk, ultrasonic milk analyser, lactation stage, effect of age, morning and evening milking

Irodalmi áttekintés

A tej, amely az emlő szekréciós sejtjeiben a különböző biokémiai tevékenységek eredményeként jön létre, zsírból, fehérjéből, szénhidrátokból, enzimekből, vitaminokból és különböző ásványi anyagokból áll. A tej összetétele, valamint a benne található különböző enzimek eloszlása sokféle tényező által befolyásolt, mint például a laktáció állapota, a laktáció száma, a fajta, a takarmányozás, a környezet és a beteg tőgy állapota (*Yadav és mtsai,* 1991; *Neeru és Singh,* 1995). A világ tejtermelése az elmúlt évtizedben megduplázódott, miközben a bivaly tejtermelése a második helyet foglalta el a szarvasmarha tejtermelése után (*Guo és mtsai,* 1998). A világ bivaly létszáma 1961 és 2001 között 91%-kal növekedett meg (*Nanda és Nakao,* 2003). Összehasonlítva a tehéntejjel, a bivalytejben nagyobb a fehérje és a zsír aránya. A bivalytej átlagos fehérjetartalma 4,13 és 4,55% között (*Macedo és mtsai*, 2001; *Rosati és Van Vleck,* 2002), míg az átlagos zsírtartalom 6,87 és 8,59% között változott (*Tonhati és mtsai,* 2000; *Rosati és Van Vleck*; 2002). Bivaly esetében a szárazanyag tartalom, a zsírmentes szárazanyag tartalom, a laktóz és a hamu mennyisége növekedik a laktáció számmal, míg a laktációszám a zsír- és a fehérjetartalomra nincs hatással (*Kholif,* 1997; *Sodi és mtsai,* 2008). A zsír és a szárazanyagtartalom nő, a laktóztartalom csökken, ezzel ellentétben a fehérje és hamutartalom a kezdeti csökkenés után a laktációs stádium előrehaladtával nő (*Shah és mtsai,* 1983; *Kholif,* 1997; *Dubey és mtsai,* 1997; *Bhonise és mtsai,* 2003).

A bivalytej nagy zsírtartalmára vonatkozó népi megfigyelést igazolják a törzskönyvi ellenőrzött erdélyi bivalyteheneken 1942-1943-ban végzett mérések is, amelyek szerint s bivalytej háromszor értékesebb a tehéntejnél. A bivalytartás értékes táplálékkal egészítette így ki a kalotaszegi népi konyhát. Míg korábban a magyarság népi táplálkozásában a tejnek itt sem volt „becsülete" (kisgyermekek és macskák eledelének tartották), a XIX. század második felétől kezdve jelentősége fokozatosan megnőtt: a népi táplálkozásban is teret hódított a tej- és tejeskávé fogyasztás, a maradék tejet, tejfölt és vajat pedig mind nagyobb mértékben felvette a városok gyorsan növő lakossága (*Kós,* 1980).

A magyarországi bivaly állomány jelenleg 1800 körüli, ebből 600-700 tehén. A legtöbb állomány nemzeti parkok tulajdonában van (Hortobágyi NP) és csak néhány gazdaság foglalkozik bivalytartással, ezek közül egy helyen fejik a bivalyt (Virágoskúti Kertészeti Kft, Balmazújváros), s a tejet biopiacra értékesítik, illetve joghurtot, sajtot készítenek belőle (*Rózsa, 2010*).

A vizsgálatunk céljául tűztük ki a magyarországi fejt bivalyállomány tejösszetételének ultrahangos tejanalizátorral történő elemzését, valamint a fejési idő, az életkor, a laktáció stádium és a takarmányozás hatásának értékelését a bivalytej összetételére.

Anyag és módszer

Munkánk során a Virágoskúti Kertészeti Kft. (Balmazújváros) tenyészetében a fejt bivalyállományból, mindösszesen 242 tejmintát vettünk 2012 februárja és 2013 augusztusa között. Az állatokat naponta kétszer, reggel 4.30-kor és délután 4 órakor fejik, összesen háromsajtáros fejőgéppel (De Laval). A tehenek takarmányozása kora nyártól őszig legelőre, míg a tavaszi és téli időszakban lucernaszénára, abrakra és kukoricaszárra és abrakra alapozott. A tejminták vizsgálata Ekomilk Ultra Pro ultrahangos tej analizátorral (Bultech, 2000) történt, amellyel a zsírtartalom, a zsírmentes szárazanyag-tartalom, a fehérjetartalom, a sűrűség, a fagyáspont, a hozzáadott víztartalom, és a vezetőképesség meghatározható. A mintavételkor a sajtárból kb. 20-25 ml mintát vettünk egyedenként a fejés után egy 1,5 dl-es csavaros kupakú műanyag edénybe. Az adatok előkészítése statisztikai értékelésre Microsoft Office Excel 2003 programmal, az adatbázis kiértékelését pedig az SPSS 11.5 statisztikai programcsomaggal végeztük, egytényezős variancia-analízissel. Az életkor alapján az alábbi csoportokat képeztünk: 10 évesnél idősebbek, 6-10 éves közöttiek és a 6 évesnél fiatalabbak. A laktáció stádiuma alapján is három kategóriát képeztünk (90 napnál kevesebb, 91-180 nap közötti, illetve a 181 napnál hosszabb laktációs idejű).

Eredmények és értékelésük

Az *1. táblázatban* a reggeli és az esti fejés eredményei láthatók. Korábbi vizsgálatainkban (*Barna és mtsai,* 2012) megállapítottuk, hogy a bivalytej átlagosan 7,33% zsírt, 4,19% fehérjét (a valódi fehérje tartalom 3,92%) tartalmazott. Az *Asif és Sumaira* (2010) vizsgálatukban a tehén-, a kecske-, a juh és a bivalytej összetevőit hasonlították össze. Az általuk mért bivalytej átlagos zsírtartalma 7,97%, míg *Hussain és mtsai* (2011) átlagosan 8,39% zsírtartalmat mértek. Ezek az eredmények elmaradtak az általunk mért zsírtartalomtól, ami átlagosan 9,26%. Az *Asif és Sumaira* (2010) eredményei szerint a bivalytej átlagosan 4,36% fehérjét tartalmazott. *Zicarelli* (2004) 4,65%-os fehérjetartalmat állapított meg a bivalytejben, míg az általunk mért értékek (4,74%) ennél nagyobbak voltak. este fejt tej mennyisége kevesebb, mint a reggelié, így reggel hosszabb fejési időt mértünk. A reggeli és az esti fejt tej beltartalmi értékei nem, míg a kifejt tej mennyisége és a fejési idő szignifikánsan eltért (*1. táblázat*).

***1. táblázat*: A reggeli és az esti fejés hatása a bivalytej összetételére és a fejhetőségre**

Jellemzők(1)	**Reggeli fejés(2) n=141**		**Esti fejés(3) n=101**		**Szignifikancia szint(4)**
	Átlag(14)	Szórás(16)	**Átlag(15)**	Szórás(17)	
Zsírtartalom, %(5)	**9,256**	2,34	**9,27**	2,29	NS
Zsírmentes szárazanyag,%(6)	**10,38**	1,47	**10,17**	1,09	NS
Sűrűség, g/cm^3(7)	**29,43**	3,90	**28,80**	3,41	NS
Fehérje, %(8)	**4,74**	4,26	**4,22**	0,94	NS
Fagyáspont, mili^{0}C(9)	**56,52**	5,14	**56,28**	2,49	NS
Vezetőképesség, mS/cm(10)	**3,03**	0,62	**2,99**	0,33	NS
Idő, perc(11)	**9,21**	2,68	**8,33**	2,54	0,044
Mennyiség, l(12)	**2,23**	0,71	**1,86**	0,75	0,000
Fejési sebesség, kg/perc(13)	**0,27**	0,12	**0,24**	0,12	NS

Table 1: The effect of morning and evening milking on composition of buffalo milk and milking ability
Parameters(1), morning milking(2), evening milking(3), level of significance(4), fat content(5), solids non fat(6), density(7), protein(8), freeze point(9), conductivity(10), milking time, minute (11), quantity(12), milking speed(13), mean(14,15), standard deviation(16,17)

A *2. táblázatban* a különböző laktációs stádiumban lévő egyedek tejmintáinak vizsgálati eredményei láthatók. A legzsírosabb tejet (10,75%) a 181 napnál hosszabb ideje laktáló egyedek adták, így a legkisebb zsírtartalmat (7,35%) az első laktációs stádiumú csoportban mértük (2. táblázat). A táblázat adataiból jól látható, hogy a laktáció előrehaladtával a tej szárazanyagtartalom növekedésével együtt nő a zsírtartalom és a fehérjetartalom, míg a vezetőképesség és a kifejt tej mennyisége szignifikánsan csökken. A fejési idő lényegesen nem változik a csoportokban, de a kifejt tej mennyiségének csökkenése miatt a fejési sebesség szignifikánsan kisebb a laktáció végén.

***2. táblázat*: A laktációs stádium hatása a bivalytej összetételére és a fejhetőségre**

Jellemzők(1)	**>90 nap(2) n=82**		**91-180 nap(3) n=56**		**181 nap<(4) n=104**		**Szignifikancia szint(5)**
	Átlag (15)	Szórás (18)	**Átlag (16)**	Szórás (19)	**Átlag (17)**	Szórás (20)	
Zsírtartalom, %(6)	**7,35**	1,43	**9,29**	2,29	**10,75**	1,72	0,000
Zsírmentes szárazanyag,%(7)	**9,83**	1,02	**10,27**	1,10	**10,67**	1,54	0,000
Sűrűség, g/cm^3(8)	**29,52**	4,10	**29,23**	3,03	**28,85**	3,73	NS
Fehérje, %(9)	**3,98**	0,82	**4,30**	0,93	**5,08**	4,91	NS
Fagyáspont, mili^{0}C(10)	**57,02**	3,48	**56,50**	2,02	**55,89**	5,45	NS
Vezetőképesség, mS/cm(11)	**3,22**	0,65	**2,88**	0,33	**2,95**	0,43	0,000
Idő, perc(12)	**8,90**	2,96	**8,98**	2,42	**8,73**	2,54	NS
Mennyiség, l(13)	**2,61**	0,58	**2,04**	0,66	**1,69**	0,66	0,000
Fejési sebesség, kg/perc(14)	**0,33**	0,14	**0,24**	0,11	**0,22**	0,11	0,000

Table 2: The effect of stage of lactation on the composition of buffalo milk and milking ability
Parameters(1), lactation stage is less than 90 days(2), lactation stage is between 91-180 days(3), lactation stage is more than 181 days(4), level of significance(5), fat content(6), solids non fat(7), density(8), protein(9), freeze point(10), conductivity(11), milking time, minute (12), quantity(13), milking speed(14), mean(15,16,17), standard deviation(18,19,20)

A *3. táblázatban* a tejminták összetétele életkor csoportonként látható. A legzsírosabb tejet (10,75%) a 10 évnél idősebb egyedek adták. A zsírmentes szárazanyag és fehérjetartalom is ebben a csoportban volt a legnagyobb. Az életkor hatása szignifikáns volt a tej sűrűségére, illetve annak mennyiségére (*3. táblázat*).

A *4. táblázatban* a takarmányozás hatását elemeztük a tej összetételére. A legzsírosabb tejet (10,21%) fű- és lucernaszéna takarmányozás esetén mértünk, míg a legalacsonyabb zsírtartalmú tejet (7,53%), mikor az állatok a legelőn voltak. Korábbi ultrahangos tejanalizátorral végzett méréseinknél (*Barna és Holló,* 2012) a tej átlagos zsírtartalma 10,89% volt, ami kicsit meghaladja a téli időszak alatt mért átlagos zsírtartalmat. A zsírmentes szárazanyag tartalom és a sűrűség a zsírtartalomhoz hasonlóan alakult. A takarmányozás hatása szignifikáns volt a tej zsír-,

zsírmentes szárazanyag tartalmára, a tej sűrűségére, vezetőképességére, a mennyiségére és a fejési sebességre (*4. táblázat*).

3. táblázat: Az életkor hatása a bivalytej összetételére és a fejhetőségre

Jellemzők(1)	**>6 év(2) n=119**		**6-10 év(3) n=40**		**10 év<(4) n=89**		**Szignifikancia szint(5)**
	Átlag (15)	Szórás (18)	**Átlag (16)**	Szórás (19)	**Átlag (17)**	Szórás (20)	
Zsírtartalom, %(6)	**9,18**	2,39	**8,87**	2,44	**9,55**	2,12	NS
Zsírmentes szárazanyag,%(7)	**10,34**	1,04	**10,10**	1,01	**10,31**	1,77	NS
Sűrűség, g/cm^3(8)	**29,75**	2,95	**29,05**	3,92	**28,39**	4,42	0,030
Fehérje, %(9)	**4,40**	0,90	**4,23**	0,89	**4,84**	5,53	NS
Fagyáspont, mili^{0}C(10)	**56,80**	2,37	**56,70**	2,51	**55,73**	6,40	NS
Vezetőképesség, mS/cm(11)	**3,03**	0,47	**3,08**	0,69	**2,99**	0,37	NS
Idő, perc(12)	**8,55**	2,55	**8,83**	2,59	**9,31**	**2,82**	NS
Mennyiség, l(13)	**2,08**	0,62	**2,53**	0,75	**1,87**	**0,82**	0,000
Fejési sebesség, kg/perc(14)	**0,27**	0,13	**0,30**	0,12	**0,24**	0,13	NS

Table 3: The effect of age on the buffalo milk composition and milking ability
Parameters(1), age is less than 6 ys(2), age is between 6-10 ys(3), age is more than 10 ys(4), level of significance(5), fat content(6), solids non fat(7), density(8), protein(9), freeze point(10), conductivity(11), milking time, minute (12), quantity(13), milking speed(14), mean(15,16,17), standard deviation(18,19,20)

4.táblázat: A takarmányozás hatása a bivalytej összetételére és a fejhetőségre

Jellemzők(1)	**Széna+abrak(2) n=144**		**Legelő(3) n=57**		**Kukoricaszár+abrak(4) n=41**		**Szignifikancia szint(5)**
	Átlag (15)	Szórás (18)	**Átlag (16)**	Szórás (19)	**Átlag (17)**	Szórás (20)	
Zsírtartalom, %(6)	**10,21**	2,10	**7,53**	1,78	**8,34**	1,89	0,000
Zsírmentes szárazanyag,% (7)	**10,58**	0,97	**9,75**	0,99	**10,05**	2,27	0,000
Sűrűség, g/cm^3(8)	**29,72**	2,66	**28,88**	3,78	**27,61**	5,83	0,004
Fehérje, %(9)	**4,60**	0,82	**3,89**	0,86	**5,15**	7,85	NS
Fagyáspont, mili^{0}C(10)	**56,76**	1,70	**56,33**	3,53	**55,32**	8,87	NS
Vezetőképesség, mS/cm(11)	**2,92**	0,36	**3,30**	0,71	**2,93**	0,57	0,000
Idő, perc(12)	**8,88**	2,74	**8,75**	2,80	**8,87**	2,29	NS
Mennyiség, l(13)	**1,79**	0,64	**2,39**	0,70	**2,68**	0,65	0,000
Fejési sebesség, kg/perc(14)	**0,22**	0,11	**0,32**	0,15	**0,32**	0,10	0,000

Table 4: The effect of feeding on buffalo milk composition and milking ability
Parameters(1), hay and forage(2), pasture(3), corn stover and forage(4), level of significance(5), fat content(6), solids non fat(7), density(8), protein(9), freeze point(10), conductivity(11),

milking time, minute (12), quantity(13), milking speed(14), mean(15,16,17), standard deviation(18,19,20)

Következtetések és javaslatok

Az eredmények azt jelzik, hogy a laktáció stádiuma és a takarmányozás nagyobb hatással van a bivalytej beltartalmi értékeire, mint a tehén életkora és a fejési idő (reggel, este).

Az ultrahangos tejanalizátor, mint gyors teszt, üzemi körülmények között alkalmas a bivalytej beltartalmának gyors értékelésére.

Irodalomjegyzék

Asif M., Sumaira, U. (2010): A comparative study on the physicochemical parameters of milk samples collected from buffalo, cow, goat and sheep of Gujrat, Pakistan. Pakistan Journal of Nutrition, 9. 12. 1192-1197.

Barna B., Holló G. (2012): A bivalytej vizsgálata ultrahangos tej analizátorral. Ifjúsági Tudományos Fórum Keszthely, április 19.

Barna B., Csapó J., Holló G. (2012): Adatok a bivaly (Bubalus Bubalis) tej- és hústermelőképességéhez. Acta Agraria Kaposváriensis, 16. 1418-1789.

Bhonise, D., Chourasia, S. K., Singh, M., Jain, R. K. (2003): Factors influencing major milk constituents in Murrah buffaloes. Indian J. Anim. Sci., 73. 107-109.

Dubey, P. C., Suman, C. L., Sanyal, M. K., Pandey, H. S., Saxena, M. M., Yadav, P. L. (1997): Factors affecting the composition of milk of buffaloes. Indian J. Anim. Sci., 67. 802-804.

Guo, M. R., Wang S., Li, Z., Qu, J., Jin, L., Kindsted, P. S. (1998): Ethanol stability of goat's milk – review 1968-1979. Int Dairy J., 8. 57-60.

Hussain, I., Bell, E. A., Grandison S. A. (2011): Comparison of the rheology of mozzarella-type curd made from buffalo and cow's milk. Food Chemistry, 128. 500-504.

Kholif, A. M. (1997): Effect of number and stage of lactation ont he yield, composition and properties of buffalo's milk. Egypt J. Dairy Sci., 25. 25-39.

Kós K. (1980): Eszköz, munka, néphagyomány. Kriterion könyvkiadó, Bukarest

Nanda, A. S., Nakao, T. (2003): Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. Animal Science Journal, 74. 443-455.

Macedo, M. P., Wechsler, F. S., Ramos, A. A., Amaral, J. B. (2001): Composição fisico-química e produção de leite de búfalas de raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. Rev. Bras. Zoot., (Suppl 1) 30. 1084-1088.

Neeru, Singh, M. (1995): Mammary gland development and milk compositional changes in hormonally induced lactating buffaloes. Indian J. Dairy Sci., 48. 216-222.

Rosati, A., Van Vleck, L. D. (2002): Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. Livest. Prod. Sci., 74. 185-190.

Rózsa P. (2010): szóbeli közlés

Shah, S. K., Schermerhorn, E. C., Cady, R. A., McDowell, R. E. (1983): Factors affecting milk fat percent of Nili-Ravi buffaloes in Pakistan. J. Dairy Sci., 66. 573-477.

Sodi, S. S., Mehra, M. L., Jain, A. K., Trehan, P. K. (2008): Effect of non-genetic factors ont he composition of milk of Murrah buffaloes. Indian Vet. J., 85. 950-952.

Tonhati, H., Cerón-Muñoz, M. F., Oliveira, J. A., El Faro, L. (2000): Genetic parameters of milk production, fat and protein contents in buffalo milk. Braz. J. Anim. Sci., (Suppl 1) 29. 2051-2056

Yadav, S. B. S, Yadav, A. S., Yadav, M. S. (1991): Seasonal fluctuations in milk composition at various stages of lactation in cross-breed dairy cattles. Indian J. Dairy Sci., 44. 33-36.

Zicarelli, L. (2004): Buffalo milk: Properties, dairy yield and mozzarella production. Veterinary Research Communications, 28. 127-135.

AZ ÉVSZAK HATÁSA A LEGELTETETT BIVALY VISELKEDÉSÉRE

Barna Brigitta, Altbäcker Vilmos, Holló Gabriella

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézet
7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.
brigiwrestler@gmail.com

Összefoglalás

A tanulmányunk célja a bivalyok viselkedésének leírása a legeltetési időszak alatt. Megfigyeléseinket a Balaton-felvidéki Nemzeti Park területén található Bivalyrezervátumban végeztük 2012 ősz és 2013 nyara között. A felnőtt egyedek életkora 3-25 év közötti, míg a borjak 10 hónaposnál fiatalabbak. A megfigyeléseket délelőtt 9 és délután 15 óra között végeztük négy egymást követő napon három évszakban, oly módon hogy a viselkedéseket minden negyed órában rögzítettük. Így összesen 25 megfigyelési egység jutott egy kísérleti napra. Az állatok tartása extenzív körülmények között zajlik, legeltetési időszakban az állatok nem kapnak kiegészítő takarmányozást. A megfigyeléseinket úgy végeztük, hogy az állatok természetes viselkedését ne zavarjuk. Szükség esetén távcsövet használtunk (Auriol 10X-30X60 zoom,63M/100M AT 10X). Legszembetűnőbb megfigyelésünk az volt, hogy az állatok egyszerre mozogtak a legelőn. Ősszel az állomány a legtöbb időt legeléssel töltötte, két legelési csúcs volt megfigyelhető (10:00-kor 90%, míg 14:00-kor 93%). Tavasszal a kora reggeli órákban az állatok legeltek és a reggeli legelési csúcs után (9:30) kezdték meg a lefekvést. A legkevesebb fekvés a nyári szezonban volt, a nyári meleg beköszöntével a dagonyázás mennyisége is jelentősen megnőtt. Míg tavasszal a dagonyázási csúcs délben volt (57%), addig nyáron két dagonyázási csúcsot figyeltünk meg (10:45-kor 60%, 13:00-kor 62%). Ugyanakkor ősszel nem tapasztaltunk dagonyázást. Az eredmények alapján elmondható, hogy a bivalyok évszakosan változó viselkedés mintázatot mutatnak, és napi aktivitásukban nagyfokú szinkronitás figyelhető meg.
Kulcsszavak: bivaly, viselkedés, megfigyelés

Seasonal effects on behavioural of grazing buffalo

Abstract

The aim of this study to record the behavior of the buffaloes during the grazing period. Our study was carried out in the Balaton Buffalo Reserve between autumn 2012 and summer 2013. The age of adult animals were 3-25 years, the calves were younger than 10 month. The daily observation period started at 9 am and ended 15 pm for four consecutive days in three seasons. We recorded the behaviour of animals in every quarters, resulting in 25 observation units in one experimental day. The animals were kept under extensive conditions, they did not recieve supplementary feeding in the grazing period. We did not disturb the natural behavior of animals. We used binoculars (Auriol 10X-30X60 zoom,63M/100M AT 10X) if needed. The most salient observation was that the animals moved at the same time on the pasture. In autumn, the animals spent most time with grazing. There were two grazing peaks (at10:00 90% and at14:00 93%). In spring, the buffaloes grazed early in the morning (between 7:00 and 8:30) and they started to lie down after the morning grazing peak. The frequency of lying was lowest in the summer season.

When it was hotter in the summer, the frequency of wallowing also increased. The wallowing peak was at noon in the spring (57%), while there were two wallowing peaks in the summer (at 10:45 60% and at 13:00 62%). We did not observe wallowing in autumn. These results indicate a marked seasonal behavioural pattern and high level of synchrony in buffaloes.
Keywords: buffalo, behavioural, observation

Irodalmi áttekintés

A háziállatok viselkedését számos tényező befolyásolja. Ezek közül a legfontosabb a takarmányozás és a termoreguláció (*Kassim és Baharin,* 1979). A bivalyok jobban alkalmazkodnak a forró éghajlathoz, mint a hideg környezethez (*Zicarelli,* 2005). A természetes szelekciónak köszönhetően, a bivalyok számos olyan morfológiai tulajdonsággal bírnak, amelyek lehetővé tették a meleg területekhez való alkalmazkodásukat. A melaninnal pigmentált bőr hasznos az ultraviola sugarak ellen és a kis szőr sűrűség megkönnyíti a hőleadást. Igaz az is, hogy ez a kis szőr sűrűség limitálja az izzadság mirigyek számát. Így, a dagonyázásra, mint hatékony termoregulációra támaszkodnak a bivalyok (*Hafez és mtsai,* 1955). A bivalyok társas lények és tiszta domináns hierarchiában különböző méretű gulyában élnek, amelyet egy domináns bika vezet A társadalmi helyüket fiatal korukban szerzik meg inkább pózolásokkal és finom gesztusokkal, mint agresszivitással (*Grasso és mtsai,* 2004). Míg a bikák esetében a társadalmi helyük betöltéséért vívott harc folyamatosan zajló dinamikus folyamat, addig a tehenek társadalmi helyzete viszonylag stabil az életük folyamán. A legelő állatok a különböző viselkedések, a táplálkozási igényük, az állomány sűrűsége, az élelem eloszlása és elérhetősége, a ragadozó érzékelt fenyegetése szerint osztják be az idejüket. A szakirodalomban számos adat van a legelő szarvasmarha, juh és kecske viselkedésére a mérsékelt és trópusi zónákra vonatkozóan. Ezen állatfajok a nappalok körülbelül 60%-t evéssel, 20-26%-t sétálással és 12-20%-t pihenéssel töltik (*Schlecht és mtsai,* 2006). *Lewis* (1977) azt írta le, hogy a cape bivaly esetében az etetési idő a nappalok 52%-t teszi ki. Reggeli és esti etetési csúcs volt megfigyelhető náluk, míg a pihenési csúcs a nap közepén volt. *Grimsdel és Field* (1976) azt figyelték meg vad bivaly esetében, hogy naponta átlagosan 9 órát legeléssel és 6,4 órát kérődzéssel töltenek. Több legelés történt este, míg a kérődzés egyenlően oszlott meg a nappalok és az éjszakák között. *Verma és Tripathi* (1980) megjegyezték, hogy azok a bivalyok, amelyek rendelkezésére nagy nyitott terület áll, kevesebb időt töltenek állással és sétálással, viszont több időt töltenek evéssel és fekvéssel, mint azon társaik, amelyeknek kevesebb hely áll rendelkezésükre.

Tanulmányunkban célul tűztük ki a hazai bivalyok viselkedésének leírását a legeltetési időszak (tavasz, nyár, ősz) alatt.

Anyag és módszer

A vizsgálatainkat a Balatonfelvidéki Nemzeti Park területén található Bivalyrezervátumba folytattuk. Itt az állatokat egy 10 hektáros kifutóban helyezték el. Az állatok tartása extenzív körülmények között zajlik, legeltetési időszakban az állatok nem kapnak kiegészítő takarmányozást. A kísérleti időszakban az állatokat legeltették, kihajtásuk a legelőre 7:00-kor, míg behajtásuk pedig 16:00-kor történt. A felnőtt egyedek (1 bika, 33 tehén) életkora 3-25 év közötti, míg a borjak fiatalabbak 10 hónapnál. A megfigyeléseket reggel 9:00 és délután 15:00 óra között végeztük négy egymást követő napon három évszakban, oly módon hogy a viselkedéseket minden negyed órában rögzítettük. Így összesen 25 megfigyelési egység jutott egy

kísérleti napra. A viselkedéseken belül a fő hangsúlyt 3 pózra, az állásra/legelésre, a fekvésre/pihenésre és a dagonyázásra fektettük. Továbbá figyeltük az állatok egymáshoz való viszonyát is. Mivel a vizsgálati időszakban az állatok létszáma az ellések miatt folyamatosan változott, így a jobb összehasonlíthatóság miatt az egyes viselkedésformákat az adott negyed órában mutató egyedek százalékos megoszlásában adtuk meg. A megfigyeléseinket úgy végeztük, hogy az állatok természetes viselkedését ne zavarjuk, a legelő területre bementünk tisztes távolságban a gulyától. Szükség esetén távcsövet (Auriol 10-30X60 zoom, 63M/100M at 10X) használtunk.

Eredmények és értékelésük

Általános megfigyelésünk az volt, hogy az állatok szinkron mozogtak a legelőn, ennek ellenére egymástól szétszóródva legeltek. A megfigyelés szerint kijelenthető, amelyik állat legel, az mozog is. A fiatal borjas tehenek viszont a borjaikkal távolabb helyezkedtek el a gulyától, ezt a viselkedést korábban *Murphey és mtsai* (1995) is leírták. Eg-egy tehén fiatal borjával gyakran éjszakára is kint maradt a legelőn, előfordult azonban, hogy napközben a tehén csatlakozott a gulyához, de még a borjú nélkül. A borjú „bemutatása", bevezetése a gulyába ellés után pár nappal később történt meg. Az idősebb borjak mellett mindig van egy tehén, aki vigyáz rájuk. A borjak között is megfigyelhető egyfajta hierarchia, ugyanis bizonyos borjak szorosan egymás mellett fekszenek, míg mások ettől a csoporttól kicsit távolabb, egyesével fekszenek. Ez az egymáshoz való viszonyukra utal, minél távolabb vannak a többiektől, annál hátrébb vannak a rangsorban. Megfigyeléseink szerint, a gulya tagjai egy domináns tehenet követnek, tulajdonképpen ez az egyed „szabja meg" mit meddig csinálnak. A bika feladata a gulya védelme és a tehenek összefogása. A megfigyelési periódus alatt azt tapasztaltuk, hogy a gulya tagjai, legfőképpen a fiatalabb állatok, gyakran tisztogatják egymást. Ennek fontos szerepe van a hierarchia, illetve a társadalmi kapcsolatok kialakításában. Felnőtt és fiatalabb egyedeknél is megfigyeltünk eltérő bánásmódot – egyes társait közel engedte magához, míg másokat elkergetett maga mellől.

Az *1. ábra* a legelés évszakonkénti megoszlását mutatja. Jól látható, hogy ősszel az állomány több időt töltött legeléssel, mint tavasszal és nyáron. Az őszi szezonban két legelési csúcs volt megfigyelhető (10:00-kor az állatok 90%-a elegelt, míg 14:00-kor 93%). A tavaszi szezonban egy legelési csúcsot (11:00-11:45 között több, mint 80%), míg a nyári időszakban három (9:00-9:45 között és 11:30-11:45 között több, mint 80%, valamint 14:30-kor 75%) olyan periódus volt, amikor az állatok többsége legelt (*1. ábra*).

***1. ábra*: A legelés évszakonkénti megoszlása**

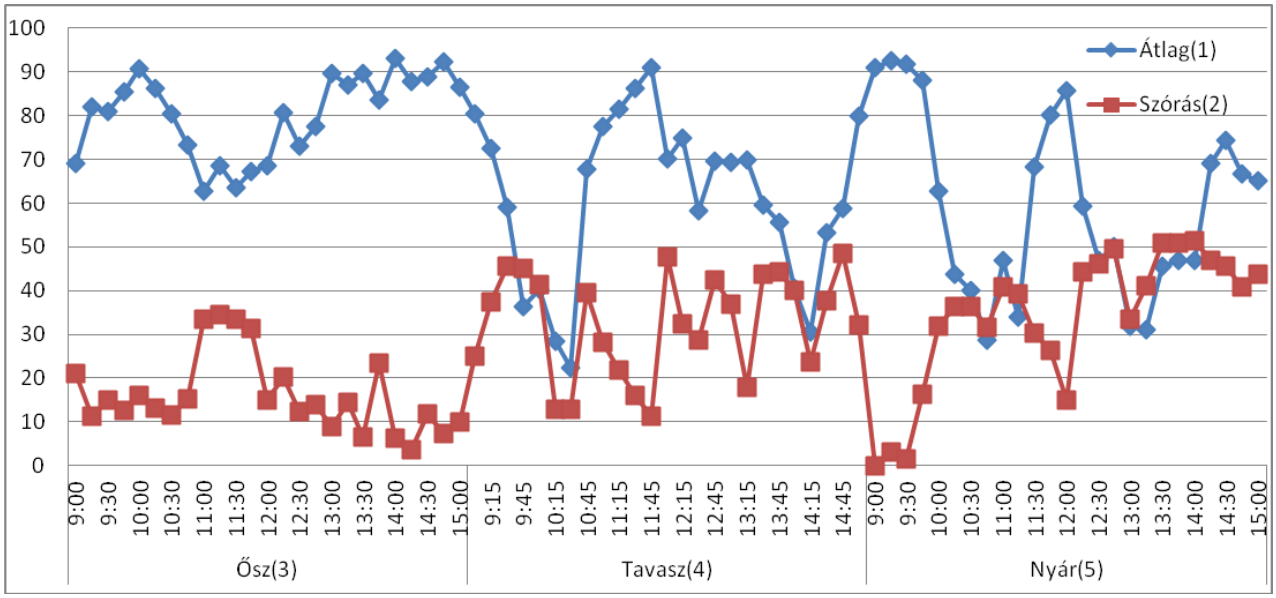


Figure 1: Distribution of the grazing on seasons
Mean(1), standard deviation(2), Autumn(3), Spring(4), Summer(5)

A *2. ábrán* a fekvés eloszlása látható a megfigyelt időszak alatt. Tavasszal a kora reggeli órákban az állatok legeltek és a reggeli legelési csúcs után (9:30) kezdték meg a lefekvést. Ebben a szezonban a pihenési csúcs 10:30-kor volt, ekkor az állomány közel 80%-a feküdt. A legkevesebb fekvést a nyári szezonban tapasztaltuk. Itt két pihenési csúcs volt, 11:15 illetve 13:15 órakor (35%), de ez sem érte el a tavaszi pihenési csúcs maximumát (80 %). Őszi szezonban a megfigyelési periódus alatt mindig volt olyan egyed, amelyik feküdt. Az állomány több mint 30 % pihent 11:00 és 11:45 között.

A *3. ábrán* a dagonyázás évszakonkénti megoszlása látható. A dagonyázás az adaptív hőveszteség felgyorsításának folyamata, ugyanis a bivaly nem képes izzadással a felesleges testhőt eloszlatni (*Hafez és Shafei,* 1954; *Hafez mtsai,* 1955). Ősszel nem tapasztaltunk dagonyázást, viszont tavasszal már igen. Az ábrán az a legszembetűnőbb, hogy a nyári meleg beköszöntével a dagonyázás aránya is jelentősen megnőtt. Nyáron, az általunk mért legmagasabb napi hőmérséklet 37 ^{0}C, a legalacsonyabb pedig 22 ^{0}C volt. Míg tavasszal a dagonyázási csúcs délben volt (57%), addig nyáron két dagonyázási csúcsot figyeltünk meg (10:45-kor 60%, 13:00-kor 62%). Ez utóbbi megegyezik *Ireneusz és mtsai* (2012) megfigyeléseivel, akik nyáron két dagonyázási csúcsot észleltek.

Az általunk tapasztalt fő napközbeni tevékenységek nyáron és tavasszal a legelés és a dagonyázás volt, amely megegyezik *Kassim és mtsai* (1979) megfigyeléseivel. Mindhárom évszakban az általunk megfigyelt állatok reggel legeltek és ezt követően kezdték meg a dagonyázást illetve a lefekvést, majd újból legeltek, amely szintén megegyezik *Kassim és mtsai* (1979) megfigyelésével. Az ábrákból jól látható, hogy a legelés volt a legnagyobb arányban előforduló tevékenység az évszakok alatt, ami hasonló *Ireneusz és mtsai* (2012) eredményeivel.

2. *ábra*: A fekvés megoszlása évszakonként

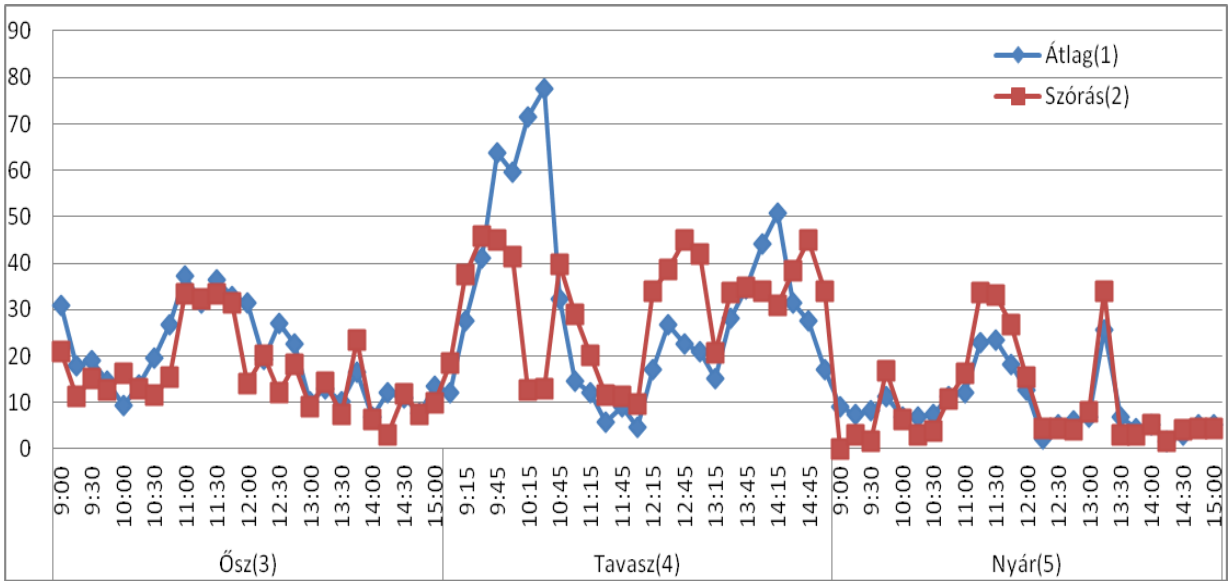


Figure 2: Distribution of the lying on seasons
Mean(1), standard deviation(2), Autumn(3), Spring(4), Summer(5)

3. ábra: A dagonyázás évszakonkénti megoszlása

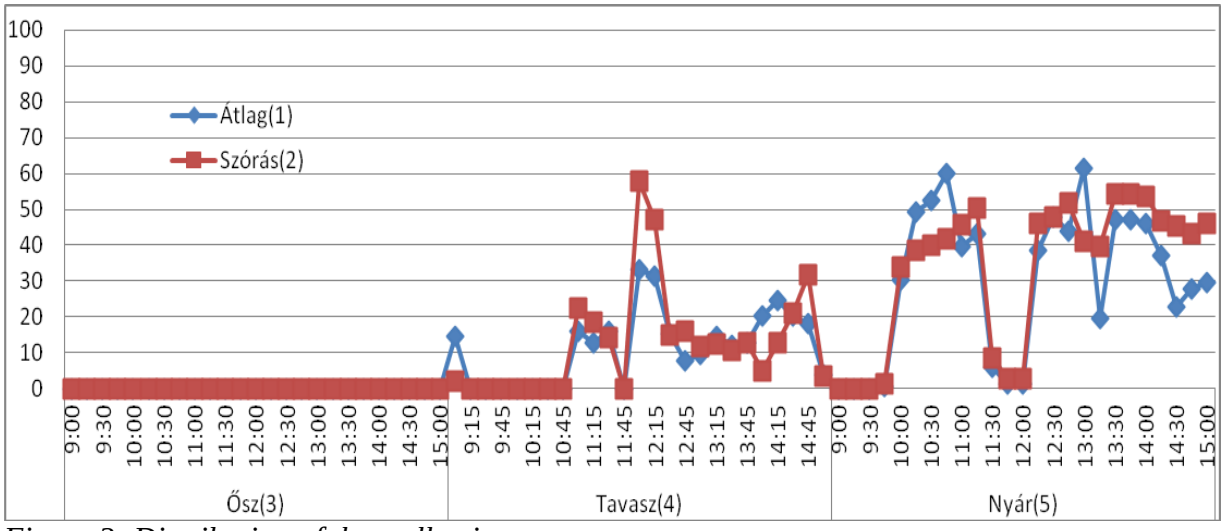


Figure 3: Distribution of the wallowing on seasons
Mean(1), standard deviation(2), Autumn(3), Spring(4), Summer(5)

Következtetések és javaslatok

Az eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- meleg időben a bivalyok jellegzetes viselkedése a dagonyázás,
- a bivalyok ősszel több időt fordítanak legeléssel, mint tavasszal és nyáron,
- nyáron a legelés több szakaszban történik, a legelést dagonyázás követi,
- a csordában a bivalyok viselkedése egyidejűleg változik,
- a kiváltó okok vizsgálatára az állatok egyedi jelölése és leírása szükséges.

Irodalomjegyzék

Grasso, F., Terzano, G. M., De Rosa, G. Tripaldi, C., Napolitano, F. (2004): Influence of housing conditions and calving distance on blood metabolites in water buffalo cows. Ital. J. Anim. Sci., 3. 275-282.

Grimsdel, J. J. R., Field, C. R. (1976): Grazing pattern of buffaloes int he Rwenzori National Park, Uganda. E. Afr. Wildl. J., 14. 4. 339-344.

Hafez, E. S. E., Shafei, M. M. (1954): Sweating mechanism in the domestic buffalo. Nature, 174. 1181-1182.

Hafez, E. S. E., Badreldin, A. L., Shafie, M. M. (1955): Skin structure of Egyptian buffaloes and cattle with particular reference to sweat glands. J. Agric. Sci., 46. 19-30.

Ireneusz, A., Jarosław, P., Anna, P., Ryszard, S. (2012): A preliminary study of the behaviour of water buffaloes (Bubalus bubalis) imported to Poland (Short Communication). Archiv Tierzucht, 55. 415-419.

Kassim, H., Baharin, K. (1979): Grazing behaviour of the swamp buffalo (Bubalis bubalus). Pertanika, 2. 125-127.

Lewis, J. G. (1977): Game domestication for animal production in Kenya: Activity pattern of eland, oryx, buffalo and zebu cattle. J. Agric. Sci., 89. 551-563.

Murphey, R. M., Paranhos De Costa, M. J. R., Gomes Da Silva, R., De Souza, R. C. (1995): Allonursing in river buffalo, Bubalus bubalis: nepotism, incompetence of thievery? Anim. Behav., 49. 1611-1616.

Schlecht, E., Hiernaux, P., Kadaouré, I.,Hülsebusch, C., Mahler, F. (2006): A spatio-temporal analysis of forage availability and grazing and excretion behaviour of herded and free grazing cattle, sheep and goats in Western Niger. Ecosys. Environ., 113. 226-242.

Verma, A. K., Tripathi, V. N. (1980): Effect of floor area and manger length on the growth and behaviour of Murrah buffalo heifers in loose housing system. Haryana Agric. Univ. J. Res., 10. 4. 594-603.

Zicarelli, L. (2005): Influenza del periodo e dello spazio sulla produzione lattea e sul consumo di sostanza secca nella bufala mediterranea italiana. proc. 3rd Nat. Congr. on buffalo management, Paestum, Italy, 75-76.

ACTUAL PROBLEMS, POSSIBILITIES AND TRENDS IN DRINKING WATER TESTING

Dóra Bencsik

Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Institute of Environmental and Landscape Management, Department of Aquaculture
Bencsik.Dora@mkk.szie.hu

Abstract

Water is the fundamental life source that sustains all beings on Earth, and the driving force of the development of mankind. Perhaps due to the high degree of development and industrialization, drinkingwater of good quality and quantity becomes less and less accessible. A largeamount of pollutants are found in water recources, coming from agriculture, industry and households. Some of these are endocrine disruptive, mutagenic or carcinogenic. Disinfection-byproducts are poorly studied pollutants of drinkingwater. Based on literature, the number of compounds formed during drinking water treatment is estimated to be over 200. Since more and more pollutans are explored, monitoring of water quality becomes more and more important. Effects of chemicals can hardly be assessed on the basis of chemical test, thus biological tests come into view. These tests are carried out according to international guidelines so results are highly comparable. To get a complex picture, experiments should be conducted on different trophic levels. As a new trend, model ecosystems and biomagnification field studies become famous again. Interestingly, food chain models are neglected, however could serve valuable information on the potential ecosystem effects of previously unknown compounds. The goal of this work is to present the actual problems, possibilities and trends in drinking water testing.
Keywords: drinking water, toxicology, zebrafish

This study has been prepared with the support of the MÖB-DAAD Projekt 29836, TÁMOP-4.2.1.B.-11/2KMR-2011-0003 and Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL project supports.

Az ivóvíz tesztelésének aktuális problémái, lehetőségei és trendjei

Összefoglalás

A víz a földi lét alapja, az emberiség fejlődésének mozgatórugója. Talán pont a nagy mértékű fejlődésnek, iparosodásnak köszönhetően egyre nehezebb megfelelő minőségű és mennyiségű ivóvízhez jutni. Számos, a mezőgazdaságból, az iparból és a háztartásokból származó szennyezőanyag található meg ivóvíz bázisunkban. Egy részükről bebizonyosodott, hogy hormonrendszert zavaró, mutagén vagy éppen karcinogén hatásúak. Az ivóvízben található, napjainkban még kevéssé vizsgált szennyezők a víztisztítási melléktermékek. Ezen vegyületek az ivóvíz fertőtlenítése során keletkeznek, egyes publikációk kettőszáz felettire becsülik a számukat. Mivel egyre több szennyező létére derül fény, ezért egyre fontosabbá válik a vizek minőségének ellenőrzése. Csupán kémiai vizsgálatokkal nem lehet felmérni az egyes vegyületek hatását, így egyre jobban előtérbe kerülnek a biológiai tesztek. Ezeket nemzetközi irányelvek alapján végzik

a laboratóriumok, így az eredmények jól összehasonlíthatóak. Hogy komplex képet kapjunk, a lehető legtöbb trofikus szinten szükséges vizsgálódni. Legújabb trendként újra előtérbe kerülnek a modell ökoszisztémák, a terepi biomagnifikációs vizsgálatok. Érdekes azonban, hogy a laboratóriumban modellezett táplálékláncok tanulmányozása háttérbe szorult, pedig ezekkel a vizsgálatokkal értékes információkhoz juthatnánk az eddig ismeretlen vegyületek ökoszisztémára gyakorolt esetleges hatásairól. A munkám célja, hogy bemutassam a ivóvízzel kapcsolatos aktuális problémákat, valamint a vizsgálati lehetőségeket, trendeket.
Kulcsszavak: ivóvíz, toxikológia, zebradánió

A munka a MÖB-DAAD Projekt 29836, a TÁMOP- 4.2.1.B.-11/2KMR-2011-0003 és Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL támogatásával készült.

Concept and importance of drinking water in the development of mankind

Drinking water is water for human consumption meeting the prescriptions about the quality requirements and control order of potable water. Water is not just the basis of the life on Earth, but it is also the driving force of the development of mankind. It is more and more difficult to provide enough food of good quality to the increasing population of our planet. To produce large volumes of food farmers have to implement industry-like agriculture methods, which require lots of water. Unfortunately these activities also imply high degree of water contamination affecting the water bases as well.

The quantity of water is Earth is estimated to 1.4 billion cubic kilometers, but only 0,003% of it can be used as drinking water or for sanitation, agricultural and industrial purposes. In case the population increases in the current rate, by 2030 the water might be not enough to sustain mankind. A FAO survey showed that the branch of economy requiring most of the water is agriculture. The production of each kilogram of grain requires 1000-3000 liters of water. The potable water consumption per capita is not merely the direct consumption as 2-5000 liters of water are needed to produce the daily food requirement of one person.

Problems of the developing and developed countries

The distribution of the water resources is not even. There are regions, where the water is almost wasted, while in other areas tens of thousands of people die every day due to the lack of water. In the developing countries hunger is a major problem as they cannot produce enough food due to the lack of water. Many diseases (malaria, typhoid, salmonella, hepatitis, *E. coli* infection) take their victims in these countries because of the absence of adequate sanitation and clean drinking water.

Developed countries face totally different problems. Here the water reserves are available, but due to the high degree of industrialization they get contaminated. Besides the pollutants emitted by the industry and agriculture there are also other contaminants, detergents, chemicals, drug residues reaching the waters. In order to remove these materials and to prevent the water-borne diseases the waste waters of the settlements are subject to different water-cleaning procedures. Although these procedures are modern, still they are not suitable for example for removing many endocrine disrupters. EDC compounds offset the natural balance of the hormones in the living organisms, affect reproduction and ontogenesis and acting as analogues of natural

hormones they result in numerous adverse biological effects (such as distortion, development disorders) (*Bakos et al.* 2013).

Nowadays more and more attention is paid in toxicology to the compounds forming during the disinfection of drinking water.

Providing good quality drinking water free from harmful contaminants/pollutants has become a vital, strategic task all over the world and in our country too. The water purification processes currently used (chlorine, chlorine dioxide, ozone or UV treatment) are aimed primarily at killing the bacteria in the water and in addition a variety of filtration techniques seek to reduce the chemical contamination.

The oxidizing disinfectants can interact also with inorganic materials in the drinking water therefore the result of these chemical interventions, besides the obvious benefits of the disinfection, can be the formation of many organic compounds (by-products of water purification), which might have harmful, mainly mutagenic (*Sujbert et al.* 1993) and carcinogenic impacts (*Bull et al.* 1995).

Importance of and possibilities to check harmful materials present in the drinking water

In order to safeguard human health and the environment laboratory tests become more and more important. This is the safest way to map up the effects of certain compounds or environmental samples. In order to obtain a complex picture about the impact of a compound it is important to have information about as many species as possible, from the lower living beings up to the vertebrates.

The toxicity tests of the various substances are usually performed in the laboratories based on internationally accepted regulations, standards or guidelines. In most of the cases the OECD guidelines are applied. They contain the regulations relating the conduct of studies as well as the method of determining the parameters needed for the evaluation of the tests.

From the elements of the ecosystem, the testing usually starts with the bacteria tests, for example with the Ames-test (OECD 471), which is used for the detection of genotoxicity, but toxicity tests are made on *Aliivibrio fischerii* too. This latter test organism shows the toxicity of the tested substance through the reduction of its bioluminescence (*Thouand*, 2011). The lower plants are represented by algae, where the growth inhibition test of unicellular algae (OECD 201) is widely used. The effect of the compounds on macrophytic aquatic plants is tested on duckweed species *(Lemna sp.*) in accordance with OECD 221 standard. As to the animals, tests made on lower crabs are essential as these tiny organisms serve as food for the higher vertebral consumers, fishes. The most commonly used tests are also recorded in the OECD standard (i.e. OECD 202), which describes the tests of the acute immobilization and reproduction parameters of the *Daphnia magna*.

The above mentioned acute test draws a picture about the impact of the tested materials or environmental samples on the lower living beings and the researcher can move on to the testing on vertebral organisms.

Fish as ideal model in the water toxicity tests

Fish as a taxonomy group represents the only vertebral group, which lives exclusively in water therefore they are indispensible part of the integrated toxicological tests (*Spitsbergen and Kent*, 2003). It is now recognized on an international level (EU regulation 233/1996) that fish is one of the most suitable aquatic organizations for the examination of environmental pollution.

Acute and chronic toxicological tests performed on fishes are widely used animal tests for the examination of the effects of different chemical substances on vertebrates.

A popular model-animal of the biological research performed on aquatic organisms is a tiny team-fish, zebrafish (*Denio rerio*) (*Engeszer et al.* 2007), which is well known from the fishbowl. These fishes have many features, which makes them outstanding from the other animal species used as models. They have short generation intervals, high quantity of brood can be obtained from them, the development of embryos takes place *ex utero,* and it can be followed easily through the transparent eggshell (*Lieschke and Currie,* 2007). They are widely used for development biological and genetic (*Eisen,* 1996; *Grunwald and Eisen,* 2002), gerontological, (*Gerhard and Cheng,* 2002), tumor-biological (*Lieschke and Currie,* 2007), behavior-biological, (*Engeszer et al.* 2007; *Spence and Smith,* 2005), toxicological (*Ankley and Johnson,* 2004; *Hill et al.* 2005, *Rácz et al.* 2012), morphometric (*Staszny et al.* 2013) and immune-biological examinations (*Csenki et al.* 2010).

Of course, OECD standards are connected to tests performed on fish as well. These tests are: acute toxicity test (OECD 203), test on poisoning in an early age (OECD 210), and the short-term effect test made on the embryo (OECD 212).

Possibilities of using complex testing systems

To make a complex picture about the effects of the different compounds it is not enough to examine only individual elements of the food chain. Laboratory ecosystem models were created in order to monitor the changes taking place in nature. Their use was widespread in the 1970-80's mainly for examining pesticides, drugs and drug residues. (*Metcalf et al.* 1973 a,b; *Coats et al.* 1976 ; *Lutnicka et al.* 1999). Maybe due to the development of the computer aided modeling, nowadays the use of the highly complex, multi-trophic-level laboratory models is loosing its importance.

Since many compounds (heavy metals, pesticides, etc.) can accumulate in the food chain, the development of test systems which can model this process seems to be appropriate. The essence of the food chain models is that the first element and then sequentially the species located on the next steps of the chain are treated by the pollutant (*Pickhardt et al.* 2005; *Ferard et al.* 1981). The first element present in the aquatic food chains as the primary producer is alga. The next level, the lower crabs are fed with the treated algae and then the crabs serve as food for the fish. In each step, the counter-measuring of the tested substance by analytical methods is essential. Presently the use of this method is not popular in the research, but in my opinion it should be re-introduced again, as in the case of many substances it is not clear if they can reach the to top of the food chain (that is: people) through the different elements of the chain.

As a summary one can state that the monitoring of the drinking water is extremely important since everybody drinks it every day, therefore people can be subject for long term to the contaminants possibly present in the water. In our days research sees the potable water not only as a substance. It rather examines the effects of more and more compounds detected in the drinking water on the different groups of living beings. This is indispensible if we want to protect our health and also the health of the generations to come.

Acknowledgements
This study has been prepared with the support of the MÖB-DAAD Projekt 29836, TÁMOP-4.2.1.B.-11/2KMR-2011-0003 and Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL project supports.

Bibliography

Ankley GT, Johnson RD (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. ILAR J, 45. 4. 469–483.

Bakos K., Kovacs R., StasznyA., Kanaine Sipos D., Urbanyi B.,Muller F., Csenki Zs., Kovacs B.(2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (Daniorerio), AquaticTox., 136-137. 13-21.

Bull RJ, Birnbaum LS, Cantor KP, Rose JB, Butterworth BE, Pegram R, Tuomisto J. (1995): Water chlorination: essential process or cancer hazard? Fundam. Appl. Toxicol., 2. 155-166.

Coats J.R., Metcalf R.L.,Lu P-Y., Brown D.D., Williams J.F.,Hansent L.G. (1976): Model Ecosystem Evaluation of theEnvironmental Impacts of theVeterinary Drugs Phenothiazine, Sulfa-methazine, Clopidol, and Diethylstilbestrol, Env. Health Pers., 18. 167-179.

Csenki Zs., Zaucker A., Kovács B., Hadzhiev Y, Hegyi Á., Lefler K. K., Müller T., Kovács R., Urbányi B., Váradi L., Müller F. (2010): Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos, The International Journal of Development Biology, 54. 585-589.

Eisen JS (1996): Zebrafish make a big splash. Cell, 87. 6. 969.

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA et al (2007): Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafis, 4. 1. 21–40.

Ferard J.F., Jouany J.M., Truhaut R., Vasseur P. (1983): Accumulation of Cadmiumin a Freshwater Food Chain Experimental Model. Ecotox. and Env. Safety, 7. 43-52.

Gerhard GS, Cheng KC (2002): A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. Aging Cell 1. 2. 104–111.

Grunwald DJ, Eisen JS (2002): Timeline—Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. Nat. Rev. Genet., 3. 9. 717–724.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W et al (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol. Sci. 86. 1. 6–19.

Lieschke G. J. and Currie P. D. (2007): Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics, 8., 353-367.

Lutnicka H.,Bogacka T., Wolska L. (1999): Degradation of Pyrethroidsin an aquatic ecosystem model,Wat. Res. 33:3441-3446

Metcalf L., Kapoor P., Lu P-Y., Schuth C.K., Sherman P. (1973): Model Ecosystem Studies of the Environmental Fate of Six Organochlorine Pesticides. Env. Health Pers., 16. 35-44.

Metcalf L., Booth G.M., Schuth C.K., Hansen D.J., Lu P-Y. (1973): Uptake and Fate of Di-2 ethylhexyl Phthalate in Aquatic Organisms and in a Model Ecosystem. Env. Health Pers., 16. 27-34.

OECD Guidelines (OECD 202, OECD 203, OECD 210, OECD 212, OECD 471)

Pickhardt P.C., Folt C.L., Chen C.Y., Klaue B., Blum J.D. (2005): Impacts of zooplankton composition and algal enrichment on the accumulation of mercury in an experimental freshwater food web. Sci. of the Total Env., 339. 89-101.

Rácz G., Csenki Zs., Kovács R., Hegyi Á, Baska F., Sujbert L., Zsákovics I., Kis R., Gustafson R., Urbányi B., Szende B. (2012): Subacute Toxicity Assessment of Water Disinfection Byproducts on Zebrafish. Pathol. Oncol. Res., 18. 579-584.

Spence R, Smith C (2005): Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. Anim. Behav., 69. 1317–1323.

Spitsbergen J.M. and Kent M.L. (2003): The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research- Advantages and Current Limitations. ToxicologicPathology, 31. 62-87.

Á. Staszny, E. Havas, R. Kovács, B. Urbányi, G. Paulovits, D. Bencsik, Á. Ferincz, T. Müller, A. Specziár, K. Bakos, Zs. Csenki (2013): Impact of environmental and genetic factors on the scale shape of zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822): a geometric morphometric study. Acta Biologica Hungarica, In press.

Sujbert L, Kollár G, Ollös G, Ribári L. (1993): Measuring the genotoxic potential in two drinking water resources of Budapest in Salmonella/microsomesystem. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1. 3. 349-55.

Thouand G., (2011): Microorganisms for analysis. Anal. Bioanal. Chem., 400. 893-894.

OSZTOTT VÁLASZTÁS HATÁSA A KOCÁK KONDÍCIÓJÁNAK ALAKULÁSÁRA

Benedek Zsuzsanna[1], Kertai Zsófi[1], Nyíri András[2], Polgár J. Péter[1], Nagy Szabolcs[1]

[1]Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Állattudományi és Állattenyésztéstani Tanszék,
8360 Keszthely, Deák F. u. 16.
[2]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
benedek.zsuzsanna@georgikon.hu

Összefoglaló

Sertés esetében az osztott malacválasztás alternatív technológiai lehetőségként jöhet szóba. Jelen tanulmányban az osztott választás kocák kondíciójára gyakorolt hatását vizsgáltuk.
Mai modern, nagy szaporaságú kocáink esetében gyakran jelent problémát a kocák tenyészkondíciójának megőrzése. Főleg előhasi és nagy létszámú almokat nevelő kocák esetében fordul elő, hogy a szoptatási idő végére a kocák kondíciója még ad libitum takarmányozás mellett is oly mértékben lecsökken, hogy az veszélyezteti a koca következő reprodukciós ciklusának eredményességét, és így kihathat a koca életteljesítményére is. Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy a kocák szoptatás alatti terhelésének csökkentése (alomlétszám csökkentés) kihat-e a kocák kondíciójának alakulására.
Munkánk során F1 (MNF x ML) kocák kondíciójának alakulását vizsgáltuk kondíciópontozással, valamint a hátszalonna vastagságának műszeres (ultrahangos) mérésével. Vizsgálatunkat a szoptatás alatt, majd a választást követő 4 héten át heti rendszerességgel végeztük. A beállított kocacsoport egyik felénél a malacokat 28 napos (+/- 2 nap) szoptatást követően választottuk (kontroll), míg a csoport másik felénél osztott választást alkalmaztunk. Ennek során a malacokat 21 napos testtömegük alapján „nagytömegű” és „kistömegű” csoportba soroltuk. A nagyobb tömegűeket 21 naposan (+/- 2 nap) választottuk, míg a kisebbek a kocánál maradtak még egy hétig, majd 28 naposan (+/- 2 nap) választottuk le.
Méréseink alapján megállapítottuk, hogy a szoptatás 21. napjáig a kocák kondíciója mindkét csoportban folyamatosan csökkent. A kontroll egyedeknél a csökkenés tovább folytatódott a 28 napos teljes választásig, ezek kondíciója a vemhesítési időszakban kezdett csak javulni, többnyire a termékenyítést követően. Ezzel szemben az osztottan választott kocák hátszalonna vastagsága növekedni kezdett a 21 napos részleges választás után, teljes választáskor a kondíció már javuló tendenciát mutatott, ami a termékenyítés időszakában tovább folytatódott. Az osztott választás a kocák kondíciójának alakulására pozitív hatást gyakorolt.
Kulcsszavak: osztott választás, kocák, kondíciópontozás, hátszalonna-vastagság

Effect of split-weaning on the body condition of sows

Abstract

Split-weaning (SW) is an alternative technological option for the weaning of piglets. Present study examined the effect of SW on the body condition (BC) of sows.
Nowadays pig production has often got difficulty with maintaining the BC of modern, high prolificacy breeding sows during lactation. The drop of BC by the end of suckling period mainly occurs in the case of first parity sows and those of rearing large litters, even if they are fed ad libitum. The very low level of BC can negatively effect the following reproductive cycle and the life production of a high prolificacy breeding sow. In our study we examined whether the reduction in exploitation during lactation (reducing litter size before final weaning) can affect the BC of sows.
BC changes of F1 (large white x landrace) sows were examined by body condition scoring (BCS) and also by measuring back fat thickness (BFT) by leanmeater during lactation and for 4 weeks after weaning. Data were taken weekly. The whole litters of control sows were weaned at the same time after 28 days (+/- 2 days) of lactation. The litters of treated sows were split-weaned, so at day 21 (+/- 2 days) of lactation, piglets in each treated litter were classified as either "heavy" or "light", and heavy piglets were removed from the sows. Light piglets remained with their mothers for an extra week, and then at the day of 28 (+/- 2 days) they were also weaned.
According to our measurements BFT decreased steadily until the 21st day of lactation in both groups. Concerning control sows BFT continued to decline in the overall 28-day lactation. The condition of control sows began to improve only in the weaning-to-oestrus-interval (WEI), mostly after insemination. In contrast, the BFT of split-weaned sows started to increase after the 21-day partial weaning. At the time of complete weaning the condition of treated sows has showed an improving trend, which has continued to the time of insemination. Based on our investigation it can be stated, that SW had a positive effect on the condition of sows.

Keywords: split-weaning, sows, body condition scoring, back fat thickness,

Irodalmi áttekintés

Napjainkban a genetikai előrehaladás következtében az egyre nagyobb szaporaságú kocáktól, egyre nagyobb létszámú almok várhatóak. A túl népes almokban növekszik a kissúlyú malacok száma (*Le Dividich és mtsai,* 2003). Ugyanakkor kétséges lehet, hogy ezeket a nagy almokat a kocák biztonságosan tudják-e szoptatni, képesek-e fizikailag és élettanilag egy hosszabb tejtermelési periódusra. Számos szerző megállapította, hogy a laktáció alatt gyakran ad-libitum takarmány felvétel sem fedezi kellőképpen a létfenntartási és tejtermelési szükségletet, ezért a kocák saját tartalékaikat mobilizálják, amit a hátszalonna vastagság csökkenése, kondícióromlás jelez (*Vesseur és mtsai*, 1997; *Aherne és mtsai,* 1999). *De Rensis és mtsai* (2005) kimutatták azt is, hogy a laktáció alatti hátszalonna vastagság csökkenés a reproduktív tulajdonságok (termékenyülési arány, szerviz periodus hossza) romlásával jár együtt. Adataik szerint a jobb szaporasági eredmények nem annyira a fialáskor meglévő abszolút hátszalonna vastagságtól, mint inkább a kocák kondíciójának szoptatás alatti fenntartásától várhatóak.

A tejtermelési periódus lerövidítése a kondíció drasztikus romlásának elkerülése érdekében nem jelenthet kielégítő megoldást, hiszen csökkenti az egyébként is kisebb súlyú malacok túlélési esélyeit. Nagyszámú gazdaság adatai alapján már évekkel ezelőtt kimutatták,

hogy a laktáció hosszának csökkenésével a következő fialáskori alomszám is csökken (*Prunier és mtsai, 2003*). Megállapításra került, hogy a gyakorlatban 20-28 nap közötti választás a leggazdaságosabb, mert évente kocánként ezzel a módszerrel biztosítható a legmagasabb választott malaclétszám (*Dagorn és Aumaitre,* 1979).

A fenti megállapításokból kiindulva olyan módszer kidolgozására lenne szükség, amely alkalmazásával a kocák kondíciójának drasztikus csökkenése elkerülhető a szoptatási idő lerövidítése nélkül.

Csökkent alomszámnál csökken a szopás intenzitása és ez csökkenti a tápanyag hiány kockázatát (*Prunier és mtsai,* 2003), ezáltal a kocák reprodukciós teljesítménye a választás után javul. Osztott választással erre megoldást jelenthet a kocák terhelésének a szoptatás utolsó hetében történő csökkentése.

A takarmányozás hatékonysága – különösen a vemhes állatok anyagcseréjének sajátosságai miatt –csak nehezen értékelhető objektív módon. Közvetett információként a hazánkban még csak mérsékelten elterjedt kondíciópontozás módszere kiválóan felhasználható a sertéstartás gyakorlatában, különösen a kocák energiaellátásának felmérésére. Ez azon alapul, hogy a kocák testében felhalmozott zsír mennyisége, azaz a zsírdepók mérete jelzi a mobilizálható energia, azaz a zsír mennyiségét. (*Mézes,* 2010). A zsírdepók méretének műszeres meghatározására jól használható az ultrahangos készülékkel történő hátszalonna-vastagság mérés.

Vizsgálataink során hátszalonna-vastagság mérés és kondíciópontozás segítségével igyekeztünk megállapítani az osztott választás hatását a tenyészkocák kondíciójának alakulására.

Anyag és módszer

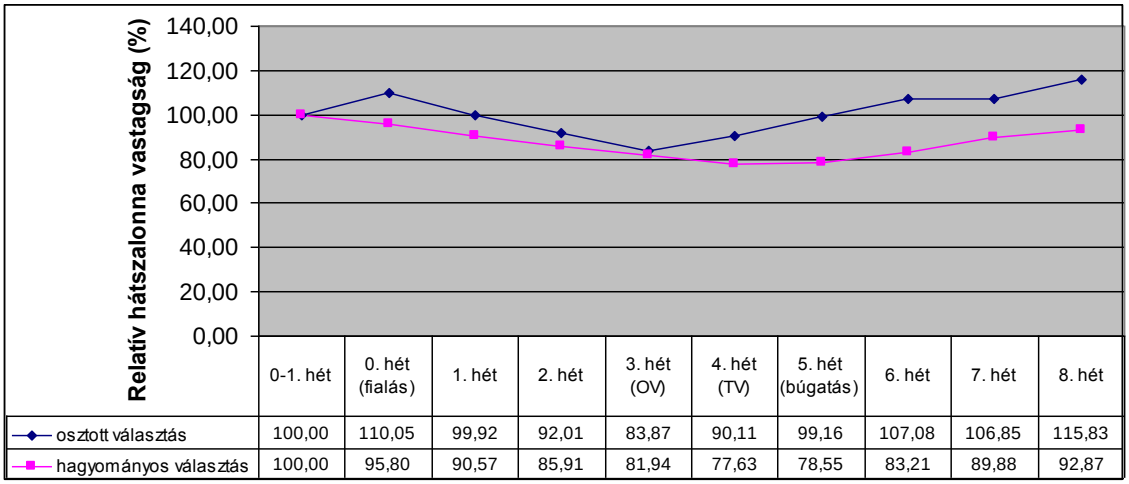
Vizsgálatainkat egy dunántúli 200 kocás árutermelő sertéstelepen végeztük, ahol összesen 38 db F1 (MNF x ML) tenyészkoca kondíció adatait vettük fel a fiaztatóba kerüléstől (fialás előtt 4-6 nap) a szoptatás alatt, majd választást követően a vemhesítő istálló egyedi állásaiban 4 héten keresztül. A vizsgálatban a kocacsoport egyik felét 28 napos (+/- 2 nap) szoptatást követően választottuk (kontroll, n=16), míg a kocák másik felénél osztott választást (OV) alkalmaztunk (n=22). Ennek során az almok malacait 21 napos testtömegük alapján „nagytömegű" (> 6kg) és „kistömegű" (< 6kg) csoportba soroltuk. A nagyobb tömegűeket 21 naposan (+/- 2 nap) választottuk, míg a kisebbek a kocánál maradtak még egy hétig, majd 28 naposan (+/- 2 nap) azokat is választottuk. A telep takarmányozási rendje szerint a kocák az egyedi fiaztató, valamint a vemhesítő állásokban egyaránt szárazdarás szoptatós keveréktakarmányt kaptak ad libitum mennyiségben. Méréseinket heti rendszerességgel végeztük, a kocák kondíció pontozásos bírálata minden esetben megelőzte a műszeres hátszalonna-vastagság milliméteres pontossággal történő mérését (Renco Lean Meter®). A hátszalonna vastagság mérése a P2 ponton, a gerincoszloptól 6 cm-re, az utolsó bordaív mentén történt.

Eredmények és értékelésük

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a vizsgálatban szereplő kocák kondíciója meglehetősen nagy különbségeket mutatott már a fiaztatóba kerüléskor (0-1. hét). Az adatok relatív szórásértéke mindkét mérési csoportnál, mindkét kondíció értékelési módszer esetében meghaladta a 20%-ot. A csoportos vemheskoca tartási rendszerben ezen a sertéstelepen nincs lehetőség egyedi takarmányozásra a vemhesség 30. napja után. A csoportosan történő vályúba adagolt etetés a csoportlétszámnak megfelelő vályúhossz esetén is okozhat fialás előtt ilyen kondícióbeli különbségeket. Vizsgálatunkban azonban a szoptatás ideje alatti, majd azt követően

a vemhesítés alatti kondícióváltozásokra fektettünk hangsúlyt. A kondíció alakulásának tendenciái jól nyomon követhetőek, ha a hátszalonna-vastagság és kondíció pontszám értékeket relatíve ábrázoljuk (1., 2. ábrák). Az adatelemzés során a fiaztatóba kerülés kondícióját vettük kiindulópontként 100%-nak, majd ehhez viszonyítva ábrázoltuk a változásokat.

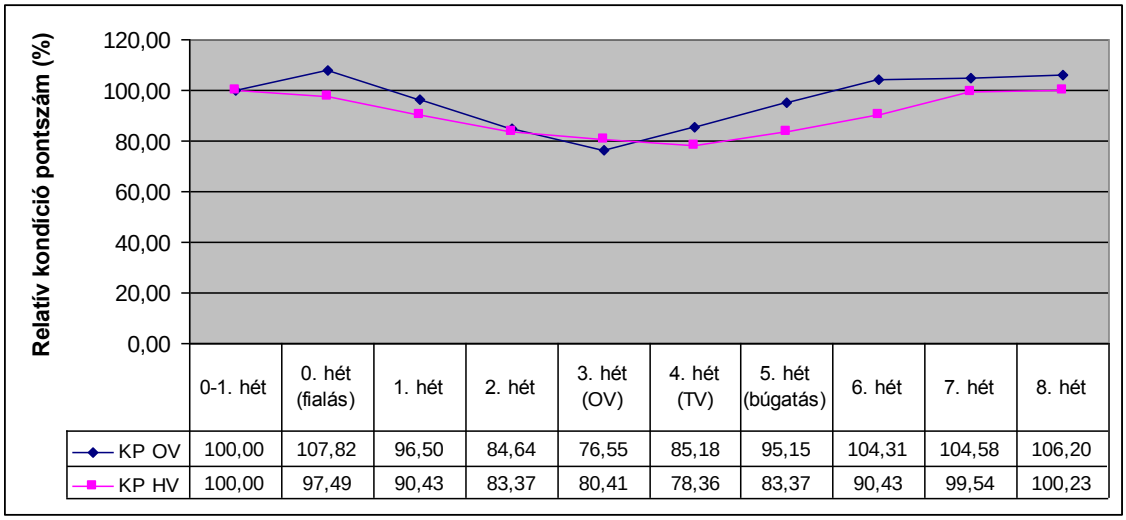
***1. ábra*: A relatív hátszalonna-vastagság alakulása a fiaztatóban és a vemhesítő istálló egyedi állásaiban**



	0-1. hét	0. hét (fialás)	1. hét	2. hét	3. hét (OV)	4. hét (TV)	5. hét (búgatás)	6. hét	7. hét	8. hét
osztott választás	100,00	110,05	99,92	92,01	83,87	90,11	99,16	107,08	106,85	115,83
hagyományos választás	100,00	95,80	90,57	85,91	81,94	77,63	78,55	83,21	89,88	92,87

Figure 1: Trends of the relative back fat thickness in the farrowing and breeding stalls

***2. ábra*: A relatív kondíció pontszámok alakulása a fiaztatóban és a vemhesítő istálló egyedi állásaiban**



	0-1. hét	0. hét (fialás)	1. hét	2. hét	3. hét (OV)	4. hét (TV)	5. hét (búgatás)	6. hét	7. hét	8. hét
KP OV	100,00	107,82	96,50	84,64	76,55	85,18	95,15	104,31	104,58	106,20
KP HV	100,00	97,49	90,43	83,37	80,41	78,36	83,37	90,43	99,54	100,23

Figure 2: Trends of the relative condition scores in the farrowing and breeding stalls

Mindkét kondíció értékelési módszer esetében jól látható, hogy a fialást követően (0. héttől) a szoptatás ideje alatt a kocák kondíciója ad-libitum takarmányozás mellett is csökken, ami megegyezik a szakirodalomban talált adatokkal (*Wesseur és mtsai*, 1997; *Aherne és mtsai,* 1999; *Prunier és mtsai,* 2001). Azon kocáknál, ahol hagyományosan választottunk (HV), ez a

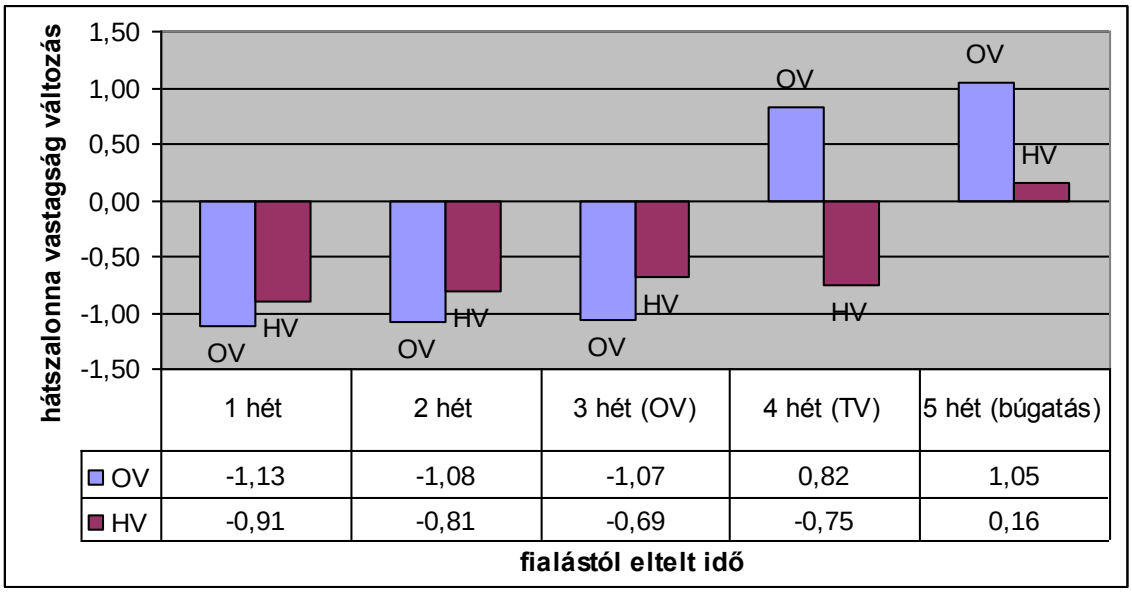
csökkenés a szoptatás mind a 4 hetére jellemző, a kondíció a szoptatás alatt végig romlik, kondíció javulás csak a teljes választást követően indul meg.

Az osztott választással értékelt kocák esetében azonban a 3. héttől, amikor is az alom nagyobb tömegű malacait leválasztjuk (OV), a kondícióban szembetűnő javulás mutatkozik. A hátszalonna-vastagság és kondíció pontszám emelkedése a szoptatás utolsó hetében megindul, majd a teljes választás után, sőt a búgatás alatt - és azt követően - is megfigyelhető. Mindez azt eredményezi, hogy a kocák a várhatónál jobb kondícióban, jobb metabolikus állapotban vannak az ivarzás időszakában és kerülnek termékenyítésre. A szakirodalmi adatok alapján (*De Rensis és mtsai*, 2005) feltételezhető, hogy a javuló kondíció jobb szaporulati mutatókat is fog eredményezni a következő reprodukciós ciklusban.

Adataink elemzése során az is megállapítható, hogy az osztottan választott kocák kondíciója a búgatást követő 4. héten (vemheskoca szállásra telepítés előtt közvetlenül) mindkét paraméter alapján meghaladta a fiaztatóba telepítéskori kondíció mértékét (hátszalonna vastagság 115,83%, kondíció pontszám106,2 %). Ez gyengébb kondíciójú, vagy fiatal kocák esetében rendkívül hasznos lehet, amikor gyakran a vemhesség alatti kondíciójavítás is elvárás.

A kondíció megítélésére alkalmazott két módszer közül az objektívebbnek tekinthető (*Maes és mtsai*, 2004), ultrahangos mérésen alapuló hátszalonna-vastagság adatokat felhasználtuk a mérési időpontok közötti, egységnyi kondíció változások jellemzésére a fialástól a búgatásig eltelt hetekben. A változásokat a 3. ábra szemlélteti.

***3. ábra*: egységnyi idő (1 hét) alatt mutatkozó hátszalonna-vastagság változás**



	1 hét	2 hét	3 hét (OV)	4 hét (TV)	5 hét (búgatás)
OV	-1,13	-1,08	-1,07	0,82	1,05
HV	-0,91	-0,81	-0,69	-0,75	0,16

Figure 3: Changes in back fat thickness on a weekly basis

Az ábrán látható osztott és hagyományos választás hátszalonna-vastagság változási adatait a mérési időpontokban páronként, kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. A szoptatás első három hetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. A szoptatás alatt mindkét csoport hátszalonna vastagsága csökkent. Bár a hagyományosan választott csoport esetében ez kisebb mértékű volt, a különbség nem volt statisztikailag igazolható. Az osztott választást követően, amikor az osztott választással értékelt kocákat kevesebb malac szopta, a

hátszalonna vastagság növekedésnek indult. A hagyományos választású csoport esetén a kocák hátszalonna vastagsága a szoptatás utolsó hetében tovább csökkent, és csak a teljes választást követően kezdett emelkedni. Az emelkedés mértéke nem érte el az osztottan választott kocák esetében tapasztalt mértéket.

A két csoport hátszalonna-vastagság változása között szignifikáns különbséget találtunk a szoptatás utolsó hetében ($p=0,01$), valamint a búgatásig eltelt héten ($p=0,05$) egyaránt. Vizsgálatunk alapján kijelenthetjük, hogy az osztott választás statisztikailag igazolhatóan javította a kocák választási és a következő búgatási időszakban tapasztalható kondícióját.

Következtetések és javaslatok

Az osztott választás a kocák kondícióját a szoptatás utolsó szakaszában pozitívan befolyásolja. A hátszalonna vastagság a nagyobb malacok leválasztása után közvetlenül növekedni kezd. Az osztott választás mintegy „flushing" hatásként érvényesül egészen a teljes választást követő ivarzásig.

A hagyományosan választott kocáknál a csupán takarmányozásra alapozott flushing csak később, és jelentősebb mértékben a búgatás ideje után jelentkezik.

Az osztott választás módszerének gyakorlati alkalmazása különösen azokon a sertéstelepeken javasolható, ahol nagy szaporaságú, respiratórikus típusú kocákkal dolgoznak, melyek kondíciója a szoptatás ideje alatt nagyon leromlik. Az osztott választással viszonylag gyorsan növelhető a zsírdepók, azaz a mobilizálható energiaraktárak mennyisége. A búgatás idejére javuló kondíció érhető el a tenyészkocáknál, felerősítve a takarmányozási flushing hatását. Ez vélhetően pozitívan befolyásolja a vemhesülést, az adott vehemben várható malacszámot, és a további termelést.

Irodalomjegyzék

Aherne, F.X., Foxcroft, G.R., Pettigrew, J.E., (1999): Nutrition of the sow. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling,W.L., Tatlor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine, eighth ed., 1029–1043.

Dagorn J., Aumaitre, A., (1979): Sow culling: Reasons for and effect on productivity. Livest. Prod. Sci., 6. 167-177.

De Rensis, F., Gherpelli, M., Superchi, P., Kirkwood, R.N. (2005): Relationships between backfat depth and plasma leptin during lactation and sow reproductive performance after weaning. Animal Reproduction Science, 90. 95–100.

Le Dividich, J., Martineau, G.P., Madec, F., Orgeur, P. (2003): Saving and rearing underprivileged and supernumerary piglets, and improving their health at weaning. In: Weaning the pig, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 361-383.

Maesa, D.G.D., Janssensb, G.P.J., Delputtec, P., Lammertync, A., de Kruif, A. (2004): Back fat measurements in sows from three commercial pig herds: relationship with reproductive efficiency and correlation with visual body condition scores. Livestock Production Science, 91. 57–67.

Mézes M (2010): A kocák kondíciójának pontozása. Kistermelők Lapja, 2010/8.

Prunier, A., Mejia-Guadarrama, C.A., Mourot, J., Quesnel, H., (2001): Influence of feed intake during pregnancy and lactation on fat body reserve mobilisation, plasma leptin and reproductive function of primiparous sows. Reprod. Nutr. Dev., 41. 333–347.

Prunier, A., Soede, N., Quesnel, H., Kemp, B. (2003): Productivity and longevity of weaned sows. In: J.R. Pulske, J. Le dividich, M.W.A. Verstegen (Eds), Weaning the pig, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 385-419.

Vesseur, P. C., Kemp, B., den Hartog, L. A., Noodhuizen, J. P. T. M.,(1997): Effect of split-weaning in first and second parity sows on sow and piglet performance. Livestock Production Science, 49. 277-285.

AZ ELVÁLASZTÁSI KOR, VALAMINT PRO- ÉS PREBIOTIKUMOK ALKALMAZÁSÁNAK HATÁSA A NÖVENDÉK HÁZINYÚL VAKBÉL MIKROBIOTÁRA

Bónai András, Bagóné Vántus Viola

Kaposvári Egyetem, Agrár-Környezettudományi Kar,
Élettani, Biokémiai és Állategészségügyi Intézet
7400 Kaposvár, Guba Sándor út 40.
bonai.andras@ke.hu

Összefoglalás

A növendék nyulak gyakran szenvednek a béltraktust érintő megbetegedésektől a választást követő időszakban. A felnevelési veszteségek csökkentése érdekében jelentős a gyógyszer felhasználás. A korábban alkalmazott antibiotikumok kiváltására egyes tartástechnológiai változtatások, valamint a pro- és prebiotikumok alkalmazása is lehetőséget nyújthat.
Kísérletsorozatunkban foglalkoztunk a választási kor, a probiotikus *Bacillus cereus* var. *toyoi* spórákat tartalmazó készítmény, a prebiotikus inulin, a magas fehérje tartalmú spirulina, valamint az antibakteriális hatású kakukkfűvel végzett takarmány kiegészítés vakbél mikrobiotára kifejtett hatásával.
Kísérleteinket Pannon Fehér házinyulakkal végeztük a Kaposvári Egyetem Tan-, és Kísérleti telepén. A telepen tartott állatok egészségügyi státusza jó volt (mortalitás <10%). A kísérlet típusától függően három, vagy négy csoportot alakítottunk ki és vizsgálatainkat a választás körüli időszakban több alkalommal megismételtük.
A korai (21 napos) elválasztás (1. kísérlet) 10%-al alacsonyabb vágási testsúlyt, nagyobb rövid szénláncú zsírsav (VFA) termelést a vakbélben, azon belül is magasabb ecetsav és vajsav, illetve alacsonyabb propionsav arányt eredményezett. Az életkor befolyásolta a vakbél és vakbéltartalom relatív súlyának alakulását, az eltérő elválasztási időpontnak erre nem volt szignifikáns hatása. A 28. és 42. nap között 14%-al csökkent a *Bacterioides*-ek száma a vakbélben.
A *Bacillus cereus* var. *toyoi* (2. kísérlet) hatására az állatok jobb egészségi állapotot mutattak a kontroll csoport nyulaihoz viszonyítva, amelynek hátterében a szignifikánsan kisebb *E. coli* terhelés állt.
A 4%-os inulin kiegészítés (3. kísérlet) esetén nem tapasztaltuk az irodalmi adatok alapján várt pozitív hatást, csökkent (11%-al) a takarmányfelvétel, nőtt a morbiditás és mortalitás, csökkent a xilanáz aktivitás (18%-al) és a vajsav aránya.
A spirulina kiegészítés (4. kísérlet) alacsonyabb VFA tartalmat eredményezett. A kakukkfű kiegészítés kis mértékben növelte a propionsav (8,1%) részarányát az összes VFA mennyiségén belül, valamint csökkentette az *E. coli* ($\log_{10}$ 3,7) baktériumok számát.

Kulcsszavak: elválasztási kor, *Bacillus cereus*, inulin, spirulina, kakukkfű

Effect of weaning age and using pro-, prebiotics feed supplementation on caecal microbiota of weaned rabbits

Abstract

Weaned rabbits often suffer from enteral diseases. The applied amount of antibiotics against the losses of fattening period is notable. One possibility to replace of medicaments is the change of breeding technology. Other option is the application of pro- and prebiotics.
In our experimental series, the effects of weaning age and the feeding supplementation with a probiotic product containing spores of *Bacillus cereus* var. *toyoi*, a prebiotic inulin, a high protein content spirulina and antibacterial thyme were tested on caecal microbiota.
Great health status (mortality <10%) Pannon White rabbits were used in experiments on experimental farm of Kaposvar University. According to the type of experiment, three or four groups were formed and measurements were repeated more than two times after weaning.
The 10% lower amount of slaughtering weight, higher VFA production in caecum, including higher proportion of acetic acid and butyric acid, lower proportion of propionic acid were caused by early (21st day) weaning age of rabbits (experiment 1).
Weight of caecum and caecal content were influenced by age of rabbits. Different weaning age had no effect on this parameters. Number of *Bacteroides* was decreased by 14% between 28 and 42 days of age.
According to the effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* (experiment 2), animals had greater health status, than the control group rabbits, due to the significant lower number of *E. coli*.
Against results of other articles, inulin (4%) supplementation (experiment 3) had no positive effect. Feed consumption was reduced (11%), morbidity and mortality were increased, xylanase activity (18%) and rate of butyric acid were decreased.
Lower level of VFA content was detected according to the spirulina supplementation (experiment 4). Due to the thyme supplementation, the rate of propionic acid (8,1%) was increased within total VFA production and number of *E. coli* (log_{10} 3,7) bacteria was reduced.

Keywords: weaning age, *Bacillus cereus*, inulin, spirulina, thyme

Irodalmi áttekintés

Az anyjuktól való elválasztást megelőzően a nyulak a tejtáplálás alatt egyre nagyobb mennyiségben fogyasztanak szilárd takarmányt, majd a választást követően jellemzővé válik a cökotrófikus viselkedés. A növendék nyulakat gyakran kínozza enterális eredetű megbetegedés a tejtáplálásról szilárd takarmány fogyasztására való áttéréskor. Az állatok egészségi állapota jelentősen befolyásolható takarmányozással és a korai (21 napos) választással (*Cesari és mtsai,* 2007). *Gallois és mtsai* (2008) a választási kor hatását vizsgáló kísérletükben megállapították, hogy a növendék nyulak jól kompenzálják a tej hiányát.

A házinyúl felnevelése során a választás utáni időszakban történik a legtöbb elhullás. A főként enterális megbetegedések hátterében gyakran a bél mikrobiota egyensúlyának felborulása áll. A házinyúl esetén a vakbélben élő mikroba közösség stabilitása jelentősen befolyásolja az állatok egészségi állapotát.

Az Európai Unió bizottsága betiltotta a preventív célból alkalmazott antibiotikumok használatát 2006. január 1-től. Ezen túlmenően, a korábban alkalmazott antibiotikumok mennyiségének mérséklését várják el a termelőktől. Ennek eredményeként az alternatív növekedésfokozók iránti érdeklődés megélénkült (*Ancsin és mtsai,* 2008).

Az antibiotikum kiváltásának egyik lehetséges módja az olyan élő mikrobát tartalmazó készítmény alkalmazása, amely a bél mikrobiota összetételének optimalizálásával biztosítja a tápcsatorna egészséges működését (*Marteau és mtsai*, 2002), ezen keresztül jótékonyan hat a gazdaállat egészségére. Ilyen probiotikus készítmény a *Bacillus cereus* var. *toyoi* spórákat tartalmazó Toyocerin®, melynek jótékony hatását alátámasztották (*Nicodemus és mtsai,* 2004*; Trocino és mtsai,* 2005).

Másik lehetőség az antibiotikum kiváltására a prebiotikumok alkalmazása, melyek szubsztrátként szolgálnak a tápcsatorna jótékony hatású baktériumai számára. Ilyen vegyület többek között az inulin, amely szerkezetét tekintve fruktóz-oligoszaharid és oldható rostként hasznosul a bélbaktériumok által. Így, befolyásolni képes ezáltal a mikrobiota összetételét (*Gibson és mtsai,* 2005). Az inulin típusú fruktánok hatását vizsgálták sertések, baromfi, borjú és kisállatok esetén (*Verdonk és mtsai,* 2005). Házinyúllal végzett kísérletben, az inulinnal kiegészített takarmány hatására a vakbéltartalom rövid szénláncú zsírsavainak mennyisége megnövekedett (*Volek és mtsai*, 2007).

A nyulak takarmányában a lejelentősebb fehérje forrás a szója. Azonban a genetikailag módosított élelmiszerekkel kapcsolatban egyre több kifogás lát napvilágot és többen próbálnak alternatív fehérjeforrást keresni a növekvő igények kielégítésére. A nyúl hízlalása során alkalmaztak *Arthrospira platensis* (spirulina) kiegészítést 5-15%-ban, amely a 9-13. hét között nem okozott mellékhatásokat (*Peiretti és Meineri,* 2008).

A növényi takarmány kiegészítők közül a kakukkfüvet vizsgálva azt találták, hogy növeli a hízlalási teljesítményt, melynek hátterében a kivonat antimikrobás hatása állhat (*Zdunczy és mtsai*, 2011), ezért alkalmas lehet az antibiotikum kiváltására. A kakukkfű alkalmazása nyúltakarmányban csökkenti a rövid szénláncú zsírsav termelését a vakbélben (*Dorman és Deans*, 2000).

Kísérletsorozatunkban (4 kísérlet) azt vizsgáltuk, hogyan lehetséges valamely technológiai módosítással, probiotikum-, prebiotikum-, vagy mikro-alga és növényi kivonattal helyettesíteni az antibiotikumok hatását a választás körüli időszakban a házinyúl esetén.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok, elhelyezés, csoportosítás

Kísérleteinket a Kaposvári Egyetem, Tan- és Kísérleti Állattartó Telepén végeztük Pannon Fehér anyanyulakkal és azok almaival. Az állatokat zárt, természetes és túlnyomásos rendszerrel szellőztetett épületben helyeztük el, napi 16 órás (5:00-21:00) megvilágítás mellett. Az egy napos, átlagos születési súlyú kisnyulakat és a szoptató anyanyulakat véletlenszerűen több csoportokra osztottuk. A nyulak tetszés szerint fogyaszthattak a takarmányból és ivóvízből. A választás a 28. életnapon történt, kivéve az első kísérletet, melyben a különböző választási időpontok (21., 28. és 35. nap) alapján képeztünk csoportokat. A vizsgálatokat a kisnyulak 14-42 napos kora között hetente végeztük (*Kovács és mtsai*, 2011).

A probiotikum alkalmazásával folytatott kísérletben (2. kísérlet) a szoptató anyanyulak egy része antibiotikum mentes alaptápot (K) fogyasztott, míg a másik csoport takarmányát 200 ppm Toyocerin-nel (Asahi Vet. S.A., Barcelona, Spanyolország) egészítettük ki (T), amely $2*10^5$ /g takarmány *Bacillus cereus* var. *toyoi* spóra bevitelét jelentette. A 28. napon történt a választás, melynek során mindkét csoport almait megfeleztük. Az egyik fél a korábban is fogyasztott tápot kapta (KK és TT), míg a többinél (KT és TK) tápot váltottunk (*Bónai és mtsai*, 2008).

A prebiotikum alkalmazásával végzett kísérletben (3. kísérlet), 21 napos korban az anyanyulakat és almaikat 3 csoportra osztottuk. A kontroll (K) csoport takarmánya nem tartalmazott kiegészítést. A gyógyszeres (Gy) csoport takarmánya antibiotikumot tartalmazott. A harmadik csoport takarmányát inulinnal egészítettük ki 4%-ban. A kisnyulak hozzáfértek az anyanyúl takarmányához. A 28, 35, 42 napos nyulakat vizsgáltuk (*Bónai és mtsai*, 2010).

A negyedik kísérletben szintén három csoportot alakítottunk ki a 21. életnaptól kezdődően. A kontoll (K) csoport esetén nem alkalmaztunk kiegészítést. A második (S) csoport takarmányát 5% spirulinával, míg a harmadik csoport takarmányát 3% kakukkfűvel (T) egészítettük ki. A 35, 56, 77 napos nyulak vizsgálatát végeztük el (*Bónai és mtsai,* 2012).

Mintavétel, vizsgálatok

A kísérleti napokon véletlenszerűen 6 állatot választottunk csoportonként, melyeket CO_2-os túlaltatást követően elvéreztettünk. A tápcsatornát kiemeltük a hasüregből és izoláltuk a vakbelet. A szerv falának megnyitását követően a vakbéltartalomból mintát vettünk mikrobiológiai tenyésztés, rövid szénláncú zsírsav tartalom meghatározás, valamint egyes rostbontó enzimek aktivitásának meghatározása céljából. A vakbéltartalom pH-értékét (Shindengen, Isfet KS 701) megmértük.

Az 1 g vakbéltartalomból decimális hígítási sort készítettünk. A steril Petri-csészébe öntött és megszilárdult agar lemezek felületén szélesztést végeztünk a különböző mértékű hígításokból. Az aerob baktériumokat tápagaron, vagy véres agaron tenyésztettük. A mintákat 37^{o}C-on, aerob körülmények között inkubáltuk, 48 órán keresztül. Az *Escherichia coli* és a coliform baktériumokat Chromocult differenciáló táptalajon (Merck Kft. 100850) 37^{o}C-on, 24 órán át, aerob körülmények között tenyésztettük. A szigorúan anaerob baktériumok tenyésztéséhez Schaedler-agart (Biolab Zrt. SAA20500) használtunk, melynek szelektivitását eszkulinnal, neomycinnel és vas-ammónium citrát hozzáadásával növeltük. A Petri-csészéket anaerob tenyésztő edényekbe helyeztük, melybe Anaerocult A (Merck Kft. 113829) gázfejlesztő tasak segítségével biztosítottuk az anaerobiozist, amit Anaerotest indikátor (Merck Kft. 115112) segítségével ellenőriztük. A minták inkubálása 37^{o}C-on 96 órán kersztül történt.

Az inkubációs idők leteltével a telepképző egységek számát meghatároztuk (ISO 4833:2003) Acolyte telepszámláló készülék (Aqua-Terra Lab, Colony Counter) segítségével. A baktériumszámot $\log_{10}$-ben fejeztük ki 1 g vakbéltartalom mintára vonatkoztatva.

A vakbéltartalom minták rövid szénláncú zsírsav tartalmát gázkromatográffal (Shimadzu GC 2010, Japán) a KE-ÁTK, Kémiai- és Biokémiai Tanszéken határozták meg.

A vakbél baktériumok rostbontó enzimei közül a celluláz, a pektináz és a xilanáz enzimek aktivitását mértük közvetve. *Gidenne és mtsai* (2002) mérési módszerét módosítottuk és adaptáltuk a helyi viszonyoknak megfelelően. Így, p-benzoesav-hidroxid helyett dinitro-szalicilsavat alkalmaztunk és fotométerrel 540 nm-en mértük az abszorbanciát. A felszabadult redukáló cukor mennyiségét μmol redukáló cukor / g vakbéltartalom száraz anyag / óra mértékegységben fejeztük ki.

A kísérleteink elvégzéséhez rendelkeztünk állatkísérleti engedéllyel (No. 00618/007/SOM/2003).

Az eredmények statisztikai elemzését SPSS ver 10.0 (2002) programcsomaggal végeztük. A többtényezős variancia analízisben (GLM modell) a választási- és takarmányozási csoportok, valamint a vizsgálati időpontok voltak a faktorok. A gyakorisági eloszlások szignifikancia vizsgálatát Tukey post hoc teszttel végeztük.

Eredmények és értékelés

A házinyúllal végzett kísérletsorozatunk eredményei közül főként a vakbél mikrobiotával kapcsolatos, illetve valamilyen szempontból érdekes mérési eredményeket mutatjuk be. A fent hivatkozott cikkeinkben megtalálhatók a teljes kísérletekre vonatkozó, összes vizsgált paraméter eredményei.

A korai választás jelentősen csökkentette az öt és hat hetes növendék nyulak testtömegét a 35. életnapon választott csoporthoz képest. A különbség megközelítőleg 10% volt a 21 és a 35 napos korban választott nyulak csoportjai között (*1. táblázat*).

***1. táblázat*: A választás és a kor hatása a nyulak testtömegére (g)**

	Kor (2)					**Int. (4)**
	14	21	28	35	42	
Csoport (nap) (1)	Testtömeg (g) (3)					
21	273±35^{a}	385±44^{b}	560±70^{c}	826±129^{dA}	1062±187^{eA}	ns
28	247±49^{a}	346±67^{b}	542±68^{c}	850±133^{dA}	1068±185^{eA}	ns
35	262±32^{a}	381±42^{b}	595±52^{c}	940±75^{dB}	1175±184^{eB}	ns

Table 1: Effect of weaning and age on live weight of rabbits (g)
[1]Group according to weaning time (day),[2]Age (day), [3]weight of rabbits, [4]Interaction, [5]ns=not significant

A szigorúan anaerob baktériumok nagy mennyiségben (log_{10} 8,3) voltak jelen a 14 napos nyulak vakbéltartalmában. A 21 napos korban választott nyulak esetén az anaerob baktériumok száma jelentősen csökkent a választástást követően (log_{10} 9,5) egészen a 42 napos korig (log_{10} 7,8). A másik két választási csoport esetén a csökkenés nem volt ilyen nagy mértékű. Számuk log_{10} 8 körüli értéken stabilizálódott. A szigorúan anaerob baktériumok számának csökkenését mások is leírták (*Kovács és mtsai,* 2002*; Combes és mtsai,* 2011). *Michelland és mtsai* (2010) kísérletéhez hasonlóan a baktériumok számának változása nem korrelált a pH, vagy a VFA termeléssel.

A tejtáplálásról való áttérés szilárd takarmány fogyasztásra a 21-28 nap között megváltoztatja a tápcsatorna jellemző viszonyait (*Gallois és mtsai,* 2008). A vakbél mikrobióta főként választás után fejlődik, amely a nagyobb mennyiségű VFA termelést kiváltja, és lecsökkenti a pH-értéket a kor előrehaladtával. Alacsonyabb pH-értéket mértünk a korai választott csoportban, de a különbség nem volt szignifikáns a többi csoporthoz képest.

A korán választott csoport esetén a termelődött VFA mennyisége az egész kísérlet ideje alatt magasabb értéket mutatott, mint a másik két csoportban (*2. táblázat*). A legmagasabb értéket (100,4 mmol/l) 28 napos korban mértük a korán választott csoportban, majd ezt követően újra csökkenni kezdett ez az érték (76,6 mmol/l).

Az ecetsav és vajsav részaránya megnövekedett az összes VFA tartalmon belül, és a propionsav részaránya lecsökkent, ezzel csökkentve a C3:C4 arányt. A korai választás magasabb vajsav és alacsonyabb propionsav arányt mutatott a 28. napon ($P<0,05$). A 21 és 28 napos korban

választott csoport esetén jelentősen magasabb volt az ecetsav részaránya (78,7 és 79,8%), mint a 35 napos korban választott csoport esetén (72,4%).

***2. táblázat*: *A választási idő hatása a szigorúan anaerob baktériumok számára* (log_{10} telep/g vakbéltartalom)**

	Kor (nap) (2)					Int. (4)
	14	21	28	35	42	
Csoport (nap) (1)	Összes rövid szénláncú zsírsav mennyisége (mmol/kg) (3)					
21	42,9±7,4^{a}	58,7±9,8^{ac}	100,4±12,4^{bA}	93,3±17,9^{bcA}	76,6±6,4^{abA}	ns
28	*	*	53,27±17,2^{B}	71,9±14,3^{B}	61,5±5,7^{B}	ns
35	*	*	*	38,2±7,8^{C}	28,3±4,5^{C}	ns

$^{a, b, c}$ szignifikáns különbség a korcsoportok között (P<0,05)

$^{A, B, C}$ szignifikáns különbség a különböző választási időpontok csoportjai között (P<0,05)

Table 2: Effect of weaning age on number of strictly anaerob bacteria colonies (log_{10} colony / g chymus)

[1]Group according to weaning time (day),[2]Age (day), [3]total volatile fatty acid concentration, [4]Interaction, [5]ns=not significant, *no data

A 200 ppm Toyocerin (2*10^5 *Bacillus cereus* var. *toyoi* spóra / g takarmány) kiegészítés javította a nyulak egészségi állapotát, csökkentette a morbiditást és a mortalitást (*3. táblázat*).

***3. táblázat*: A Toyocerin kiegészítés hatása az állatok egészségi állapotára (%)**

	Kor (hét) (6)			
	4-5.	5-6.	4-5.	5-6.
Csoport (1)	Morbiditás (%) (8)		Mortalitás (%) (9)	
KK (2)	2,7	22,6^{b}	0	12,9
KT (3)	0	0	0	6,2
TK (4)	2,3	0,05^{a}	4,5	8,3
TT (5)	0	2,8^{a}	0	0,05

$^{a, b, c}$ szignifikáns különbség a takarmányozási csoportok között (P<0,05)

Table 3: Effect of Toyocerin supplementation on health status of rabbits (%)

[1]Group,[2]Control-control, [3]Contol-Toyocerin, [4]Toyocerin-control, [5]Toyocerin-toyocerin, [6]Age (week), [7]Morbidity, [8]Mortality

A coliform baktériumok jelentősen nagyobb számban (log_{10} 5,9 CFU/g chymus) voltak jelen a kontroll csoportban, mint a probiotikummal kiegészített takarmányt fogyasztó csoportokban a 21. életnapon. Az 5. hétre a Toyocerin kiegészítés mindkét csoportban (KT, TT) szignifikánsan alacsonyabb coliform számot eredményezett (log_{10} 2,0 CFU/g chymus). *Trocino és mtsai* (2005) versengést mutattak ki egyes Bacillus-fajok és enteropatogén baktériumok között. A TK csoportban tapasztalt 10^3-10^4 nagyságrend még fiziológiásnak, míg a KK csoportnban mért 10^5 körüli nagyságrend rizikófaktornak tekinthető (*4. táblázat*).

4. Táblázat: ***A Toyocerin kiegészítés hatása a vakbéltartalom coliform baktériumok telepszámára (log10 CFU /g chymus)***

	Kor (hét) (6)		
N=6	3	4	5
Csoport (1)	Coliform baktériumok száma (7)		
KK (2)	5,9±1,1[a]	3,0±0,1	5,0±0,0[a]
KT (3)		3,0±0,3	2,0±0,1[b]
TK (4)		3,0±0,2	3,3±0,3[c]
TT (5)	4,3±1,5[b]	3,0±0,1	2,0±0,0[b]

[a,b,c] szignifikáns különbség a csoportok között (P<0,05)

Table 4. Effect of Toyocerin supplementation on number of coliform bacteria colonies in chymus (log_{10} colony / g chymus)

[1]Group,[2]Control-control, [3]Contol-Toyocerin, [4]Toyocerin-control, [5]Toyocerin-toyocerin, [6]Age (week), [7]Colony count of coliform bacteria (CFU/g chymus)

A takarmány 4%-os inulin kiegészítése kedvezőtlenül hatott a nyulak egészségi állapotára. Az inulinnal kiegészített takarmányt fogyasztó nyulak több, mint 10%-ban betegedtek meg a választást követően. A kontroll csoport esetén a morbiditás 3,3%, a gyógyszeres csoport esetén 1,7% volt a kísérleti időszak alatt.

Az elhullások számát tekintve nem volt jelentős eltérés a csoportok között, azonban a takarmány fogyasztás szignifikánsan kisebb volt az inulinos csoport esetén (75,5 g/nap), mint a kontoroll (81,4 g/nap) és a gyógyszeres (84,6 g/nap) csoportok esetén (p<0,05) (*5. táblázat*).

5. Táblázat: A takarmány kiegészítés és a kor hatása az egészségi állapotra és a takarmány fogyasztásra (%, g/nap)

	Takarmány (4)			Kor (nap) (7)		RSD (8)	P-érték (9)		
	Kontroll (5)	Gyógyszeres (6)	Inulin	28-35.	36-42.		Tak.	Kor	Int.
Morbiditás (1)	3,3[A]	1,7[A]	11,7[B]	1,7[a]	15,0[b]		0,038	0,009	
Mortalitás (2)	0	0	3,3	1,7	1,7		0,130	1,000	
Tak. fogy. (3)	81,4[AB]	84,6[B]	75,5[A]	68,7[a]	92,7[b]	17,8	0,002	0,001	0,100

[a, b, c] szignifikáns különbség a korcsoportok között (P<0,05)

[A, B, C] szignifikáns különbség a takarmányozási csoportok között (P<0,05)

Table 5. Effect of feed supplementation and age on morbidity, mortality and food consumption

[1]Morbidity (%), [2]Mortality (%), [3]Feed consumption (g/day), [4]Feed, [5]Control, [6]Medicated, [7]Age (day), [8]Root Standard Deviaton, [9]P-value

Az inulin kiegészítés nem okozott jelentős különbséget a takarmányozási csoportok között az össze rövid szénláncú zsírsavak koncentrációját tekintve. Az inulinos csoportban szignifikánsan kisebb propionsav (7,15%) arányt mértünk az összes rövid szénláncú zsírsav koncentráción belül, mint a gyógyszeres csoportban (8,88%).

A vakbél tartalom xylanáz aktivitását tekintve szintén az inulinos csoportban mértük a legalacsonyabb értéket (115 µmol redukáló cukor/g száraz anyag/óra), míg a kontroll és a gyógyszeres csoport esetén ez az érték kb. 140 µmol redukáló cukor/g száraz anyag/óra volt.

6. Táblázat: A takarmány kiegészítés és a kor hatása a rövid szénláncú zsírsavak mennyiségére, a propionsav részarányára és a xylanáz aktivitásra (mmol/kg, %, µmol redukáló cukor/g száraz anyag/óra)

	Takarmány (4)			Kor (nap) (7)			RSD	P-érték (9)		
	Kontroll (5)	Gyógyszer (6)	Inulin	28	35	42	(8)	Tak.	Kor	Int.
Össz. VFA (1)	42,3	50,1	44,4	49,7	42,2	44,9	12,9	0,140	0,170	0,040
Propionsav (2)	$7,50^{AB}$	$8,88^{B}$	$7,15^{A}$	$9,09^{b}$	$7,45^{ab}$	$6,99^{a}$	2,43	0,044	0,012	0,100
Xylanáz akt. (3)	142^{B}	139^{B}	115^{A}	107^{a}	126^{a}	163^{b}	43	0,048	0,001	0,070

$^{a, b, c}$ szignifikáns különbség a korcsoportok között (P<0,05)
$^{A, B, C}$ szignifikáns különbség a takarmányozási csoportok között (P<0,05)

Table 6. Effect of feed supplementation and age on volume of volitile fatty acids, proportion of propionic acid and xylanase activity
[1]total voliatile fatty acid concentration (mmol/kg caecal digesta), [2]Propionic acid (%), [3]Activity of xylanase, [4]Feed, [5]Control, [6]Medicated, [7]Age, [8]Root Standard Deviation, [9]P-value

Az összes illózsírsav tartalmat tekintve a Spirulinával kiegészített takarmányt fogyasztó csoportban rögzítettük a legalacsonyabb értéket (31 mmol/kg). A legtöbb rövid szénláncú zsírsavat (34,3 mmol/kg) a kakukkfüves csoport vakbéltartalom mintáiból lehetett kimutatni (P=0,709) (*1. ábra*).

1. Ábra: ***A Spirulina és a kakukkfű kiegészítés hatása a vakbéltartalom rövid szénláncú zsírsav mennyiségére, 11 hetes nyulak esetén***

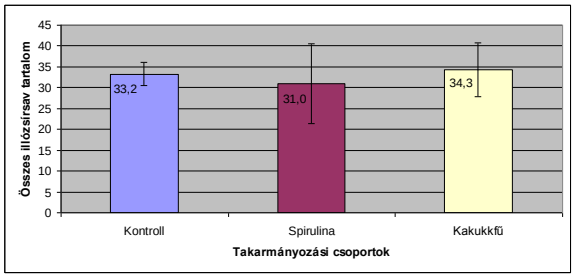


Figure 1. Effect of Spirulina and thyme supplementation on VFA content of caecal content in 11 week old rabbits

A házinyúl vakbéltartalomban legnagyobb mennyiségben előforduló illózsírsavak közül, a propionsav részarányát növelte meg a kakukkfű. A csoportok közötti különbség ugyan nem volt szignifikáns (p-értékek = ecetsav; propionsav; vajsav esetén egyenként 0,393; 0,069; 0,834), de a tendencia jól látható. A kontroll csoport mintáiban mértük a legalacsonyabb propionsav részarányt (6,97%), míg az Spirulina csoportban ez az érték 7,2 %, a kakukkfüves csoportban 8,1 % volt (*2. ábra*).

2. Ábra: A Spirulina és a kakukkfű kiegészítők hatása a 11 hetes növendék nyulak vakbél chymus legjelentősebb illózsírsavainak részarányára a minták összes illózsírsav tartalmán belül (%)

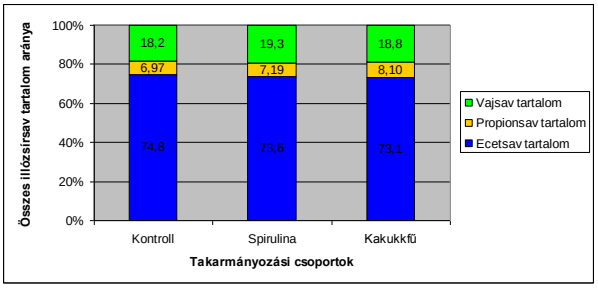


Figure 2. Effect of Spirulina and thyme supplementation on VFA content of 11 week old rabbits' caecal content

A coliform baktériumok száma a korral jelentősen csökkent, $\log_{10}$ 3,96 CFU/g-ról $\log_{10}$ 3,25 CFU/g-ra. A kakukkfűvel kiegészített takarmányozási csoport esetén a coliformok száma ($\log_{10}$ 3,7 CFU/g) kisebb értéket mutatott, mint a kontroll ($\log_{10}$ 3,95 CFU/g) és a Spirulina ($\log_{10}$ 3,92 CFU/g) csoport esetén, a különbség azonban nem volt szignifikáns (*7. táblázat*).

7. Táblázat: A takarmány kiegészítés és a kor hatása coliform baktériumok számára (mmol/kg, %, µmol redukáló cukor/g száraz anyag/óra)

	Takarmány [2]			Kor (nap) [5]			RSD [6]	P-érték [7]		
	Kontroll [3]	Spirulina	Kakukkfű [4]	35	56	70		Tak.	Kor	Int.
Coliform bakt. szám [1]	3,95	3,92	3,70	3,96[a]	4,36[a]	3,25[b]	0,88	0,000	0,574	0,305

Tak. fogy. = takarmány fogyasztás
Int. = interakció (a takarmány és kor együttes hatása)
Table 7. Effect of feed supplementation and age on coliform bacterial count
[a, b, c] szignifikáns különbség a korcsoportok között (P<0,05)
[1]Colony count of coliform bacteria (CFU/g chymus), [2]Group of feed, [3]Control, [4]Thyme, [5]Age, [6]Root Standard Deviation, [7]P-value

Következtetések és javaslatok

A korai választás szignifikánsan kisebb testtömeget okozott a kísérlet ideje alatt, azonban nem okozott jelentős változást a tenyésztett baktériumok számában, habár növelte a rövid lácú zsírsavak termelését. A *Bacillus cereus* var. *toyoi* spórákkal végzett takarmánykiegészítés kedvezően hatott az állatok egészségi állapotára. A takarmánykiegészítőként alkalmazott inulin, spirulina vagy kakukkfű nem hatott pozitívan a választott nyulak növekedésére, a vakbél mikrobiotára és a fermentációra. A spirulina kiegészítés nagyobb rövid láncú zsírsav koncentrációt eredményezett. A kakukkfű kiegészítés kis mértékben csökkentette az *E. coli* baktériumok számát. Eredményink elősegíthetik az antibiotikum használat csökkentését a házinyúl felnevelése során, valamint az alternatív megoldásokon keresztül hozzájárulhatnak az antibiotikumok kiváltásához is a nyúl ágazatban.

Köszönetnyilvánítás

Bónai András publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Bagóné Vántus Viola kutató munkája a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

Ancsin Zs., Erdélyi Zs., Mézes M. (2008) Effect of rosemary and garlic essential oils on glutathione redox system of broiler chicken. AWEITH, 4. 716-723.

Bónai A., Szendrő Zs., Matics Zs., Fébel H., Pósa R., Tornyos G., Horn P., Kovács F., Kovács M. (2008): *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®) kiegészítés hatása a nyulak vakbélflórájának összetételére és vakbél-fermentációjára. Magy. Állatorv. Lapja, 130. 87-95.

Bónai A., Szendrő Zs., Matics Zs., Fébel H., Kametler L., Tornyos G., Horn P., Kovács F., Kovács M. (2010): Effect of inulin supplementation and age on growth performance and digestive physiological parameters in weaned rabbits. W. Rabbit Sci., 18. 121-129.

Bónai A., Dalle Zotte A., Kametler L., Vántus V., Morsy W.A. Matics Zs., Dal Bosco A., Szendrő Zs., Kovács M. (2012): Dietary supplementation of spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Part 2: Effect on gastrointestinal growth, caecal microbiota and fermentation in rabbits. In: 10th WRSA, World Rabbit Congress, Sharm El Sheik, Egypt. 89.

Cesari V., Toschi I., Ferrazzi V., Cesari N., Grilli G., Lavazza A. (2007): Effect of weaning age and diet on growth performance, caecal characteristics and potential pathogenic microflora in rabbits. It. J. Anim. Sci., 6. 755-757.

Combes S., Michelland R.J., Monteils V., Cauguil L., Soulie V., Tran N.U., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. (2011): Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. FEMS Microbiol. Ecol., 77. 680-689.

Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol., 88. 308-316.

Gallois M., Le Huerou-Luron I., Fortun-Lamothe L., Lalles J.P., Gidenne T. (2008): Adaptability of the digestive function according to age ar weaning in the rabbit: I. Effect on feed intake and digestive functionality. Animal, 4. 525-535.

Gibson G.R., McCartney A.L., Rastall R.A. (2005): Prebiotics and resistance to gastrointestinal infection. Brit. J. Nutr., 93. 31-34.

Gidenne T., Jehl N., Segura M., Michalet-Doreau B. (2002): Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. Anim. Feed Sci. Technol., 99. 107-118.

Kovács M., Gyarmati T., Szendrő Zs., Bencsné K.Z., Donkó T., Tornyos G., Lukács H., Bóta B. (2002): A kérszer szoptatás és a korai elválasztás hatása a házinyúl vakbélflórájának fejlődésére. Magy. Állatorv. Lapja, 124. 742-748.

Kovács M., Bónai A., Szendrő Zs., Milisits G., Lukács H., Szabó-Fodor J., Tornyos G., Matics Zs., Kovács F., Horn P. (2011): Effect of different weaning age (21, 28 or 35 days) on production, growth and certain parameters of the digestive tract in rabbits. Animal, 6. 894-901.

Marteau P., Seksik P., Jian R. (2002): Probiotics and health: new facts and ideas. Curr. Opin Biotechn., 13. 486-489.

Michelland R.J., Combes S., Monteils V., Cauquil L., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. (2010): Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. Anaerobe, 16. 61-65.

Nicodemus N., Carabano R. (2004): Performance response of doe rabbit to Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) supplementation. W. Rabbit Sci., 12. 109-118.

Peiretti P.G., Meineri G. (2008): Effect of diets with increasing levels of Spirulina platensis on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. Livest. Sci., 118. 173-177.

Statistical Package of Social Sciences (SPSS) 2002. For Windows (Microsoft) Inc., version 10.0

Trocino A., Xiccato G. (2005): Effect of diet supplementation with Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on performance and health pf growing rabbits. W. Rabbit Sci., 13. 17-28.

Verdonk J.M.A.J., Shim S.B., Leeuwen P., Verstegen M.W.A. (2005) Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. Brit. J. Nutr., 93. 125-138.

Volek Z., Marounek M., Skrivanova V. (2007): Effect of a starter diet supplementation with mannan-oligosaccharide or inulin on health status, caecal metabolism, digestibility of nutrients and growth of early weaned rabbits. Animal, 1. 523-530.

Zdunczy P., Matusevicius P., Juskiewicz J., Jeroch H., Jankowski J., Zdunczyk Z. (2011): Gastrointestinal tract response to dietary probiotic (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) and phytogenic preparation containing herbs, and spices and essential oils in growing white New Zealand rabbits. Archiv fur Geflugelkunde, 75. 125-131.

A CSÜLÖKSZARU KEMÉNYSÉGMÉRÉS MÓDSZERTANA – A NEDVESSÉGTARTALOM BEFOLYÁSOLÓ HATÁSA –

Demény Márton, Csatlós Eszter, Tőzsér János

Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet, Szarvasmarha- és Juhtenyésztési Tanszék
2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.
demenymarton@freemail.hu

Összefoglalás

Hazánkban is mint külföldön, a tejelő szarvasmarha gazdaságokban már állományszintű megbetegedéssé vált a sántaság, mely szoros összefüggésben van a szaru minőségével. A szaru minőségét jellemzi annak keménysége, pigmentáltsága, kémiai összetétele és víztartalma (*Györkös és Báder*, 2002). Dolgozatunk célja a csülökszaru keménysége és nedvességtartalma közötti összefüggések vizsgálata volt. Vizsgálataink során összesen 10 mintán végeztünk méréseket, melyek 5 holstein-fríz tehén ugyanazon csülkének oldalfali és talpi szarujából származtak. A minták egy Dremel 300-as géppel, és a csülökápolás során használatos fogóval lettek kivágva. A vizsgálat kezdetén megmértük a légszárazra szárított minták súlyát (g), nedvességtartalmát (%) és keménységét (ShoreD). Ezt követően a minták áztatva voltak, mely során az első órában 20 percenként, majd 24, 49, 72 és 216 óra (9nap) elteltével is elvégeztük a méréseket (súly, nedvesség, keménység). Eredményeink alapján megállapítható, hogy a nedvességtartalom növekedésével csökken a szaru keménysége, továbbá hogy idővel a vízfelvétel mértéke is csökken, majd megáll a szaru vízzel történő telítődésekor. A nedvességtartalom tehát nagyban befolyásolja a keménységet. A csülökszaru „in vivo" keménységmérése csak a nedvességtartalom pontos befolyásoló hatásának ismeretében teljes, ezért további vizsgálatok végzése szükséges.
Kulcsszavak: sántaság, csülökszaru keménység, csülökszaru nedvességtartalom

Methodology of claw horn hardness measurements – Effect of moisture content –

Abstract

In Hungarian farms such as abroad lameness are increasing, and cause big problems, which is very close connection with claw horn quality. Claw horn quality characterized by pigment content, chemical composition and water content (*Györkös & Báder*, 2002). This study aims to investigate the connection between claw horn hardness and water content. Ten samples were measured from 5 Holstein-Friesian cattle wall and sole horn. Sampling was done with Dremel 300 variable speed rotary tool and pinchers. First of all samples were dried, and measured to weight (g), moisture content (%) and hardness (ShoreD). Thereafter samples were soaked and measured again in every 20 minutes in the first hour, and after 24, 49 and 216 hours (9 days) later. Results shows that higher level of moisture content cause lower claw horn hardness, and in time samples saturating with water, which means claw horn has maximum absorption ability. Therefore moisture content has a big effect on claw horn hardness. The "in vivo" claw horn

hardness measures are complete only if results are corrected by moisture content. This reason needs further measures to define exactly effects of moisture content on horn hardness.
Keywords: lameness, claw horn hardness, moisture content of claw horn

Irodalmi áttekintés

Magyarországon a tejelő szarvasmarha tenyésztésben az újabb tenyészcélok szerint a tejtermelés szintje, valamint a kiváló küllemi tulajdonságok figyelembe vételével a hosszú hasznos élettartam és a minél nagyobb életteljesítmény elérése a cél. A hasznos élettartamot a szaporodásbiológiai és az egészségi állapot, valamint a termelési és alkati tulajdonságok is – úgymint a láb és a lábvégek alakulása – befolyásolják (*Báder,* 2001). Ezért a láb és lábvég tulajdonságainak javítása – gyenge öröklődhetőségük ellenére – fontos feladat, melyet állatjóléti szempontok is igazolnak (*Györkös és Kovács,* 2005), amit a célpárosítások szakszerű elvégzésével, valamint tudatos szelekcióval érhetünk el (*Dohy*, 1999).

Azonban a jelenlegi hazai viszonyok között elsősorban a holstein-fríz állományokban és a tejelő szarvasmarha ágazatban, a sántaság igen gyakori probléma, és legtöbbször állományszintű betegségként fordul elő. A 2011-es év első felében a selejtezett állatoknak több mint 24%-át sántaság miatt kellett kényszervágni. A mozgászavarok több mint 80%-át a lábvégek rendellenességei és betegségei okozzák (*Györkös,* 2011). Hazai viszonyok között a sántaság okozta veszteség tehenenként átlagosan 20 ezer Ft-ra tehető (*Györkös és Báder,* 2002). A sántaság kialakulását elsődlegesen befolyásoló tényezők a tehén komfort, a genetika, a takarmány beltartalma és a takarmányozás gyakorlata (*Lehoczky*, 2010). A szarvasmarha vele született adottságai közül tehát a lábvég minősége és a csülökszaru ellenállósága, ami elsődlegesen befolyásolja a sántaságra való hajlamot. A csülökszaru minőségét, annak pigmentáltsága, kémiai összetétele, keménysége és víz (%) tartalma határozza meg (*Györkös és Báder*, 2002). A szaru keménysége általánosan jellemzi annak ellenállóságát, azonban ez csak a szaru nedvességtartalmának ismeretében értékelhető igazán. Ezért fontos a szaru nedvességtartalma és keménysége közötti kapcsolatok felderítése, mellyel már több külföldi tanulmány is foglalkozott.

A nedvességtartalom, talpvastagság és a talpi sérülések összefüggését *Amstel és mtsai* (2004) vizsgálták a vékony talpú tejelő tehenek esetében. A vékonytalpú tehenek közül 26, átlagosan az elülső lábára 30%-ban kóros elváltozásokat (talpfekély 28%, talp és fehérvonal találkozásánál sérült körmök 78%) mutató egyedeket, illetve 16 véletlenszerűen kiválasztott tehenet vizsgáltak. A vékony talpú tehenek csülökszaru nedvességtartalmának meghatározása során azt találták, hogy az első lábakon 37,1 +/- 0,7%, a hátsókon pedig 40,5 +/- 0,7% volt a szaru átlagos víztartalma. A random szerűen választott marhák elülső lábainak nedvességtartalma 31,08 +/- 0,93% volt, a hátsókon pedig 33,1 +/- 0,9%-os értékeket mértek. A mintavételezés szarukés használatával történt a talpi szaruból, ennek következtében azok méretben különböztek egymástól. A minták felületét szárazra törölték, súlyukat elektronikus mérleggel lemérték, majd a vágás után 48 órán belül szárítószekrényben 48°C-on 50 órán át szárították. A minták súlyát a szárítás után újramérték, és a súlyveszteség alapján számították ki azok nedvességtartalmát. Eredményeik alapján elmondható, hogy a vékonytalpú egyedek csülökszarujának magasabb a nedvességtartalma, még a mintavételi hely és a talpvastagság figyelmen kívül hagyása esetében is, ezen kívül, minden esetben magasabb nedvességtartalmat találtak a hátulsó lábak talpi szarujában.

Borderas és mtsai (2004) elsősorban a szaru vízmegkötő képessége és keménysége közötti összefüggések felderítését tűzték ki célul. Az első kísérletben különböző fajtájú vágóhídról hozott négy tehén lábvégeit vizsgálták. A bal elülső körömről a belső és külső ujjakról vettek mintákat, melyek oldalfalából három 2,5x2,5 cm-es darabokat vágtak ki. Az egyik ujjról származó három mintát szárították, másik hármat pedig áztattak. Az áztatott minták 12 órán keresztül voltak 4°C-os csapvízben, minek kezdetén (0. óra) és végén (12. óra) megmérték azok súlyát, majd Rex Type D durometer segítségével háromszor a keménységüket is. Ezután minden minta 102°C-os szárítószekrénybe került, majd 24 és 36 óra elteltével újra megmérték a minták keménységét és súlyát.

A második és harmadik kísérletben a vágott felületeken történő vízfelvételt szerették volna kiszűrni, mértékét meghatározni, ezért az egész csülök felületén történő vízfelvételt mérték. A levágott ujjak szarutokjának a száját „szilikonnal" zárták el, majd egy 600ml-es tartályban áztatták azokat. A 2. kísérlet során mindezt egy 5°C-os szobában, míg a 3. kísérletnél egy 20°C-os szobában végezték el. A csülkök másik felét a konténer mellé tették, nem áztatták, csak kontrollként mérték. A csülökkeménységet nyolc ponton (3 oldalfali, 3 hordozószél menti, 2 talpi) vizsgálták, először az áztatás előtt, majd ismételve 4, 8, 12, és 24 óra elteltével. Eközben mérlegelték is a mintákat, az első négy órában óránként, majd 6, 8, 10, 12 és 24 óra elteltével újra.

Eredményeik alapján azt állapították meg, hogy az áztatott minták az első egy órában vették fel az összes abszorbeált víz 30%-át, és az első négy órában az összes 50%-át. A kiszáradás folyamata viszont lassabb volt a vízfelvételnél, a minták nagyságrendileg nyolc óra alatt adták le a felvett víz 50%-át. A különböző hőmérsékleten végzett kísérleteknek nagy jelentősége nem volt. Keménységméréseik során kimutatták, hogy a fal a legkeményebb és a talp a legpuhább terület, annak ellenére, hogy az áztatás során a köröm minden része felpuhult. Azt is megfigyelték, hogy a vízfelvétel mértékével arányosan csökken a szaru keménysége. Következtetéseik alapján a sántaság elkerülése érdekében a teheneket jó kondícióban, és lehetőség szerint minél szárazabb helyen kell tartani.

Magyarországon *Szórádi* (2002) végzett hasonló kísérleteket juhoknál, ahol 16 merinó juh csülkének mintáit áztatta 2, 4 és 6 órán keresztül, majd megmérte ezek tömegét és keménységét. Mindezek után 105 °C-on súlyállandóságig szárította őket majd újra mérlegelt. Az abszolút száraz minta tömegéből kivonta a még nem kezelt illetve a 3 mérési időpontban mért tömeget majd az abszolút száraz minta tömegével elosztva kapta meg a minták víztartalom százalékát. Eredményei alapján a szaru víztartalmának 1%-os növekedése a Brinnel keménységi értéket ≈1,4 N/mm^2-rel csökkenti, továbbá megállapította, hogy a szaru nedvességtartalmának növekedése, a keménységi érték csökkenéséhez 73%-ban járul hozzá. A keménységi értékeket a vizsgálat kezdetén, és az áztatás során folyamatosan, majd végül a szárítás után is mérte. Ütőszilárdság méréseket is végzett 10 minta esetében, amely a szaru roncsolhatóságáról, törékenységéről adott felvilágosítást. A különböző nedvességtartalmú mintákon végzett ütésszilárdság vizsgálatok alapján megállapította, hogy a 7-9 %-os víztartalmú szaru az ideális.

Demény és mtsai (2012) holstein-fríz és magyartarka tehenek hegyfali és talpi szarujából vett mintákon vizsgálta a szárítás hatását a keménységi értékekre. Eredményeik alapján megállapítható volt, hogy a hegyfali minták keményebbek a talpi szaru mintáinál, és hogy a kiszárított szaru szintén minden esetben keményebb.

Vizsgálataink célja, a csülökszaru nedvességtartalma és keménysége közötti összefüggések megállapítása volt, hegyfali és talpi szaruminták áztatása során.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat labor körülmények között, átlagosan 18- 20°C-on végeztük. A mintákat 5 holstein-fríz tehéntől származó lábvég bal első csülök külső ujjának oldalfali és talpi részéből vágtuk ki egy Dremel 300-as multifunkciós géppel, és szarucsípő fogó segítségével. Az oldalfali mintákat a pártaszél alatt, az oldalfal közepéről, míg a talpi mintákat az *Amstel és mtsai* (2004) által meghatározott talpszaru részei közül, a talp elülső csúcsi részéből vágtuk ki *(1. kép)*.

1. kép: **A mintavételi helyek (1. hegyfal, 2. talp)**



Picture 1.: The places of sampling (1. horn wall, 2. sole)

A szaruminták ezután szárítószekrénybe kerültek 80°C-on 300 percre (*Pék*, 1977), ahol légszárazra szárítottuk őket, majd megmértük a minták súlyát (g), nedvességtartalmát (%) és keménységét (ShoreD). Minden mintán (5 db oldalfali, 5 db talpi) 10-szer ismételt keménység, és 3-szor ismételt nedvességmérést végeztünk, melyeknek átlagaival számoltunk. Ezek után áztató tégelybe tettük őket, majd az első órában 20 percenként, később pedig 24, 48, 72 és 216 óra elteltével is elvégeztük a vizsgálatokat.

A keménység méréseket SA-HDD Shore D típusú digitális műanyag keménységmérő műszerrel mértük. A készülék a keménységi értékeket 0-100-ig terjedő skálán méri, ahol 0 Shore D azt jelenti, hogy a behatoló test (ami egy 50 N erővel terhelt 1,1 mm átmérőjű, 2,5 cm hosszú, 30°-os nyílásszögű, 0,1 mm csúcsátmérőjű csonka kúpban végződő tű) teljesen belenyomódik az anyagba. Ha azonban 100-as értéket mérünk, az azt jelenti, hogy a tű nem tudott belenyomódni a mérendő anyagba. A minták tömegét 2 tizedes jegy pontosságú digitális mérleggel, a szaru víztartalmát pedig digitális nedvességmérő műszerrel mértük, mely %-ban adta meg az eredményeket. A mért súlyokból később szintén nedvességtartalmat számoltunk.

Az adatok kiértékeléséhez SPSS 18. programot alkalmaztunk, mely során General Linear Modellt használtunk annak meghatározására, hogy a Shore D értéket és a víztartalmat milyen módon befolyásolja a mintavétel helye, és a szaruminták áztatásának ideje. A nedvesség és keménységi értékek közötti összefüggésekre korreláció analízist, és Pearson-féle korrelációs együtthatót számoltunk.

Eredmények és értékelés

A légszáraz hegyfali minták 81,2 és 87,48 Shore D, míg az áztatás végén 61,59 és 68,71 Shore D értékek között alakultak. Míg a talp esetében a légszáraz minták 79,45 és 84,12 Shore D értékek között, az áztatás végeztével pedig 41,78 és 46,73 Shore D között voltak.

Mindkét vizsgált paraméter (Shore D érték és víztartalom) normál eloszlást mutatott így a GLM alkalmazása megalapozott volt, mely során azt vizsgáltuk, hogy a Shore D érték és a víztartalom, mint függő változókat milyen módon befolyásolja a mintavétel helye, és az áztatás ideje. A Leven's próba a víztartalom % (F=1,70; P=0,14) és a Shore D átlagos keménység (F=0,58; P=0,77) esetében is igazolta, hogy az egyes csoportok között a függő változók hibavarianciái homogének. A Shore D érték és a nedvességtartalom esetében is a statisztikai próba Ho hipotézise elvethető, mert a mintavétel helyének és az áztatás idejének szignifikáns hatása volt azok alakulására *(1. táblázat)*.

***1. táblázat*: A vizsgált paraméterek közötti hatások**

		F-érték	P-érték
MINTA HELYE	Víz % átlag	142,96	0,00
	Shore D átlag	739,17	0,00
IDŐ	Víz % átlag	8,77	0,00
	Shore D átlag	9,21	0,00

Table 1.: Tests of between-subjects effects

A páronkénti összevetések során azt az eredményt kaptuk, hogy a két mintavételi hely eredményei között - mindkét paraméter esetében - érdemi különbség mutatható ki (P=0,00; α=0,05), tehát a hegyfali minták statisztikailag igazoltan keményebbek, még változó nedvességtartalom esetében is. Hasonló értékeket kaptunk az áztatási idők, és a Shore D, és áztatás idejének összevetésénél is, minek alapján megállapítható, hogy a különböző mérési időpontok között érdemi különbség van mind a keménységben, mind a nedvességtartalomban.

A szaru víztartalma és Shore D keménységi értéke között szoros negatív korrelációt találtunk, ami a hegyfal esetében r=-0,91, a talpszaru esetében pedig r=-0,97 volt. A Pearson-féle korrelációs együttható alapján, a szaru víztartalmának 1 %-os növekedése, a szaru hegyfalának keménységében 0,55, míg a talp esetében 1,10 Shore D keménységi érték változást eredményezett *(1., 2. ábra)*. Szórádi (2002) a szarufal esetében 1%-os nedvességtartalom változásra 1,4 N/mm^2 Brinell keménységi érték változást határozott meg. A determinációs koefficiens alapján a szarufal víztartalmának a növekedése a szaru keménységének csökkenéséhez hegyfali mintáknál 81%-ban – szemben Szórádi (2002) 73%-os értékével –, a talpi szaru esetében pedig 90%-os mértékben járult hozzá.

Eredményeink alapján megállapítható volt az is, hogy a 9 nap áztatás időszakában összes felvett víz 25,9%-át az első órában, és 59,1%-át az első 24 órában vették fel az oldalfali minták. A talp esetében ugyan ez hasonlóan alakult, ott az első órában az összes felvett vízmennyiség 17,9%-át, míg az első 24 órában pedig 59,8%-át vették fel. Hasonló eredményekre jutottak *Borderas és mtsai* (2004) is, akik az egész csülköt vizsgálva azt találták, hogy az összes abszorbeált víz felvételének a 30%-a az első órában, míg 50%-a az első négy órában történt.

***1. ábra:* Az oldalfal keménysége és nedvességtartalma közötti összefüggések**

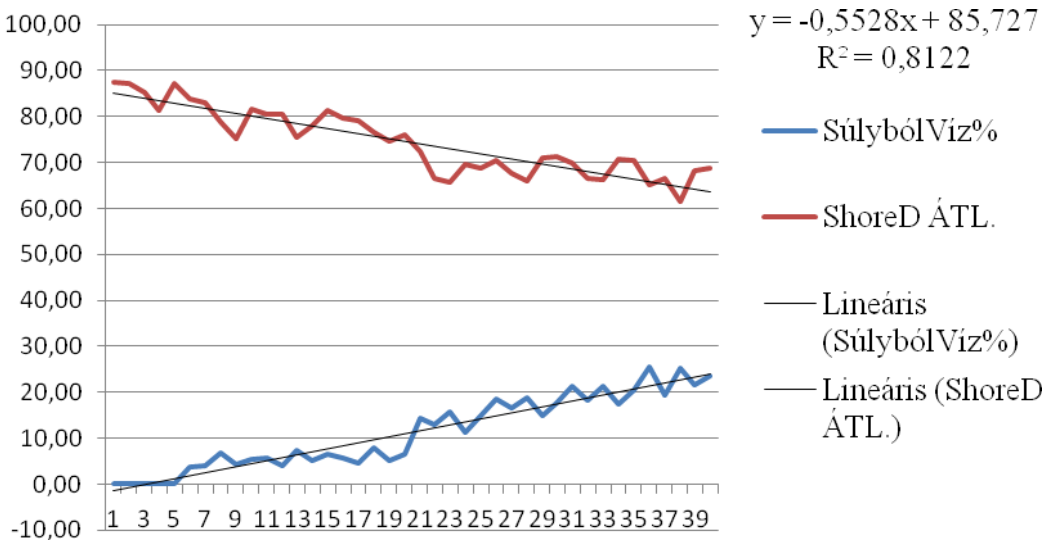


Figure 1.: Correlation between hardness of claw wall and moisture content

***2. ábra:* A talp keménysége és nedvességtartalma közötti összefüggések**

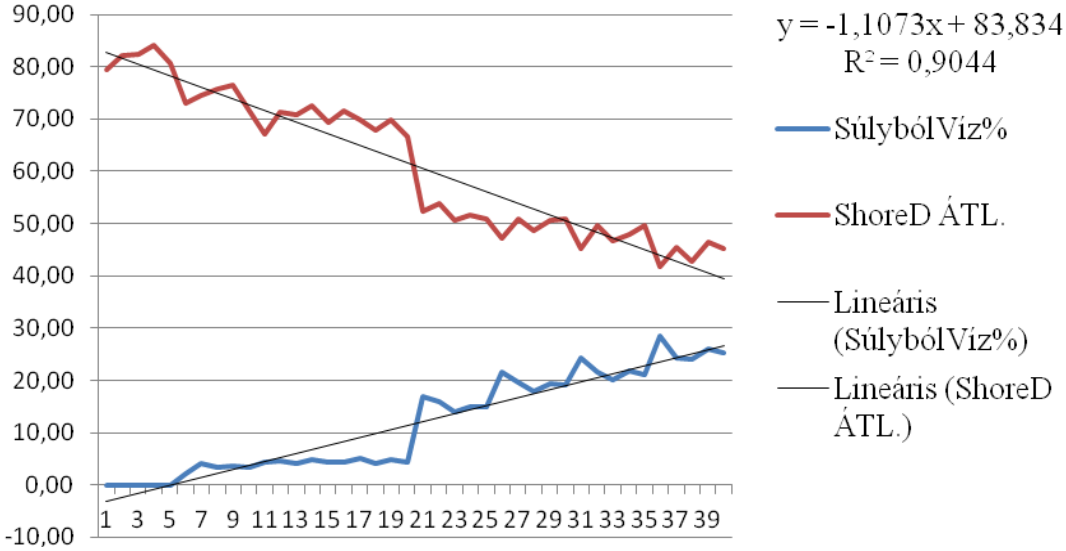


Figure 2.: Correlation between hardness of sole horn and moisture content

A nyersadatokon is és az azt ábrázoló *3. ábrán* is jól látszik, hogy a különböző időközönként nedvességmérő műszerrel mért eredmények egy idő után kevésbé növekednek, szinte stagnálnak, míg a súlyból számított nedvesség értékek folyamatos növekedést mutatnak. Ezt a különbséget statisztikailag nem sikerült igazolni, mert mérés közben tönkrement a műszer, így kevés adat állt a rendelkezésünkre. Azonban mégis figyelemre méltó megállapításnak mondható, miszerint a felszín hamarabb telítődik vízzel, mint az egész szaruminta.

Következtetések és javaslatok

- Eredményein alapján megállapítható, hogy a oldalfali minták keményebbek mint a talpi szaru mintái, még az áztatás során is.
- A különböző idő elteltével végzett mérések között szignifikáns különbség volt, mind nedvességtartalom, mind pedig keménység tekintetében. Ezért javasolt a további vizsgálatok alakalmával több időpontban mérni, és hosszabb ideig áztatni a mintákat.
- A szaru víztartalmában történő változás eltérő mértékben csökkenti a talpi és oldalfali minták Shore D keménységét. A számított értékekben eltérés van az irodalmakat tekintve, ezért ezzel kapcsolatban pontosabb vizsgálatok szükségesek.
- A szaruminták az áztatás kezdetén gyorsan veszik fel a vizet, és az összes felvett víz 20-30%-át az első órában abszorbeálják.
- A későbbi vizsgálatok alkalmával javasolt a nedvességmérő műszer, és a súlyból számított nedvességtartalom értékeinek objektív összevetése, annak igazolása érdekében, hogy a szaru felszíne, annak telítődése során, idővel nem vesz fel több vizet.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás „Research Centre of Excellence” *17586-4/2013/TUDPOL* és az *NTP-SZKOLL-12-P-0043* számú pályázata, és a *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázata támogatta.

Irodalomjegyzék:

Báder E. (2001): Élettartam, hasznos élettartam, Agro Napló, 5-6., 45-46.

Borderas, T.F., Pawuluczuk, B., de Passilló, A.M., Rushen, J. (2004): Claw Hardness of Dairy Cows: Relationship to Water Content and Claw lesions. J. Dairy Sci. 87. 2085-2093

Demény M., Szentléleki A., Holló G., Holló I., Póti P., Tőzsér J. (2010): Szárítás hatása szarvasmarhák csülökszaru keménységére – Módszertani elővizsgálat. XXXIII. Óvári Tudományos Nap, Állattenyésztési szekció, Mosonmagyaróvár, október 7

Dohy J. (1999): Genetika állattenyésztőknek, Mezőgazda Kiadó, Budapest

Györkös I. (2011): A tavaszi csülökápoló tanfolyam tapasztalatai, Holstein Magazin, Budapest, XIX. 3. 32-34.

Györkös I., Báder E. (2002): Csülökápolás és a sántaság megelőzése szarvasmarha állományokban. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest.

Györkös I., Kovács K. (2005): Állatjóléti fejlesztés- fenntartható szarvasmarhatartás és –tenyésztés. AWETH, 1. 173-183.

Lehoczky J. (2010): Lecture, Hoofcare. Budapest, 10. 09. 2010.

Pék L. (1977): Rácspadozatok és azok anyagainak vizsgálata. Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő

van Amstel, S.R., Shearer, J.K., Palin, F.L. (2004): Moisture Content, Thickness, and Lesions of Sole Horn Associated with Thin Sole sin Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 87. 757-763

Szórádi T. (2002): A juh fajtája, ásványianyag-ellátása és a csülökszaru minősége közötti összefüggések vizsgálata. Doktori (PhD) Értekezés, Debrecen

A CSINCSILLA TENYÉSZTÉS MAGYARORSZÁGON MÚLT – JELEN – JÖVŐ

Drobnyák Árpád, Szabó Rubina Tünde, Kustos Károly, Weber Mária

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
Drobnyak.Arpad@hallgato.szie.hu

Összefoglalás

A prém jelentése a Magyar Értelmező Kéziszótár szerint a következő: *"Szőrmének feldolgozható szőrös állatbőr."*
A hazánkban jelenleg tenyésztett prémes állatok közül a legjelentősebb a csincsilla. Magyarországon elsőként a Gödöllői Kisállattenyésztési Kutató Intézetben kezdtek el csincsillákkal foglalkozni 1967-ben. A nagyüzemi tenyésztés fokozatosan átkerült a kistermelői rétegbe az 1980-as évek végére. Az elmúlt 35 évben hazánkban a csincsillatenyésztés jelentős fejlődésen ment át. A prémeknek az állandóan meglévő gazdag társadalmi réteg a vásárlói bázisa, amely a legtöbb országban is jelen van. Ez a tényező pedig biztosíthatja az ágazat jövőjét.
A csincsillatartás és tenyésztés lehetőséget nyújt a mezőgazdaságban dolgozó emberek számára. Azoknak a gazdálkodóknak, akik képesek kitartó és komoly munka elvégzésére, biztos anyagi forrást jelenthet a csincsilla ágazat, több száz anyás nagyüzemi telep létrehozásával. Emellett azonban lehetőség van még kisebb 20–50 anyaállattal rendelkező gazdaságok létrehozására is, amelyek komoly jövedelem-kiegészítést képesek biztosítani. A tenyésztés folyamatos növekedésével pedig a kapcsolódó adminisztrációs és szövetségi tevékenységek szükségszerűen több munkaerőt igényelnek, ez pedig új munkahelyek létrejöttét is jelentené. Ezek a tényezők jelentősen hozzájárulhatnak a magyar mezőgazdaság és az ezen belül főként az állattenyésztés erősítéséhez, valamint a vidékfejlesztéshez és a vidék népességmegtartó erejének a növeléséhez is.
Ahhoz, hogy a hazai csincsilla ágazat megőrizze, valamint erősítse helyét a világpiacon, elengedhetetlen a folyamatos kutatás és fejlesztés. Ezt új technológiák bevezetésével és a már meglévő technológiák fejlesztésével valamint az állatok nemesítésével, termelőképességének növelésével lehet elérni. További munkámmal és kutatásaimmal ehhez szeretnék hozzájárulni.
Kulcsszavak: csincsilla, takarmány, prém

The breeding of long-tailed chinchilla (C*hincilla lanigera*) in Hungary: past, present and future

Abstract

Fur is a he hair-covered, dressed pelt of a mammal. Among the fur animals, the long-tailed chinchilla is the most important in Hungary. It's breeding started in 1967, in the Institute of Small Animal Research in Gödöllő. Until the1980's, husbandry was gradually replaced from large-scale production into small producers. In the last 35 years there was a significant improvement in Hungarian chinchilla breeding. The upper part of the society, present in most of the countries is the customer base of the fur, which can ensure the future of the sector.

Chinchilla husbandry and breeding gives a possibility to people working in the agriculture. To those, who are willing to work sustained and seriously, chinchilla sector with a large-scale farm with some hundred females can provide secure income. Next to it, smaller farms with 20-50 females can make considerable profit as a wage-supplementation. With enhancing the scale of the breeding, administration and other association-based duties arise, necessarily requiring manpower, which creates job opportunities. These factors can contribute to the reinforcement of Hungarian agriculture, especially animal husbandry, and consequently to rural development and is helping in retaining population of the villages.

Continuous research and development is essential for chinchilla sector to retain and confirm its place in the world market. This can be achieved by introducing new technologies and improving the already existing ones, and also by breeding the animals, selected for better production. With our further studies and researches we'd like to contribute to this.
Keywords: chinchilla, feed, fur

Irodalmi áttekintés

" A prém úgy vonzotta magához az emberi képzeletet és a birtoklás vágyát, mint az arany. "
(Dr. Holdas Sándor 1983)

A prémek megjelenésének ideje azonos az emberré válás idejével. Már az ősembereknek is szüksége volt egy olyan „eszközre" amely védelmezte az időjárástól és a bizonyos mechanikai hatásoktól is. A népesség növekedése szükségszerűvé tette, hogy újabb ruházati anyagokat fedezzenek fel. A technológiai fejlődés pedig lehetővé tette ezt. Így a prémeket fokozatosan leváltották a különböző textíliák. Ezek az állattenyésztés és a textilipar fejlődése és előrehaladása révén könnyebben hozzáférhetők és előállíthatók lettek. A XX. századtól kezdődően pedig egy új tényező, az ár jelentősége növekedett meg nagymértékben. Ezen tényezők által a prémek hasznossága visszaszorult, de új tényezők jelentek meg a jóléti társadalmak alakulásával, mint például a luxus és a fényűzés. Így manapság is érvényes, hogy a prémek használati értékükön túl drágábbak és népszerűek lettek. Nagy újdonságot jelentett, hogy a bundákat már nem szőrrel befele, hanem kifele készítették el. A prém mára már nem alapvető szükséglete az emberiségnek,

de vitathatatlan és kiemelendő az is, hogy több állatfajt annak tenyésztése mentett meg a teljes kipusztulástól.

Ugyanakkor a folyamatosan változó gazdasági világban szükség van értékálló árukra és termékekre. Az ilyen cikkek iránti kereslet folyamatosan nő. Az értéküket megtartó termékek közé tartoznak nemesfémek és a prémek, a természetes anyagok közül. A prémeknek állandóan meglévő gazdag társadalmi réteg a vásárlói bázisa, amely a legtöbb országban is jelen van, ezek közül is kiemelkednek a következő államok: Oroszország, Kína, Franciaország, Egyesült Államok. Ezek a tényezők pedig biztosíthatják az ágazat jövőjét.

A prém jelentése a Magyar Értelmező Kéziszótár szerint a következő: *" Szőrmének feldolgozható szőrös állatbőr. "*

A hazánkban jelenleg tenyésztett prémes állatok közül a legjelentősebb a csincsilla. A csincsillatartás és tenyésztés lehetőségként áll a mezőgazdaságban dolgozó emberek rendelkezésére. Azoknak a gazdálkodóknak, akik képesek kitartó és komoly munka elvégzésére biztos anyagi forrást jelent a csincsilla ágazat, akár több száz anyás nagyüzemi telep létrehozásával. Emellett azonban lehetőség van még kisebb 20-50 anyaállattal rendelkező gazdaságok létrehozására is, amelyek komoly jövedelem kiegészítést képesek biztosítani. A tenyésztés folyamatos növekedésével pedig a kapcsolódó adminisztrációs és szövetségi tevékenységek szükségszerűen több munkaerőt igényelnek, ez pedig új munkahelyek létrejöttét is jelenthetné. Ezek a tényezők jelentősen hozzájárulhatnak a magyar mezőgazdaság és ezen belül főként az állattenyésztés erősítéséhez, valamint a vidékfejlesztéshez és a vidék népességmegtartó erejének a növeléséhez is.

A prémesállat-tenyésztésnek egyetlen jelentős terméke a prém (*http 1*). A prémtermelő élőlényeket több szempontból is csoportosíthatjuk. Egyrészt rendszertani besorolásuk szerint, másrészt az elterjedési területük, valamint életterük szerint, végül pedig táplálkozásuk alapján (Holdas 1983, http 1).

A *Chinchilla lanigera* fajra a legtöbb szakirodalom a csincsilla elnevezést alkalmazza, ezért a továbbiakban én is ezt az elnevezést alkalmazom.

Napjainkban egy egységes csincsilla faj létezik a *Chinchilla lanigera*. A tenyésztés kapcsán kialakult több alfaj, de ezeknek az állományai nem maradtak meg (Holdas, 1983; Potháczky, 2013). A fentiekkel szemben Holdas Sándor 1981-ben írt könyvében több zoológusok által készített elméletről is ír. Az első szerint a Csincsilla nembe két faj és ezen belül három alfaj tartozik, a másik szerint pedig három különböző faj létezik (Holdas, 1981).

Az 1800-as évekig Európában a csincsillára és a belőle készült ruhaneműkre nem fordítottak sok figyelmet. Az 1900-as évek elejére már százezer szám érkeztek a prémek az európai aukciós házakba. Ez a természetes állomány nagymértékű pusztuláshoz vezetett, ami miatt a kihalás szélére került a csincsilla. Az 1910-es években a Dél-Amerika országok betiltották a csincsilla vadászatát és kereskedelmét. Mathias Ferrel Chapman 1919 és 1922 közötti expedíciója során 11 állatot fogott be és szállított Kaliforniába. Ez a kisméretű populáció az alapja az egész világ tenyészállományának. Később, 1930-ban egy német állatkereskedő 32 állatott csempészett ki Californiából, amelyek az európai állományt alapozták meg (*Holdas*, 1981; *Holdas*, 1983; *Potháczky*, 2013).

A csincsilla megjelenésben leginkább a mókusra vagy pelére hasonlít, bár annál nagyobb termetű, vaskosabb. Az elülső lábai rövidek, a hátsók hosszabbak és erősebbek. Az előbbieket főként evésre és ehhez kapcsolódóan fogásra használja, miközben az utóbbiakon guggol. Közlekedésre is ezeket használja, futó és ugró állat. Bozontos farka a test hosszúságának a felét is elérheti. Éjszakai életmódot folytat, ennek megfelelően nappal sziklaüregekben, repedésekben alszik és szürkületkor indul táplálékkeresésre. Természetes élőhelyére köves, sziklás terület

jellemző, gyér vegetációval. Fő tápláléka bokrok, kaktuszok gyökere, termései. Jól bírja a vízhiányt (*Potháczky* 2013, *http* 2).

Magyarországon elsőként az egykori Gödöllői Kisállattenyésztési Kutató Intézetben kezdtek el csincsillákkal foglalkozni 1967-ben. Tíz évvel később 1977-ben a Vörös Október MGTSZ-ben indult el a nagyüzemi tenyésztés Ócsán. Amely az 1980-as évekre fokozatosan átkerült egy kistermelői rétegbe. Napjainkban körülbelül 180-200 a csincsillatenyésztők száma Magyarországon. Az elmúlt 35 évben, hazánkban, a prémipar jelentős fejlődésen ment át, ami mellet nem maradt el a csincsillatenyésztés és prémfeldolgozás sem. Így napjainkra a csincsillaprém forgalmazásában vezető szerepet tölt be, valamint az élőállat előállításban is az elsők között található (*Potháczky*, 2013).

A csincsilla az emlősök osztályán belül a rágcsálók rendjéhez tartozik, ezen belül pedig a csincsillafélék családjához (*Potháczky*, 2013; *http* 3). Ebből látható, hogy távoli rokona a nyúlnak, így nem meglepő, hogy takarmányozási rendszerük hasonlatos. A csincsillák számára pelletet, lucerna pogácsát és néhány esetben magkeveréket adnak. Egy általános csincsilla keveréktakarmány beltartalmi értékei a *1. táblázatban* láthatók.

1. táblázat: **Csincsilla táp beltartalmi értékei (*Potháczky* 2013)**

Nedvesség max. (1)	10,50 %
Ny. fehérje min. (2)	19,04 %
DE nyúl min. (3)	11,30 MJ/kg
Ny. rost max. (4)	12,40 %
Ny. zsír min. (5)	3,10 %
Ny. hamu min. (6)	7,40 %
Foszfor min. (7)	0,68 %
Kalcium min. (8)	0,94 %

1. táblázat: The value of inner contents of chinchilla (Potháczky 2013)
(1) Moisture, (2) Crude protin, (3) DE rabbit, (4) Crude fiber, (5) Crude fat, (6) Minerals, (7) Phosphorus, (8) Calcium

Az *1 számú* táblázat mellett egy régebbi irdalom adatait is célszerű megemlíteni, amelyek tágabb értékeket adnak meg, nyersfehérje 14 – 18 %, nyers zsír 3 -4 %, nyers rost 14- 16 %. A granulátumok ideális meretére vonatkozóan több irodalmi adat is található, amelyk 2-3, 5 és a 12 miliméteres átmérőt fogadják el (*Holdas*, 1981). A pellet fő összetevői a különböző gabona magvak, - melléktermékek, szénalisztek és az olajiapari melléktermékek. Fontos megemlítenünk a takarmány-kiegészítőket is, amelyek az ásványi anyagokat és a vitaminokat biztosítják.

A csincsilla takarmányozás egyik kulcs tényezője a megfelelő nyersrost tartalom. A rost szükséges az állatok megfelelő emésztéséhez. Ezt a granulált takarmányok mellet kiegészítésként adott lucernával biztosítják leggyakrabban. Ezt a zöldtakarmányt régebben szálas formában etették, míg napjainkban lucerna pogcsaként juttatják az állatok elé. Napi adagja 200-300 g (*Potháczky*, 2013) más irodalom alapján 300-500 g (*Holdas*, 1981).

A csincsilla egyéb speciális igénye a fürdés. Ennek jelentősége a prém és a bőr tisztántartásában van, illetve az állatok megfelelő komfortérzetének kialakításához is szükséges. A fürdetéshez különböző homok keverékeket használnak, amelyek az alábbi feltételeknek kell megfeleljenek:

- távolítsa el az elhalt szőrszálakat és az elhalt hámsejteket is, valamint
- jó nedvszívó legyen és
- előzze meg a gombás megbetegedéseket is.

A fürdetés naponta történik állatonként 20 g homokkal és 20-35 perc fürdési idővel. Újabban különböző vizsgálatok indultak a fürdetés hatékonyságának növelésére (*Potháczky*, 2013; *Holdas,* 1981).

Következtetések és javaslatok

Ahhoz, hogy a hazai csincsilla ágazat megőrizze, valamint erősítse helyét a világpiacon elengedhetetlen a folyamatos kutatás és fejlesztés. Ezt új technológiák bevezetésével és a már meglévő technológiák fejlesztésével, valamint az állatok nemesítésével, termelőképességének növelésével lehet elérni.

A csincsillatenyésztésben a változó költségek legnagyobb részét, hasonlóan más állattenyésztő ágazatokhoz, a takarmányozás teszi ki. Ez tenyésztési módszertől függően 65-80 % is lehet. Ezért kulcsfontosságú a takarmányozási rendszerek további finomítása. Napjainkban már meghatározott a csincsilla alapvető takarmány összetevőinek értéke. Ezeken belül viszont fontos lehet az aminosav igények és a limitáló aminosavak meghatározása.

A csincsilla számára, mint már korábban említésre került, nagyon fontos a takarmányok nyersrost tartalma, ezen belül szükséges lenne meghatározni az optimális NDF, ADF, ADL tartalmat is, a még gazdaságosabb termelés érdekében.

További munkámmal és kutatásaimmal ehhez szeretnék hozzájárulni.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a publikációm elkészítésében segítséget nyújtó személyeknek, intézményeknek és pályázatoknak:
A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL című pályázat támogatta.
A munkáinkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatta
A munkáinkat NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

Holdas S. (1981): A Csincsilla tenyésztése, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
Holdas S. (1983): Prémek, szőrmék, prémes állatok Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
Potháczky L. (2013): Csincsillatenyésztés mesterfokon. Magyar Csincsillatenyésztők Országos Szövetsége, Komárom
Pusztai F. (főszerk.) (2003): Magyar Értelmező Kéziszótár, Akadémiai Kiadó, Budapest

http 1 Prémes állattenyésztés http://hu.wikipedia.org/wiki/Mez%C5%91gazdas%C3%A1g (2013. szeptember)
http 2 Csincsilla http://mek.niif.hu/00000/00060/html/023/pc002377.html (2013. szeptember)
http 3 http://hu.wikipedia.org/wiki/Csincsilla

TERMELÉSI ADATOK ELEMZÉSE CSONGRÁD MEGYE KIEMELKEDŐ HOLSTEIN-FRÍZ TENYÉSZETEIBEN

Farsang Alexandra, Mikó Józsefné Jónás Edit

Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Kar, Állattudományi és Vadgazdálkodási Intézet
6800 Hódmezővásárhely, Andrássy út 15.
mytos0613@freemail.hu

Összefoglalás

A szerzők vizsgálataikban elemezték az „A” módszerrel ellenőrzött tehenészetek legjobbjainak Csongrád megyei rangsorát, 2008 januárjától- 2012 szeptemberi időszakáig. A teljesítmények rangsorolása alapján három szarvasmarhatelepet vontak be vizsgálataikba melyek Hódmezővásárhely körzetében találhatók. Munkájuk első részében 25 szarvasmarhatelep 570 adatát vizsgálták. A rangsorolást az istállóátlag alapján végezték el. Kutatásunkban megvizsgálták, hogy a különböző telepek állományának tejtermelése („A” telep, „B” telep, „C” telep) havi szinten hogyan alakul. A regressziós egyenlet segítségével arra a kérdésre keresték a választ, hogy a telepeken milyen kapcsolat tapasztalható a fejési átlag és az istállóátlag alakulása között. A variancia analízis módszerével összehasonlították az üzemek termelését, megvizsgálták a tej beltartalmi (tejzsír%, fehérje%) értékeinek százalékos alakulását évekre majd hónapokra bontva. Arra a megállapításra jutottak, hogy bár mindhárom üzem Csongrád megye legkiemelkedőbb tehenészetei közé tartozik, közöttük mégis jelentős eltérések mutatkoznak bizonyos időszakokon belül a termelésben. A korszerű tartástechnológiával, takarmányozással fejési technológiával eredményes termelést érhetünk el, valamit a tejtermelés ellenőrzéssel ki tudjuk küszöbölni a termelést csökkentő tényezőket.
Kulcsszavak: tejtermelés, fejésiátlag, istállóátlag, tejtermelés ellenőrzés

Production data analysis in outstanding Holstein-Friesian stocks in Csongrád County

Abstract

The authors analyzed the ranking of the best dairies controlled by "A" method in Csongrád county, from January 2008-September 2012 period. According to the performance ranking three cattle farms were included in the examination; all of them are located in the district of Hódmezővásárhely. In the first part of our work we analysed 570 data from 25 cattle farms. The rankings were based on the total average. In our research, we examined how the milk production of different farms (dairy farm "A", dairy farm "B", dairy farm "C") developed on a monthly basis. Using regression equation we tried to find answers to the question, what kind of relationship there is in the milking average and the total average. Using the analysis of variance method we compared the production of the farms, we examined the chemical composition of milk (milk fat%, protein %) on a yearly then on a monthly basis. When summarizing the data of the three dairy farms we found that although all three farms belonged to the most prominent dairy farms of Csongrád County, there were significant differences between the productions of certain time periods. With the advanced technology, keeping, feeding, milking technology can achieve production efficiency, and with milk production control we can eliminate the factors that reduce production.
Keywords: milk production, milking average, total average, milk recording

Irodalmi áttekintés

A holstein-fríz, mint a világ meghatározó tejtermelő szarvasmarha fajtája több mint száz éves története során nagy utat járt be **(***allattenyeszteslap.hu, 2011***)**, felülmúlhatatlan teljesítménnyel, páratlan genetikai értékekkel rendelkezik **(***holsteinusa.com 2012***)**.. Tejhasznú fajta, amelyet 100 esztendő alatt az USA-ban és Kanadában az európai kettős hasznosítású fekete-tarka lapály fajtából tenyésztettek ki (*Guba,* 1985). A tej mennyiségére történő szelekcióval egyidejűleg a világban szinte mindenütt az ilyen jellegű a fogyasztói tejellátás kielégítésére leginkább megfelelő fajta, a holstein-fríz került előtérbe (*Dohy,* 1999; *Béri*, 2010). A fajtatiszta állomány további nemesítése, az e fajtával történő keresztezési program végrehajtása érdekében 1989-ben Magyarországon megalakult a Holstein-Fríz Tenyésztők Egyesülete (*Szmodits*, 1990). A gazdaságos termelés alapja az egészséges tehén. A megfelelő takarmányhigénia, tápanyagellátottság, takarmányozási stratégia mellett lényeges szempont a nyomelemekben gazdag takarmánykiegészítők etetése is (*Rabi,* 2008a*; Michael és mtsai,* 1996). A takarmányok minőségének javításával és e jó minőségű takarmányok etetésével növelhetjük a termelés gazdaságosságát (*Várhegyi és mtsai*, 2008). *Rabi* (2008b) azt állítja: A ma felnevelt üsző lesz holnap a gazdaság alapja, vagyis az üszőnevelés minősége meghatározza a jövő versenyképességét is. A termelés műszaki feltételeit a szarvasmarhatartásban azok az építési és istálló-, illetve településemeltetési megoldások adják, amelyek meghatározzák az állatok termelési környezetét ami a magas és jó minőségű tejtermelés alapját határozzák meg (*Patkós,* 1992; *Paulisinecz,* 2007). A szarvasmarhatenyésztésben is a haladás alapja a legjobb, legértékesebb állatok kiválogatása és használata a tenyésztésben (*Konkoly Thege*, 1955). Napjainkban a szarvasmarha törzskönyvi ellenőrzésének célja, az ellenőrzésbe vont egyedek tenyésztési és termelési tulajdonságainak szakszerű, pontos mérése, adatgyűjtésben a gondosság, mindemellett a hitelesség elengedhetetlen (*Mikóné,* 2006). A tejtermelés-ellenőrzés a gazdasági állatok tenyész- és haszon-értéke szempontjából fontos tulajdonságok egységes vizsgálatára, mérésére és kifejezésére irányuló tevékenységet végeznek.Olyan információkat nyújtanak, amelyek segítségével fenntartható és gazdaságos tejtermelést produkálhatunk (*atkft.hu, 2012).*

Anyag és módszer

A vizsgálatainkhoz szükséges termelési adatokat az Állattenyésztési és Teljesítményvizsgáló Kft. partner-tájékoztató Hírlevele alapján gyűjtöttük össze. Az „A" módszerrel ellenőrzött tehenészetek legjobbjainak Csongrád megyei rangsorát 2008 januárjától-2012 szeptemberi időszakáig elemeztük. A módszer lényege a 24 órás tejmérés, az ellenőrzések közötti átlagos intervallum 28-34 nap, évente 11-12 próbafejés végzése (*Szarvasmarha Teljesítményvizsgálati Kódex,* 2002). A teljesítmények rangsorolása alapján a három legkiemelkedőbb szarvasmarhatelepet vontuk be vizsgálatainkba. A Gorzsai Mezőgazdasági Zrt. „A" telepként, a Hód-Mezőgazda Zrt. „B" telepként, a Hódagró Mezőgazdasági Zrt. pedig „C" telepként jelöltük munkánkban. A három telep Délkelet-Magyarország meghatározó nagyüzeme. Az "A" telepen a létszám 990 holstein-fríz tehén és annak szaporulata, a "B" üzem 1500-as létszámmal számol, illetve a "C" telepen 550 holstein-fríz tehén és annak szaporulata található. Az elemzéshez SPSS for Windows 11.0 programot használtunk. Az adatokat varianciaanalízis módszerével elemeztük. A változók közötti összefüggés-vizsgálatokat korreláció-analízissel (Pearson-féle korrelációs együttható) és lineáris regresszió-analízissel végeztük. A tényleges laktációs eredményeket a RISKA telepirányítási programból gyűjtöttük össze.

Eredmények és értékelésük

Az általunk vizsgált időszakban, Csongrád megyében 25 szarvasmarha telep került az Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. által kialakított rangsorolás valamelyik helyére. A rangsorolást az istállóátlag alapján végeztük el. Kutatásunkban megvizsgáltuk, hogy a különböző telepek állományának tejtermelése („A" telep, „B" telep, „C" telep) havi szinten hogyan alakul. Az összes vizsgált elemből (n=570) csak a számunkra releváns három telep adatait vizsgálva, a legtöbb esetben (21) alkalommal az „A" telep került a rangsor első helyére, míg a "B" üzem (4) alkalommal. Az adatok alapján a „C" telep (8) alkalommal szerepelt az első helyen. A három üzem rangsorának eredményeit az *1. ábra* foglalja össze.

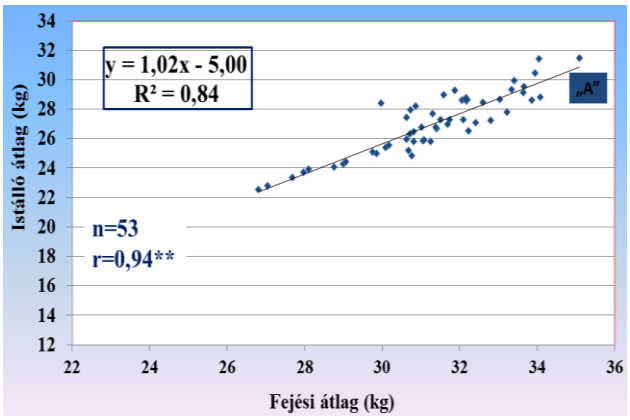
***1. ábra*: Telepek rangsorának alakulása a vizsgált időszakban**

Rangsor							
	I.	II.	III.	IV.	V.		∑
I. („A")	21	12	7	8	5		57
II.	12	21	8	1	5	…	57
III. („B")	4	9	15	9	11		53
IV. („C")	8	2	7	6	3		53
V.	6	7	3	5	7		51
⋮							
∑	57	57	57	57	57	57	570

1. Fig.: Gradiation of the batteries during the testee period

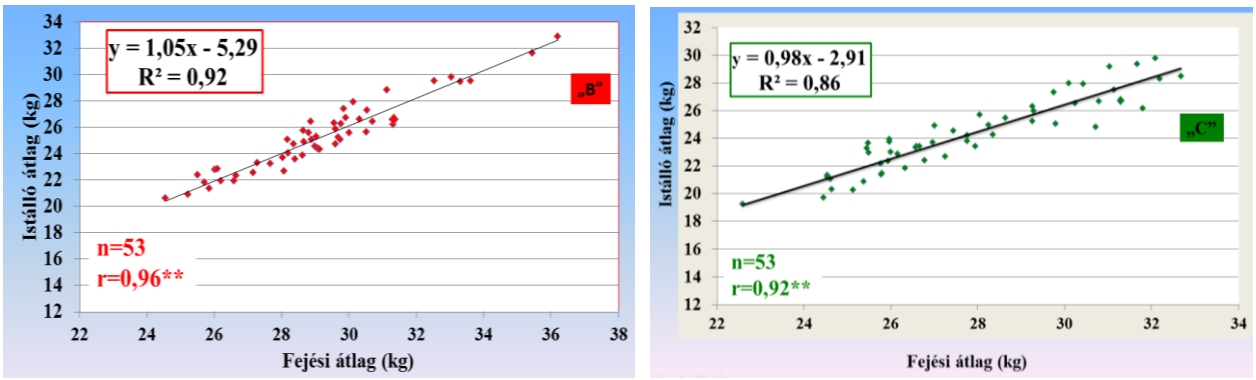
Vizsgálataink következő részében a fejési és istállóátlag közötti kapcsolatot elemeztük. A két paramétert összehasonlítottuk a korreláció-analízis és a lineáris regresszió analízis módszerével. A regressziós egyenlet kiszámításakor arra kérdésre kerestük a választ, hogy 1 kg tejmennyiség növekedés a fejési átlagban, hány kg istállóátlag növekedésével hozható összefüggésbe. A három üzem fejési és istállóátlagának kapcsolatát a regressziós egyenlet tükrében a *2. a 3. és a 4. ábra* foglalja össze.

***2. ábra*:Az „A" üzem fejési és istállóátlagának kapcsolata**



2. Fig: The connection between the average of milking and total average about " A" dairy farm

***3. és 4. ábra:* A „B" és „C" üzem fejési és istállóátlagának kapcsolata**



3. and 4.Fig: The connection between the average of milking and total average about " B"and "C" dairy farm

A korreláció-analízis módszerével a fejési és istállóátlag közötti kapcsolatot vizsgáltuk, összesen n=53 elemet vettünk figyelembe. Az "A" üzemnél a korrelációs együttható r=0,94** a "B" üzemnél r=0,96**, és a "C" telepnél pedig r=0,92**. Az alábbi eredmények arra engednek következtetni, hogy mind a három telepen nagyon szoros kapcsolat lelhető fel a két vizsgált paraméter között. Az üzemeken belül a determinációs együtthatók R^2= 0,84-0,96 között alakulnak. Az "A" telepnél 84%-ban a "B" üzemnél 96%-ban míg a "C" telepnél 86%-ban befolyásolja a fejési átlag az istállóátlag alakulását. A regressziós koefficiensek= 0,98-1,05 között alakultak. A regressziós koefficiens megmutatja, hogy 1 kg tejmennyiség növekedés a fejési átlagban hány kg tejmennyiség növekedést idéz elő az istállóátlagban. Az "A" üzemnél ezen érték 1,02 kg, a "B" telepnél 1,05 kg, a "C" üzemnél pedig 0,98 kg. A legmagasabb istállóátlag növekedést a "B" telepnél tapasztaltunk.

Végezetül a három vizsgált telep termelési paramétereit hasonlítottuk össze éves viszonylatban. Eredményeinket az *5.ábrán* fogaltuk össze. Megfigyelhető, hogy 2008-2010-ig a rangsor első helyére az „A" telep került legkiemelkedőbb tejmennyiségel eme üzem bír. Ha az öt év adatait vesszük figyelembe, jól látható, hogy minden évben kiemelkedő eredményt ért el, minimális csökkenést tapasztalhatunk a tej mennyiségének alakulásában a 2012-es évig. A "B" üzemnél a 2010-es évtől, míg a "C" telepnél a 2008-as évtől 2012-ig növekvő tendenciát mutat a tej mennyiségének alakulása. A "C" telepnél magyarázható azzal, hogy 2008-ig a napi kétszeri fejés volt jellemző a telepen, majd 2010-től áttértek a napi háromszori fejésre. A csoportpárok összehasonlítása 2011 és 2012 évben nem igazolt szignifikáns eltérést az „A" és a „C" telep termelése között. Ezekben az években a termelésbeni átlagos eltérés csak 0,15, valamint 0,25 kg volt.

***5. ábra*: A tej mennyiségének alakulása a három üzemen belül éves megoszlásban**

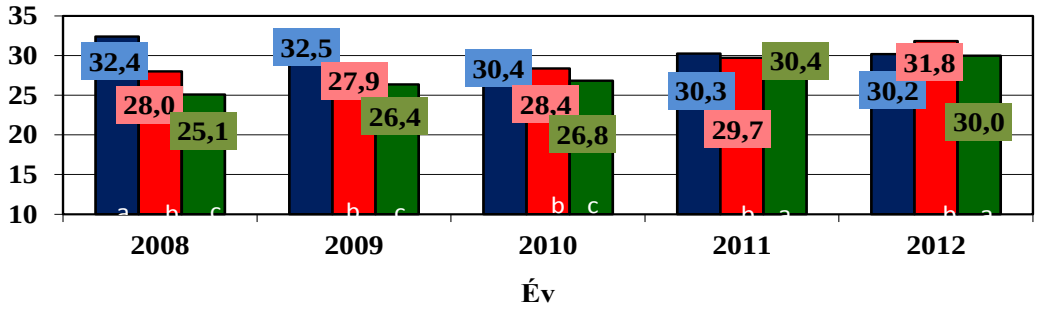


Fig. 5.: Conformation of the milk quantity in the 3 dairies based on annual division

Következtetések

Vizsgálatainkból kiderült, hogy a munkánkba bevont három üzem kiemelkedő eredményeket ért el a vizsgált időszakban, bár közöttük mégis jelentős eltérések mutatkoznak bizonyos időszakokban a termelésben.

Megállapíthatjuk, hogy a tejelő szarvasmarha ágazat szakszerű programjához és genetikai előrehaladásának érdekében a termelési adatok ellenőrzése elengedhetetlen. Ahhoz, hogy ezt a termelési színvonalat megtartsuk, illetve fokozzuk, jól átdolgozott tenyésztés-szervezést kell alkalmaznunk. Pontos nyilvántartást és törzskönyvezést kell vezetni, a termelési tulajdonságok vizsgálatát hiteles adatokkal kell alátámasztani.

A termelésellenőrző szervezetek segítségével összegyűjtött adatok tehát egyaránt felhasználhatók a tenyésztési munka javításában és az egyes tenyészetek közötti termelésbeli rangsor kialakításában.

Köszönetnyilvánítás

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL és az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat támogatta.

Irodalom jegyzék

Béri B. (2010): Különböző tejhasznosítású szarvasmarhafajták tejtermelésének összehasonlítása. Holstein Magazin, 18. 4. 28-30.

Dohy J. (1999): Genetika az állattenyésztésben. Mezőgazda Kiadó Budapest, 305.

Guba S. (1985): A szarvasmarha tenyésztése. Mezőgazdasági Kiadó Budapest, 126-372.

Konkoly Thege S. (1955): Törzskönyvezési útmutató I. Szarvasmarha. Mezőgazdasági kiadó 3-35.

Michael T., Socho A., Johnson B. (1996): A mikroelem ellátás szerepe tejelő tehenek takarmányozásában. Kérődző Workshop. 1996. május 6-7. Altech Hungary Kft. Bp. (Tanácskozás) Kiadvány

Mikó Józsefné Jónás E. (2006): A tejtermelő szarvasmarhatartás adatgyűjtésének és feldolgozásának fejlődése. Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle, 1. 1. 21-26.

Patkós I. (1992): A Magyarországon üzemelő nagyüzemi tejtermelő telepek technológiai megoldásainak vizsgálata. Állattenyésztés és Takarmányozás, 41. 3. 237-245.

Paulisinecz J. (2007): Fejlesszek, szinten tartsak vagy abbahagyjam? Holstein-Magazin, 15. 3. 20-22.

Rabi Zs. (2008a): A tehenészet jövője-borjú és növendéknevelés. Holstein Magazin, 16. 6. 31-32.

Rabi Zs. (2008b): Az antioxidánsok szerepe a kérődzők takarmányozásában. Holstein Magazin, 16. 5. 30-31.

Szarvasmarha Teljesítményvizsgálati Kódex (2002): Szarvasmarha Teljesítményvizsgálati Kódex 3. Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet 16-32.

Szmodits T. (1990): A holstein-fríz Magyarországon Az állami gazdaságok országos egyesülése Szarvasmarhatenyésztési Szakbizotságának Kiadványa, 86-204.

Várhegyi J., Várhegyi Józsefné,, Szabó F. (2008): Takarmányok táplálóértéke. Magyar mezőgazdaság, 63. 42. 18-20.

Internetes források:

http://allattenyeszteslap.hu/hu/irasok/kihivasok-mesterseges-termekenyito-agazatban

http://www.atkft.hu/hu/

http://www.holsteinusa.com/holstein_breed/breedhistory.html

CAUSES LEADING TO DEATH OF CAPTIVE TRAGOPANS IN HUNGARIAN PRIVATE BREEDING COLONIES

Gál János, Mándoki Mira

Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Department of Pathology, Division of Exotic and Wild Animal Medicine, Budapest 1078, István str. 2., Hungary
gal.janos@aotk.szie.hu

Abstract

The tragopans or horned pheasants are medium-sized pheasants whose natural habitats are to be found in the Himalayas, including North-Eastern India, Nepal, Burma, Northern Vietnam, China and Pakistan. Tragopans are among the rarest and most vulnerable species of the pheasant family. There are five species of tragopans described (*Zheng et al.*, 1985, *Zhang and Zheng*, 2002). Among viral pathogens, corona viruses were confirmed to be found in pheasants by performing RT-PCR on oral and nasal swabs of birds showing respiratory signs (*Cavanagh et al*., 2002). The mortality of adult pheasants between 1995 and 1997 was investigated by *Pennycott* (2000) and nephritis due to pheasant corona virus infection was listed as the frequent cause of death. The susceptibility of Phasianiformes to infectious laryngotracheitis virus, an avian alpha herpes virus was examined. The infected pheasants suffered from severe haemorrhagic or fibrinous laryngotracheitis (*Günther et al*., 1997). The enteric syndrome, characterised by anorexia, diarrhoea, severe dehydration and increased mortality in 6-8-day-old pheasant chicks was investigated on a game farm in Italy (*Legrottaglie et al*., 1997). Three new pheasant rotavirus strains were detected in Hungary during 2008 (*Ursu et al*., 2009). The characteristics of *Mycoplasma gallisepticum* infection were investigated in backyard game bird operations in Slovenia (*Bencina et al*., 2003). The infection was associated with severe respiratory disease and they stated 20% mortality rate amongst pheasants. *Hsieh* (2009) diagnosed avian tuberculosis in a bird sanctuary in Taiwan in two of six Swinhoe's pheasants (*Lophura swinhoii*) which pheasant is also close to extinction. *Kearns* (2003) outlines the clinical signs, diagnosis, epidemiology, treatment and control of avian mycobacteriosis. The isolated bacteria are *Mycobacterium avium*, *M. genevense* and *M. tuberculosis*. Most bird species show signs of this disease in the gastrointestinal tract and an example is given of a Cabot's Tragopan with tuberculous granulomas in the intestine, cecum, liver and spleen. Salmonella *Enterica* serovar *Agona* was isolated from commercial pheasant flocks in 1995 and 2000 (*Myoujin et al*., 2003). *Lal* (1997) reported a large number of *Heterakis tragopanis* parasites in the intestines of a dead Satyr tragopan at a Zoological Garden in England in 1942. This report, in fact, outlines the discovery of that species of Heterakis. Analysing the causes of death in adult pheasants between 1995 and 1997, histomoniasis was diagnosed in six pheasants (*Pennycott*, 2000). Most of the affected birds were in good body condition, but had multiple coalescing yellow foci up to 1.5 cm in diameter on the surface and cut surfaces of the liver. *Visvesvara* (2010) investigated the sudden death of a five month old Temminck's tragopan in a zoo in Ohio. Lesions included splenomegaly, diffuse 1mm white nodules throughout the liver, and both ceca were swollen and filled with a caseous material. *Acanthamoeba* spp. was observed in large numbers in the cultures from the liver. Unfortunately, there are not enough available data and reviews in literature about the diseases and fatal conditions in tragopans leading to death of these valuable animals.

Keywords: Fatal diseases, mortality, uricosis, tragopans, *Tragopan sp.*

Material and methods

Tragopan carcasses were collected on the territory of Hungary from 3 private pheasant keepers. The examination period lasted between 2004 and 2010. Tragopan carcasses originating from private breeders were dissected according to the regular dissection technique.
After the dissection, tissue samples were taken and fixed in 8% neutral, buffered formaldehyde for histopathological examination, or stored at -80 ˚C for later PCR examinations. The samples were routinely processed, and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were cut with a Reichert sled-type microtome (Vienna, Austria) and were stained with haematoxylin and eosin according to standard methods, for histological examination. The routine bacteriological examination was performed in aerob incubator on 37 ºC from the degenerated organs. PCR tests for the identification of possible viral (infectious bronchitis and avian nephritis) and bacterial (*Mycoplasma* and *Chlamydophila*) agents were run on the frozen samples as described previously by others (*Cavanagh et al*., 2002).

Results and discussion

21 tragopan carcasses from four private pheasant collectors throughout Hungary were examined. Temminck's Tragopan and Satyr Tragopan made up 57% and 43% of the 21 Tragopans dissected, respectively. Blyth's, Western and Cabot's Tragopan were not included in this study. The genders were almost equally represented, with 52% males and 48% females. The mean age of the Tragopans was 3.5 years (1 year old was 14%, 2 years 29%, 3 years 33%, 4 years 14%, 5 years 5%, 6 or more years 5%). In this study 42% of Tragopans were found to have kidney lesions and visceral uricosis. 67% of the 9 birds diagnosed with uricosis were male. After checking the keeping conditions for non-infectious causes of gout (cold, fasting, lack of water, hypoxia, vitamin A-deficiency, mycotoxicosis) the samples were screened for pathogens known to induce uricosis in poultry. All samples were negative for both the avian corona (IBV) and the avian nephritis virus (ANV) by using PCR method, so the presence of viral (IBV or ANV) infection was not proven. The explanation of this can be either a viral infection in early age of the birds causing degenerative changes and leading to slow destruction of the kidney parenchyma or other non-infectious causes resulting in nephrosis such as former mycotoxicosis, vitamin A deficiency or thirst due to lack of water. According to this result the background of the important cause of death in Tragopans, the uricosis remains to be unidentified. Further investigations, such as infectious experiments would be needed to clarify the exact background, but due to the specific reproduction strategy (low number (3-5) of layed eggs per nest) it is difficult and expensive to set up statistically relevant experimental conditions. Obstruction of the gastro-intestinal tract was shown in one bird. Dissection of the female Satyr Tragopan revealed a partially decomposed mouse obstructing the isthmus between the proventriculus and the gizzard. In one case, obesity and pathological simple fatty degeneration of the liver was observed in a female Temmick's Tragopan. The male Tragopans have strong sexual activity in the breeding season, and terrorize the immature females. In our cases all females were in inactive reproduction cycle and the females were not accepting the Tragopan cock. Cannibalism was the cause of death in 9% of the cases and 100% (50% Temminck's and 50% Satyr) of affected Tragopans were female. Pneumonia and air sacculitis were detected in 5% of the cases. In other samples taken from the affected parts of the lung of a male Satyr Tragopan *Chlamydophila psittaci* was found to be the causative agent. Lung and air sac mycosis were also accounted for 5% of the cases. Tragopans are very sensitive for noises and foreign sounds. These effects cause disorientation of

the birds and flustered flying in the cage, especially at night. The result is severe trauma and massive bleeding in an unfortunate case. Haematoma and posttraumatic haemorrhagic anaemia was shown in 5% of the animals as in a male Temminck's Tragopan dissection revealed a large haematoma between the superficial and deep pectoral muscles. Reproductive tract disease was observed in 5 % of the dissected birds. Dissection of a female Temminck's Tragopan showed an enlarged, misshapen oviduct with greenish-grey discolouration, and chronic fibrinous inflammation. The surrounding peritoneum also showed chronic fibrinous inflammation. The enlarged oviduct was opened, pseudo-concretion from an egg accounted for the secondary coelomitis. Acute serous rhinitis was described in 5% of the dissected birds. Transparent mucoid exudate was found in the naso- and oropharyngeal cavity of the examined male Satyr Tragopan. In samples taken for bacterial culture and PCR test *Mycoplasma* sp. was found to be the causative agent. Enteritis and dehydration were accounted for 5% of results. In samples taken from a female Satyr Tragopan *Escherichia coli* was detected as the causative agent. Tuberculosis was diagnosed in 9% of the dissected Tragopans and was caused by *Mycobacterium avium*. All of the affected birds were male Temminck's Tragopans. *Kearns* (2003) studied avian mycobacteriosis in birds with tubercules in the intestine, ceca, liver and spleen and proved *M. avium*, *M. genevense* and *M. tuberculosis* in several avian species including a Cabot's Tragopan.

The collection of these results draws the attention to the diverse pathological conditions leading to death in Tragopans. The role of veterinarians in informing the breeders on the prevention is very important to save these expensive and endangered birds. Some of the causes are environmental and can easily be avoided by proper breeding and keeping conditions, but the importance of screening for infectious agents and quarantine of the new birds is also highlighted considering the numerous pathogens causing the mortality of captive Tragopans.

References

Bencina, D., Mrzel, I., Zorman Rojs, O., Bidovec, A., Dovc, A. (2003): Characterisation of Mycoplasma gallisepticum strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. Vet. Rec., 152. 8. 230-234.

Cavanagh, D., Mawditt, K., Welchman Dde, B., Britton, P., Gough, R.E. (2002): Coronaviruses from pheasants (Phasianus colchicus) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. Av. Path., 31. 1. 81-93.

Günther, B. M. F., Klupp, B. G., Gravendyck, M., Lohr, J. E., Mettenleiter, T. C., Kaleta, E.F. (1997): Comparison of the genomes of 15 avian herpesvirus isolates by restriction endonuclease analysis. Avian Pathology, 26. 305-316.

Hsieh, Y.C., Tsai, K.Y., Wang, C.Y., Hung, C.N., Tsai, S.S., Liu, H.J. (2009): Diagnosis of avian tuberculosis in Swinhoe's pheasants using conventional and molecular-based techniques. Av. Dis., 53. 4. 629-633.

Kearns, K.S. (2003): Avian Mycobacteriosis. Recent Advances in Avian Infectious Diseases, K.S. Kearns and B. Loudis (Eds.) Publisher: www.ivis.org, Ithaca, New York, USA.

Lal, M.B. (1997): Heterakis Tragopanis: A New Species of the Genus Heterakis from the Intestine of a Crimson Horned Pheasant. Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 20. 3. 205-210.

Legrottaglie, R., Rizzi, V., Agrimi, P. (1997): Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 20. 3. 205-210.

Myoujin, Y., Yona, R., Umiji, S., Tanimoto, T., Otsuki, K., Murase, T. (2003): Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona infections in commercial pheasant flocks. Av. Path., 32. 4. 355-359.

Pennycott, T.W. (2000): Causes of mortality and culling in adult pheasants. Vet. Rec., 146. 10. 273-278.

Ursu, K., Kisfali, P., Rigó, D., Ivanics, É., Erdélyi, K., Dán, Á., Melegh, B., Martella V., Bányai K. (2009): Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. Arch. Virol., 154. 8. 1365-1369.

Visvesvara, G.S, Shoff, M.E., Sriram, R., Booton, G.C., Crary, M., Fuerst, P.A., Hanley, C.S., Garner, M.M. (2010): Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of Acanthamoeba T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (Tragopan temminckii). Vet. Parasitol., 170. 3-4. 197-200.

Zhang, Y.Y., Zheng, G. M. (2002): Artificial insemination of Cabot's Tragopan. J. Beijing Normal Univ. Nat. Sci. Ed., 38. 117-122.

Zheng, G. M., Zhao, X. R., Song, J., Liu, Z. X. and Zhou, H. Q. (1985): The breeding ecology of Cabot's Tragopan. Acta Ecol. Sin. China, 5. 379-385.

BENDŐVÉDETT FULL-FAT SZÓJA HATÁSA AZ INTENZÍVEN TEJELŐ HOLSTEIN-FRÍZ TEHENEK TEJTERMELÉSÉRE ÉS A TEJ ÖSSZETÉTELÉRE

Galamb Eszter[1], Paczolay Gábor[1], Mozsár János[1], Pócza Szabolcs[1], Ács Kázmér Csaba[1], Bustyaházai László[1], Bartyik János[2], Fébel Hedvig[3], Husvéth Ferenc[4]

[1]UBM Feed Kft., 2085 Pilisvörösvár, Fő u. 130.
[2]Enyingi Agrár Zrt., 8134 Mátyásdomb-Ágostonpuszta
[3]Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, 2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.
[4]Pannon Egyetem Georgikon Kar, Állattudományi és Állattenyésztéstani Tanszék, 8361 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.
eszter.galamb@ubmfeed.hu

Összefoglalás

A kilencvenes évek végén figyeltek fel arra, hogy a nem enzimatikus barnulási folyamat révén, az olajos magvak zsírfrakciójának jelentős része bendővédetté tehető, a bypass fehérjehányad növelése mellett. Ennek eredményeképpen a szójabab nyerszsírjának PUFA (*többszörösen telítetlen zsírsav*) tartalma ellenáll a bendőben zajló biohidrogénezési folyamatoknak és nem károsítja a rostbontás hatékonyságát.
Kísérletünket 40 holstein-fríz szarvasmarhával végeztük. Illesztett párok módszerével két csoportot képeztünk, ahol az első csoport (kísérleti) takarmányadagját 1,7 kg full-fat szójatermékkel (SoyPreme®) egészítettük ki az ellés napjától a laktáció 13. hetéig. A második csoport (kontroll) takarmányfejadagja mindvégig azonos fehérje- és energiakoncentrációval rendelkezett. Az állatok tejtermelését naponta rögzítettük, emellett kéthetente egyedi elegytej mintákat gyűjtöttünk, tejfehérje- és tejzsír-tartalom meghatározás céljából.
Nem tapasztaltunk különbséget a két csoport között a tejtermelésben a kísérlet folyamán ($P>0,05$). A kontroll csoportban azonban alacsonyabb volt a tejzsír koncentrációja a kezelés időszaka alatt ($P<0,05$). A laktáció 6. hetétől a kísérleti csoport energiára (ECM) és zsírra (FCM) korrigált tejtermelése magasabb volt a kontrollhoz viszonyítva ($P<0,05$).
Eredményeink azt igazolják, hogy az alkalmazott full-fat szója takarmánykiegészítő termék alkalmazása nem károsítja a bendőfermentációt, amit a tejzsírtermelés fokozódása mutat. Mindemellett, a védett full-fat szója alkalmazásával egyéb zsírkiegészítés nélkül biztosítható az intenzív tejtermelés energiaigénye, a tejtermelés színvonalának fenntartása mellett.
Kulcsszavak: tejelő tehén, nem enzimatikus barnulási folyamat, full-fat szója, bendőfermentáció

The effects of rumen protected full-fat soy product on milk yield and milk composition in high-producing dairy cows

Abstract

In the late ‘90s it was observed that fat content of oilseed may be protected along with increasing bypass protein proportion due to non-enzymatically browned process. As a result of this, the PUFA content of soybean can be protected against the rumen biohydrogenation pathways and the efficiency of fiber digestion is not impaired.

Our experiment was carried out with 40 Holstein Friesian dairy cows. They were divided into two groups by matched pair method. The diet of one of the groups was supplemented with 1.7 kg rumen protected soy product (SoyPreme®) from calving to 13th week of lactation. The diet of another group did not contain this soy product; however it was isocaloric, isonitrogenous during the entire experimental period. The milk yield of cows was recorded daily; furthermore milk samples were collected in every second week for analyzing milk fat and milk protein contents.
The milk production did not differ between groups during the investigation period ($P>0.05$), however, milk fat content was lower in the control group ($P<0.05$). The energy corrected milk (ECM) and fat corrected milk (FCM) production was higher in full-fat supplemented group compared to control group ($P<0.05$) from 6th week of lactation.
Our results confirm, on the one hand, that rumen protected full-fat soy product may not have an unfavourable effect to the rumen fermentation by the milk fat content. On the other hand, the energy demand and level of milk production can meet by addition of protected full-fat without additional fat supplementation.
Keywords: Dairy cow, Non-enzymatic browned process, Full-fat soy, Rumen fermentation

Irodalmi áttekintés

A kérődzők fehérjehasznosításának hatékonysága fokozható, ha a fehérjehordozóként alkalmazott szójababot, annak nedvességtartalmának szabályozása mellett hőkezeljük. A folyamatot nem enzimatikus barnulásként, vagy Maillard reakcióként ismerjük (*Lewis és mtsai*, 1989). A kilencvenes évek végén figyeltek fel arra, hogy az említett eljárást meghatározott hőmérsékleten alkalmazva, a szójabab bypass fehérjehányadának növelése mellett, annak zsírfrakciója is védetté tehető (*Abel-Caines és mtsai,* 1998).

A növényi olajok jelentős részét többszörösen telítetlen zsírsavak képezik (*Keresztes és mtsai*, 2007), amelyek a bendőbe kerülve negatívan befolyásolják a rostbontás folyamatát, illetve a belőlük képződő izomerek csökkentik a tejzsír szintézisét (*Bauman és mtsai,* 2006). Mindezen okokból fontos, hogy a magas PUFA hányaddal rendelkező kiegészítéseket bendővédett formában alkalmazzuk, amelyektől általában a fejadag energiakoncentrációjának fokozódását és a szaporodásbiológia mutatók javulását reméljük (*Lucy és mtsai,* 1991).

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a nem enzimatikus barnulási folyamat révén védetté tett full-fat szója miként befolyásolja a tejelő tehenek termelését, és a tej összetételét, különös tekintettel a tejzsír koncentráció alakulására.

Anyag és módszer

Kísérletünket 40, nagyüzemi körülmények között tartott tejhasznú szarvasmarhával végeztük, amelyeket illesztett párok módszerével 2 csoportra osztottunk (2x n= 20). A csoportosítás alapját az állatok laktációszáma, az előző laktáció első 100 napos tejtermelése, valamint a várható ellést megelőző 3. héten jellemző kondíció pontszáma adta. A kísérlet 2013. januártól májusig terjedő időszak alatt zajlott.

Az első csoport takarmányadagját 1,7 kg full-fat szójatermékkel (SoyPreme®, UBM Feed Kft., Pilisvörösvár, Magyarország) egészítettük ki az ellés napjától a laktáció 13. hetéig. A második csoport (kontroll) izokalorikus-izonitrogén takarmányozásban részesült, ezért fejadagjukat hidrogénezett pálmaolajjal (Hidropalm, NOREL, Spanyolország) és védett szójadarával (SoyPass®, LignoTech, USA) egészítettük ki.

A számítógép-vezérelt, automata fejőrendszernek köszönhetően folyamatosan rögzítettük az állatok napi egyedi tejtermelését (Boumatic LLC, Madison, USA). Kéthetente egyedi elegytej mintákat gyűjtöttünk, a True Test Milk Meter (Auckland, Új-Zéland) segítségével, a tejfehérje- és tejzsír-meghatározás céljából.

Az állatok csoportos, monodiétás (TMR, Total Mixed Ration) takarmányozásban részesültek, a fejadagokat CPM modell segítségével állítottuk össze (*CPM-Dairy, version 3.0*, 2006). Kétheti rendszerességgel gyűjtöttünk takarmánymintákat, melyeket laboratóriumi analízisnek vetettünk alá, és meghatároztuk azok szárazanyag, nyersfehérje, nyerszsír, nyershamu, NDF és ADF tartalmát (*AOAC*, 2000).

A tejminták nitrogén tartalmát Kjeldahl-módszer alapján határoztuk meg (*Helrich*, 1990), majd a tej nyersfehérje mennyiségét becsültük, mint N (%) x 6.38. A tej teljes zsírtartalmát *Folch és mtsai* (1957) által leírt metodika alapján analizáltuk.

Az eredmények értékelésének első lépésében az adatok normál eloszlását vizsgáltuk Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával (SPSS 20.0.). Az adatok kiértékelését az ANOVA ismétléses mintavételezés módszerével (Repeated Measures) végeztük, amelyhez az SPSS 20.0 program GLM modelljét alkalmaztuk. A statisztikai modellben fő hatásként értékeltük a kezelés hatását, valamint az idő hatását, amely esetünkben a laktációs heteket jelentette. Emellett vizsgáltuk a két fő hatás interakcióját.

Annak érdekében, hogy a pontos szignifikáns különbségeket feltárhassuk, periódusokat képeztünk, amelyeket külön értékeltünk, és ennek megfelelően ábrázoltunk. A tejtermelés adatainak időszakai: 0-3. hét, 4-8. hét, 9-13. hét. A tejzsír és tejfehérje adatainak feldolgozásakor a 3. héttől kezdődő időszakot külön értékeltük. Az ECM és FCM termelés esetében a következő intervallumokat alkalmaztuk: 0-2. hét, 3-6. hét és a 7-10. hét.

Eredmények és értékelésük

Az állatok tejtermelése már az ötödik laktációs hétre elérte a maximumát a kontroll csoportban, majd ezen a színvonalon stagnált mindvégig a kísérleti időszak folyamán. Ehhez képest a full-fat szója kiegészítésben részesült tehenek tejtermelése fokozódott egészen a 9. laktációs hétig, és ezen a termelési szinten perzisztált a kísérlet végéig. A két csoport tejtermelésében ennek ellenére nem volt statisztikailag igazolható különbség ($P<0,05$; *1. ábra*). A tej fehérjetartalma az ellés hetén magasabb volt, mint az azt követő időszakban, mindkét csoport esetében ($P<0,05$), a két csoport között azonban nem volt különbség ($P<0,05$; *2. ábra*).

A tej zsírtartalma a laktáció előrehaladtával folyamatosan csökkent mind a kontroll, mind pedig a kezelt csoportban ($P<0,05$), viszont a laktáció 2. és 9. napja között, a full-fat szója kiegészítésben részesült tehenek esetében magasabb értékeket mértünk ($P<0,05$; *3. ábra*). Mindennek eredményeképpen, ugyanezen kísérleti időszak alatt, az energiára (ECM) és a zsírra korrigált tejtermelésben (FCM) a kezelt csoport felülmúlta a kontroll csoport egyedeit ($P<0,05$; *4. és 5. ábra*).

1. ábra: **A bendővédett full-fat szója kiegészítés hatása a tejelő tehenek tejtermelésére**

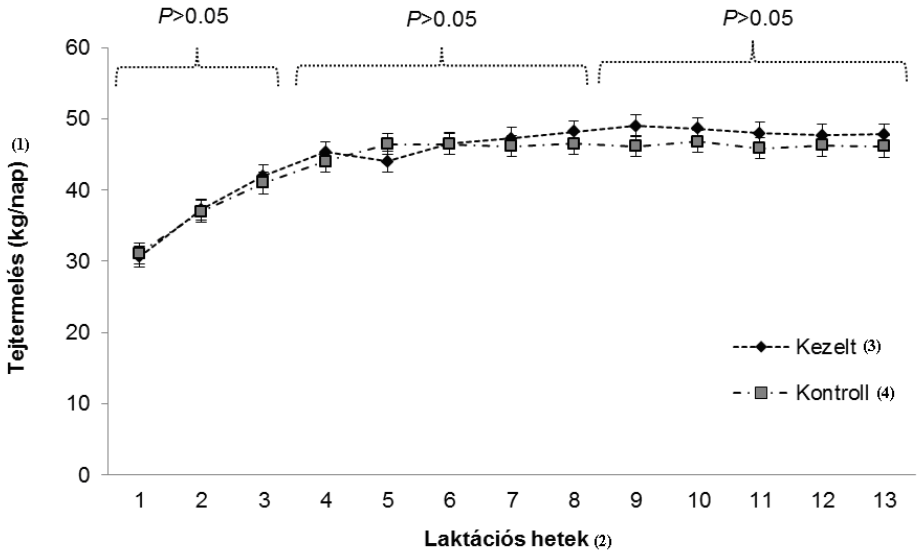


Fig. 1. The effect of rumen protected full-fat soybean on milk yield in dairy cows
milk yield (kg/day)(1), lactation weeks(2), full-fat supplemented group(3), control group(4)

2. ábra: **A bendővédett full-fat szója kiegészítés hatása a tej fehérjetartalmának alakulására**

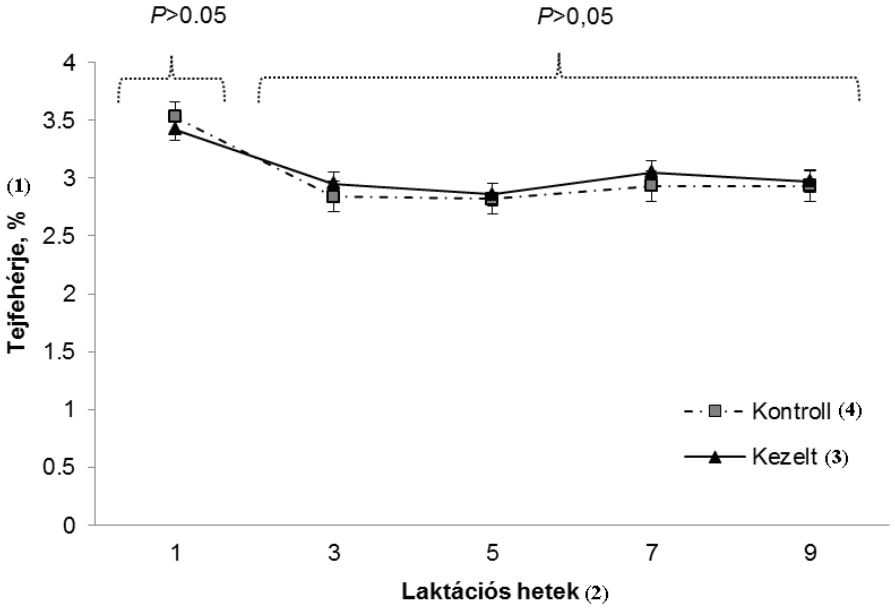


Fig. 2. The effect of rumen protected full-fat soybean on milk protein content
milk protein %(1), lactation weeks(2), full-fat supplemented group(3), control group(4)

3. ábra: **A bendővédett full-fat szója kiegészítés hatása a tej zsírtartalmának alakulására**

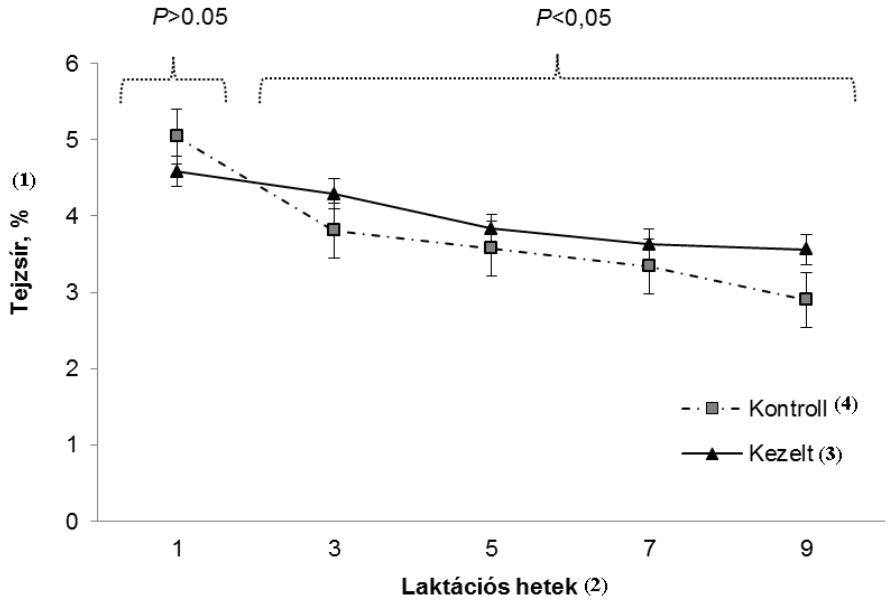


Fig. 3. The effect of rumen protected full-fat soybean on milk fat content
milk fat %(1), lactation weeks(2), full-fat supplemented group(3), control group(4)

4. ábra: **A full-fat szója kiegészítés hatása az energiára korrigált tejtermelésre**

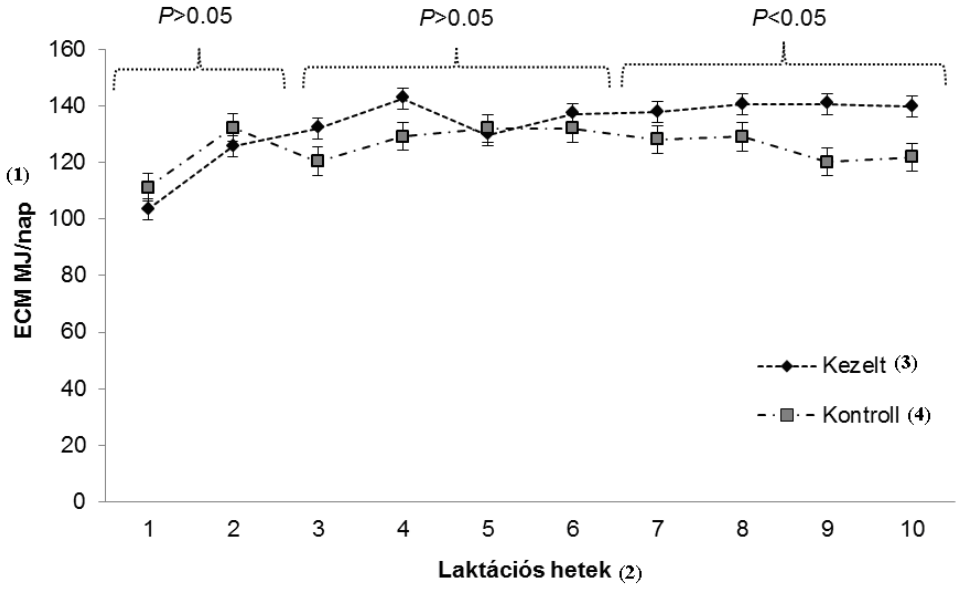


Fig. 4. The effect of rumen protected full-fat soybean on Energy Corrected Milk Yield (ECM)
ECM MJ/day(1), lactation weeks(2), full-fat supplemented group(3), control group(4)

5. ábra: **A full-fat szója kiegészítés hatása a 3,5%-os zsírra korrigált tejtermelésre**

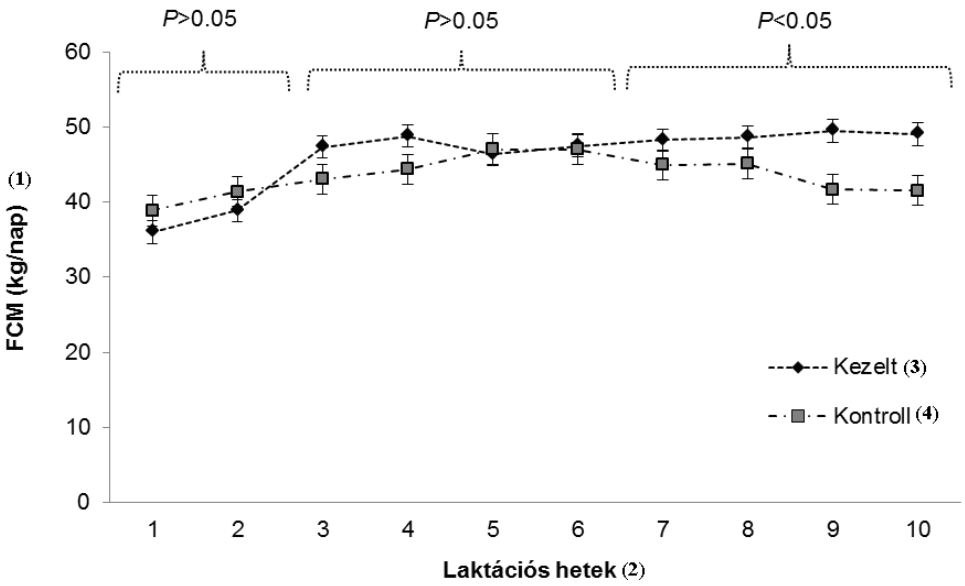


Fig. 5. The effect of rumen protected full-fat soybean on Fat corrected Milk (3.5% FCM)
FCM kg/day(1), lactation weeks(2), full-fat supplemented group(3), control group(4)

Következtetések és javaslatok

A speciális hőkezelési technikával védetté tett full-fat szója kiegészítés hatására a tehenek magasabb termelési színvonalon perzisztáltak a kontroll egyedekhez képest, magasabb zsírkoncentrációjú tej termelése mellett.

Eredményeink azt igazolják, hogy az alkalmazott full-fat szója takarmánykiegészítő termék fehérje- és zsírfrakciójának védettsége optimális. A full-fat szója fehérjéjének bypass hányada, valamint posztruminális emészthetősége kiválónak mondható, amire a tejtermelés színvonalának fenntartásából következtethetünk. A szójaolaj PUFA összetevői nem metabolizálódnak a bendőben, amit a tejzsírszintézis folyamatának zavartalan működése jelez.

Összességében kijelenthető, hogy a védett full-fat szója alkalmazásával, egyéb bypass fehérjehordozó- és zsírkiegészítés nélkül biztosítható az intenzív tejtermelés metabolizálható fehérje- és energiaigénye.

Irodalomjegyzék

Abel-Caines, S.F., Grant, R.J. , Klopfenstein, T.J., Winowiski, T. and Barney, N. (1998): Influence of Nonenzymatically Browned Soybeans on Ruminal Fermentation and Lactational Performance of Dairy Cows. J. Dairy Sci., 81. 1036-1045.

(AOAC) Association of Official Analytical Chemists. (2000): Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Bauman, D.E. and Lock, A.L. (2006): Concepts in Lipid Digestion and Metabolism in Dairy Cows. Tri-State Dairy Nutrition Conf. http://tristatedairy.osu.edu/Bauman.pdf

CPM-Dairy, version 3.0. (2006): Cornell University, The University of Pennsylvania, and Miner Institute. http://cahpwww.vet.upenn.edu/node/87

Folch, J.M., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226. 495-509.

Helrich, K. (1990): Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.

Keresztes, M., Faigl, V., Márton, A., Ihnáth, Z., Kulcsár, M., Mézes, M., Husvéth, F., Huszenicza, GY. (2007): A takarmány védett zsírokkal történő kiegészítésének szaporodásbiológiai vonatkozásai kérődzőkben. Magy. Állatorv. Lapja, 129. 525-530.

Lewis, J. M., T. J. Klopfenstein, R. A. Britton, M. H. Sindt and T. Winowski. (1989): Treated soybean meal for growing calves. Nebraska Beef Cattle Rep. MP: 54, Univ., 21-23, Nebraska, Lincoln.

Lucy, M.C., C.R. Staples, F.M. Michel, W.W. Thatcher (1991): Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. J. Dairy Sci., 74. 473-482.

LEVEGŐ-VÍZ HŐSZIVATTYÚ ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE AZ INTENZÍV RECIRKULÁCIÓS HALTENYÉSZTÉSI RENDSZERBEN

Géczi Gábor[1], Korzenszky Péter[2], Szabó Tamás[3], Bense László[4], Urbányi Béla[3]

Szent István Egyetem, Gödöllő
[1]GEK, Környezetipari Rendszerek Intézet, Környezettechnika Tanszék
[2]GEK, Folyamatmérnöki Intézet, Méréstechnika Tanszék
[3]MKK, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
[4]GEK, Mechanika és Géptani Intézet, Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
geczi.gabor@gek.szie.hu

Összefoglalás

A hőszivattyús alkalmazások terjedése annak köszönhető, hogy felismertük a tényt: részben ez is megújuló energiaforrás. Legalábbis olyan mértékben, amilyen COP-értékkel (Coefficient of Performance) éppen működik. A levegő-víz hőszivattyúk is egyre nagyobb területet követelnek maguknak, és már téli időszakban is képesek egy lakás vagy irodaépület fűtésére, HMV-ellátására, vagy kültéri úszómedencék esetén a medence vizének felfűtésére és hőn tartására.
Az utóbbi években egyre nagyobb igény mutatkozik a hazai haltenyésztés minőségi fejlesztésére. A pontyközpontú halastavi haltenyésztés mellett egyre több hazai szakember érdeklődik az intenzív haltenyésztés iránt. Környezetvédelmi és víztakarékossági szempontból a recirkulációs rendszerű haltartás a leghatékonyabb. Recirkulációs rendszerekben olyan halfajok tenyésztése gazdaságos, amelyek viszonylag magas áron értékesíthetők a piacon. Akár idegenhonos (afrikai harcsa, tilápia, barramundi), akár hazai (süllő, csapó sügér, egyes tokfélék, aranyhal) fajokról legyen szó, intenzív táplálékfelvétel és -hasznosítás, ebből következően gyors növekedés, viszonylag magas tartási hőmérsékleten érhető el. A nevelési vízhőmérséklet fajtól függően 20-28°C között változik.
A víz temperálására a hazai éghajlati körülmények között feltétlenül szükség van az év bizonyos szakaszaiban. Cikkünkben bemutatott egyszerűsített recirkulációs rendszerrel szeretnénk bizonyítani, hogy a halnevelő medencék temperálása levegő-víz rendszerű hőszivattyúkkal egyszerűen és gazdaságosan kivitelezhető.
Kulcsszavak: hőszivattyú, recirkuláció, haltenyésztés

Possibility of air-to-water heat pump application in the intensive recirculating fish farming system

Abstract

The spread of heat pump applications is due to the fact realized that these are also renewable energy sources; at least up to the extent of COP value (Coefficient of Performance). The use of air-to-water heat pumps is increasing and nowadays these are adapted for heating dwelling house or office building and hot water supplies all seasons or these can be used effectively for heating and regulating the temperature of water in outdoor swimming pools. In the last few years the demand for innovation has increased in freshwater aquaculture in Hungary.

It appears that more and more experts in the field of aquaculture have been interested in the intensive systems for fish keeping. In recirculation systems rearing of high market value fish species is economical. The optimal temperature of water depends on the fish species and usually varies between 20-28°C.
Under the climate of Hungary, is necessary throughout the year except the hot summer months. Our study proves that water heating in a small recirculation system can be easily and economically carried out by the application of air-to-water heat pumps.
Keywords: heat pump, recirculation, fish-farming

Irodalmi áttekintés

Az utóbbi években egyre nagyobb igény mutatkozik a hazai haltenyésztés minőségi fejlesztésére. A pontyközpontú halastavi haltenyésztés mellett egyre több hazai szakember érdeklődik az intenzív haltenyésztés iránt.

Vízfelhasználás szempontjából kétféle intenzív halgazdálkodási formát ismerünk. A víz útja szerint megkülönböztetünk folyamatos áramlású rendszereket, melyekben a vizet a rendszeren való átfolyása után elvezetik, illetve ketreces tartásnál átfolyik a rendszeren, továbbá víz visszaforgatásos rendszereket, melyekben a víz tisztításra kerül, és zárt körforgásban marad. Ez utóbbit nevezzük recirkulációs rendszernek. A rendszer előnye, hogy a külső környezettől elszigetelt, ami lehetővé teszi a víz valamennyi paraméterének ellenőrzését és szabályozását. E rendszerekben a behurcolt kórokozók és kockázati tényezők mennyisége jelentősen kisebb, a folyamatosan biztosított felügyelet miatt. Hátránya a magas beruházási, majd a magas energetikai költség, valamint a bonyolult technológiától való függés. A recirkulációs rendszerekre általában jellemző, hogy a víz egy része távozik a rendszerből, ezért szükség van vízutánpótlásra. A napi szinten betáplált friss víz mennyisége általában a teljes volumen 10%-a.

Recirkulációs rendszerekben olyan halfajok tenyésztése gazdaságos, melyek viszonylag magas áron értékesíthetők a piacon. Akár idegenhonos (afrikai harcsa, tilápia, barramundi), akár hazai (süllő, csapó sügér, egyes tokfélék, aranyhal) fajokról legyen szó, intenzív táplálékfelvétel és -hasznosítás, ebből következően gyors növekedés viszonylag magas tartási hőmérsékleten érhető el. A nevelési vízhőmérséklet fajtól függően 20-28°C között változik. A víz temperálására – a hazai éghajlati körülmények között – feltétlenül szükség van az év bizonyos szakaszaiban. Ez megoldható termálkútra alapozott vízkivétellel, gázkazán alkalmazásával, és külföldön már található példa hőszivattyús rendszerre is (*Péteri és mtsai*, 2013).

Szerencsére az utóbbi időben egyre népszerűbb a hőszivattyú, számos alkalmazási példa kerül a nyilvánosság elé, folyamatosan olvashatjuk a lehetőségeket, a fejlesztéseket – egyértelmű a terjedése. Csupán a teljesség kedvéért röviden a tények: a hőszivattyús technika nem új, az alapelvet Sadi Carnot francia fizikus, matematikus fogalmazta meg 1824-ben a Carnot-körfolyamat bevezetésével. Ezek alapján képesek vagyunk alacsonyabb hőmérsékletű közegből hőt elvonni és egy magasabb hőmérsékletű közegnek azt leadni, energia befektetés árán. A fűtési célokra alkalmazott hőszivattyú elvét 1852-ben James Joule és William Thomson alkotta meg. Ezt felhasználva Peter Ritter von Rittinger készítette el 1856-ben az első ipari hőszivattyút, amelyet só szárítására alkalmaztak a sóbányákban. A legnagyobb mérföldkő az alkalmazásukban 1938-ban történt, amikor a zürichi városháza fa tüzelésű kályháit hőszivattyúkra cserélték, amelynek a hőforrása a Limmat folyó vize volt. Ma már számos példát láthatunk irodaházakban, fürdőkben, családi házakban és állami intézményekben –, mint például a német Bundestag épülete – a hőszivattyúk működtetésére (*Komlós és mtsai*, 2009; *Zogg*, 2008).

A hőszivattyú technológiai fejlesztése során, 1948-tól nagy áttörést jelentett a Heller László közreműködésével kidolgozott kompresszoros hőszivattyú. A világhírű műegyetemi professzor, akadémikus 1948-ban védte meg doktori disszertációját Zürichben, amelynek témája a hőszivattyúk alkalmazásának technikai, gazdasági feltételei voltak (*Heller*, 1948). A hőenergetikával foglalkozó iskolateremtő professzor elképzelései között szerepelt a Parlament és a Műegyetem épületének hőszivattyús fűtése, a Duna vizét felhasználva hőforrásként. A hőszivattyúk világméretű terjedésével, napjainkban beigazolódnak a gondolatai (*Komlós és mtsai*, 2009).

Az eddigi példákból is látható, hogy a hőszivattyú tulajdonképpen egy hűtőgép, hiszen a környezetünkből hőt vonunk el, de a lényeg, hogy ezt a hőt hasznosítjuk. Az alkalmazások során egy alacsonyabb hőmérsékletű helyről (talaj, víz, levegő) történik a hőelvonás és a hőt egy már magasabb hőmérsékletű helyre szállítjuk, ami csak energia befektetés segítségével lehetséges.

Levegő-víz hőszivattyú esetén az elnevezésből egyértelműen kiderül, hogy használatuk során a környezeti levegőből elvont hő hasznosul (az elpárologtató a környezeti levegőt hűti). A „hűtős" szakzsargonnal szólva a kondenzátor oldalon érvényesül a hőhasznosulás, amely a víz hőmérsékletének emelésére fordítódik (*Dexheimer*, 1985; *Lund*, 1988; *Reay és Mac Michael*, 2008).

Anyag és módszer

Kutatásaink során egy Microwell gyártmányú levegő-víz rendszerű hőszivattyú haltenyésztési rendszerekben történő alkalmazásának lehetőségét vizsgáltuk egy egyszerűsített modell segítségével. Mérési eredményeinkkel szeretnénk igazolni, hogy a hőszivattyúk használata költséghatékony és környezetbarát módon járulhat hozzá a tenyésztési idő kitolásához. A Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén összeállítottunk egy egyszerűsített recirkulációs rendszert hőszivattyúval, amelynél az üzemi paramétereket folyamatosan mérjük és rögzítjük. A mérőkör elrendezési vázlatát az *1. ábra* mutatja.

***1. ábra*: Egyszerűsített recirkulációs modell hőszivattyúval**

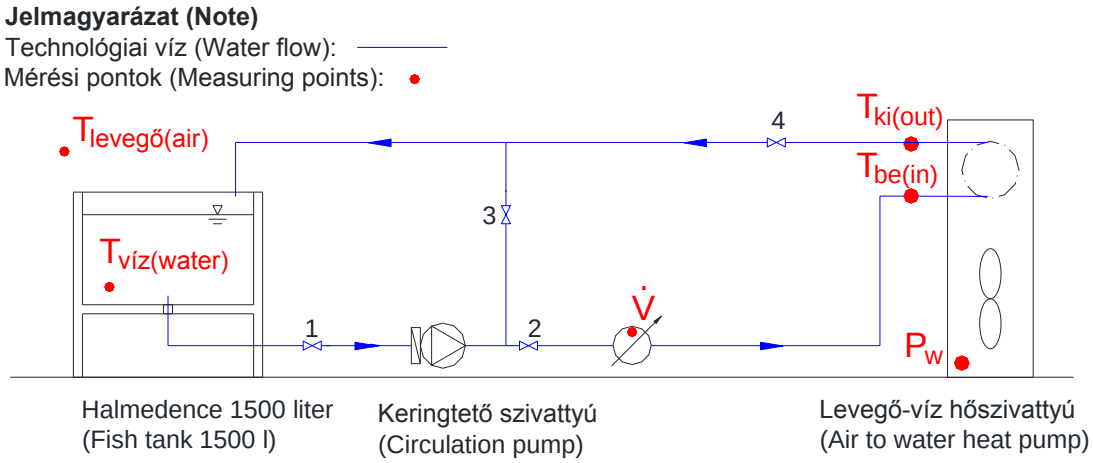


Fig. 1. Simplified recirculation model with heat pump

A vizsgálatok során 1500 liter vizet melegítettünk fel egy HP700 (Microwell, Šaľa, Szlovákia) típusú hőszivattyúval a kívánt 22-24°C-os hőmérsékletre, és több héten keresztül ezen a hőmérsékleten tartottuk. A vizsgálatok során NiCr-Ni hőelem segítségével mértük a halmedencében lévő víz $T_{víz}$ (°C) és a környezeti levegő hőmérsékletét $T_{levegő}$ (°C).

A hőszivattyú hatékonyságának megállapításához mértük a hőszivattyúba belépő és kilépő víz hőmérsékletét T_{be} és T_{ki} (°C), valamint ARAD Woltman Silver Turbó (WST model, Arad Hungária, Miskolc, Magyarország) mechanikus áramlásmérővel a víz térfogatáramát. A víz térfogatáramát a visszatérő ág csapjának zárásával a haltenyésztésben elfogadott $\dot{V} = 70$ l/min mennyiségre állítottuk be és állandó értéken tartottunk. Actaris SL7000 (Ganz Mérőgyár Kft., Gödöllő, Magyarország) típusú teljesítménymérő segítségével mértük az elektromos teljesítményt P_w, (W), és az áramfelvételből következtettünk a hőszivattyú üzemidejére.

A felsorolt paraméterek mérését és tárolását ALMEMO 2590-9 mérő és adatgyűjtő rendszerrel (Ahlborn, Holzkirchen, Németország) valósítottuk meg. A bemutatott egyszerűsített recirkulációs modellt, a kapcsolódó mérőeszközökkel a *2. ábra* mutatja be.

2.ábra: **Hőszivattyús modell a Szent István Egyetem Haltenyésztési Tanszékén**



Fig. 2. Heat pump application at the Department of Aquaculture in Szent István University

A felsorolt paraméterek lehetővé teszik, hogy egy-egy ciklusra vetítve a temperálás energia szükségletét, illetve ennek költségét az adott külső hőmérséklet mellett meghatározzuk. Ezen kívül kiszámíthatjuk a hőszivattyúk hatékonyságát, „jóságát" kifejező teljesítmény tényezőt is, közismertebb nevén a bevezetőben említett COP értéket. A pillanatnyi COP érték éppen azt mutatja meg, hogy egységnyi befektetett villamos energiából mennyi termikus energiát állít elő az adott hőszivattyú, vagyis az elért hőteljesítmény, $\dot{Q}_h$ (W) és a befektetett elektromos teljesítmény P_w, (W) hányadosa (*1. képlet*) (*Komlós és Fodor,* 2011; *Randy és Turner,* 2011).

$$\textit{1. képlet: } COP = \frac{\dot{Q}_h}{P_w}$$

A COP értéket természetesen meghatározza az elpárologtató és a kondenzátor hőmérséklete, ami egy haltenyésztési rendszerben történő alkalmazás során a környezeti levegővel és a halmedence vizének hőmérsékletével azonosítható. Az is nyilvánvaló, hogy alacsonyabb léghőmérséklet és/vagy magasabb medencevíz hőmérséklet esetén a hőszivattyú hatékonysága rosszabb, de ennek mértékéről a gyártók által közölt – sokszor ideális esetekre érvényes – COP érték nem mindig tanúskodik.

A víz hőmérsékletének figyelembe vételével a fajhő c_p, ($J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$) és a sűrűség ρ, ($kg \cdot m^{-3}$) értékek táblázatokból kiolvashatók, és ezek alapján a pillanatnyi hőteljesítmény a *2. képlet* szerint számítható.

$$\textit{2. képlet: } \dot{Q}_h = c_p \cdot \rho \cdot \dot{V} \cdot \left(T_{ki} - T_{be}\right)$$

Eredmények és értékelés

Az előzőekben bemutatott egyszerűsített recirkulációs modellt 2013. szeptember hónapban helyeztük üzembe. Hetes ciklusokban változtattuk a halnevelő medence hőmérsékletét, a mérések során halak nem voltak a medencében. A *3. ábrán* szeptember 12-től 18-ig tartó kísérlet paramétereit mutatjuk be. Ebben a ciklusban az adatrögzítést 12-én, pénteken 11:00 órakor kezdtük. A halmedence vizének a célhőmérséklete 21-24°C volt. A szélsőséges időjárás segített abban, hogy különböző külső körülmények mellett kapjunk információkat. Az adatrögzítés első napján napsütés volt a jellemző, a *3. ábrán* látható, hogy a maximális levegő hőmérséklet elérte a 18°C-t. A mérést az előző vizsgálatból adódó 25°C-os vízhőmérséklettel kezdtük meg, így a hőszivattyú először csak az éjfél körül kapcsolt be. A hőszivattyú működését az áramfelvétel mutatja. A *3. ábrából* látható, hogy kb. 1 órás működés során 21°C-ról 25°C-ra emelte a víz hőmérsékletét. Szombaton egész napos esőzés mellett a levegő hőmérséklete szinte állandó, a hőszivattyú kétszer is bekapcsolt kb.1-1 órára. Vasárnap és hétfőn nyáriasra fordult az időjárás, a halmedence vizének a hőmérséklete nagyon lassan hűlt, a hőszivattyú mindkét napon csupán éjfél után kapcsolt be. Azon a héten keddre az időjárás gyökeresen megváltozott és egy erős hidegfrontnak köszönhetően a levegő hőmérséklete erősen lecsökkent, szerdán a reggeli órákban nem érte el 8°C-t. Csütörtökön a reggeli órákban 142 órás folyamatos mérés után az adatrögzítést befejeztük. A vizsgálat során a tervezett 2-3°C-os ingadozás helyett kb. 5°C-os hiszterézist tapasztaltunk. Haltenyésztés szempontjából pontosabb szabályzásra lesz szükségünk, de a kapott eredmények az energetikai következtetésre alkalmasak.

A rendelkezésre álló adatokból megállapítható, hogy a medence vizének hőmérsékletét 22,5°C átlaghőmérsékleten tudtuk tartani, 14,1°C környezeti hőmérséklet mellett. A hőszivattyú 11-szer kapcsolt be 1-2,5 órás tartamra, összesen 18 órát üzemelt. 1,41kW átlagos teljesítmény felvétel mellett ez 25,38kWh energiafogyasztást jelent, ami a jelenlegi lakossági árakkal átszámítva kb. 1300 Ft-os költséget feltételez.

3. *ábra*: A halmedence vízhőmérsékletének alakulása

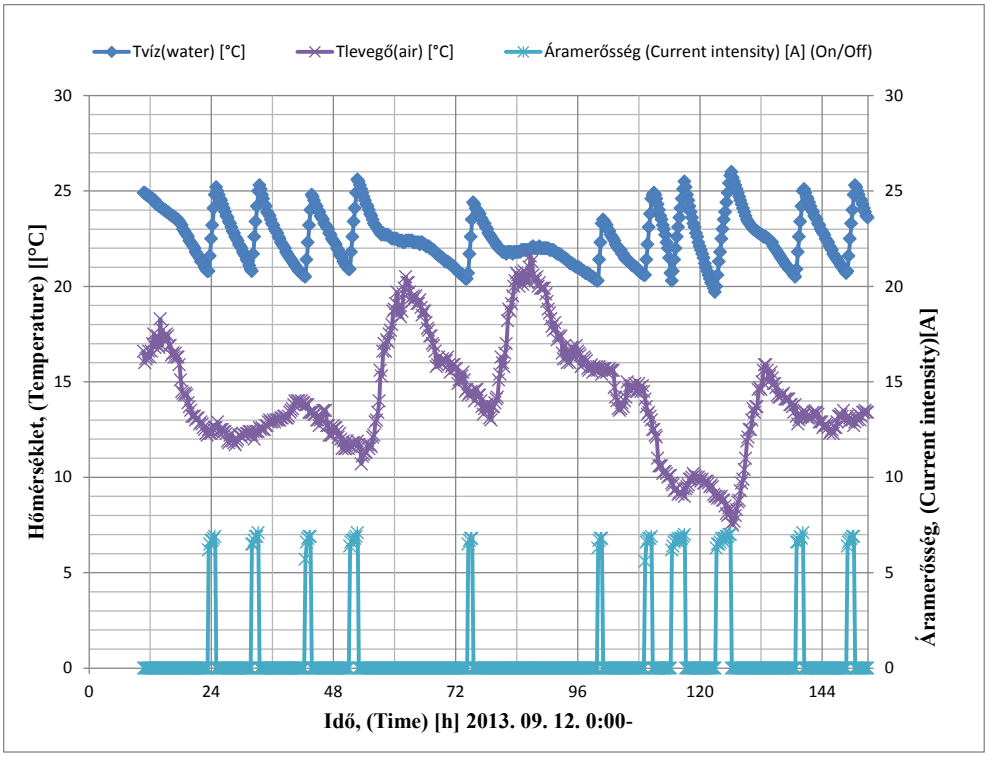


Fig. 3. Change of the temperature of fishpool by time

A hőszivattyú elemzéséhez a *4. ábrán*, az előző ábra egy példaként kiragadott részletét mutatjuk be. Látható, hogy az adatrögzítés második napján reggel 8:00 körül a medence vizének hőmérséklete 21°C alá csökkent és a hőszivattyú bekapcsolt. A medence vízének áramoltatása során a hőszivattyú átlagban $\Delta T_{hőszivattyú}$= 1,3±0,02°C hőmérséklet különbséget ért el a beállított $\dot{V}$ = 70 l/min térfogatáram mellett. Ez a hőmérséklet különbség a hőszivattyú bemeneti és kimeneti oldalán mérhető, és a *4. ábrán* látható, hogy kb. 1 óra alatt, 4,5°C-kal emelte meg az 1500 liter víztömeg hőmérsékletét.

A hőszivattyú működésére jellemző COP érték meghatározásához a fajhőt c_p=4,182-4,184 kJ·kg^{-1}·K^{-1} értékkel a víz sűrűségét pedig ρ = 997,7-998,5 kg·m^{-3} értékkel kalkuláltuk a hőmérséklet függvényében. Az elektromos teljesítmény a környezeti paraméterek függvényében P_w=1,28-1,46 kW értékre adódott. Ezen értékek, valamint az *1. képlet* és a *2. képlet* segítségével, a pillanatnyi COP értékeket számítással határoztuk meg. A hőszivattyú bekapcsolásakor a működést COP= 4,92 érték jellemezte, amely elsősorban a medence vízhőmérsékletének emelkedése miatt COP= 4,31 értékre csökkent.

4. ábra: A hőszivattyú működését bemutató paraméterek az idő függvényében (részlet)

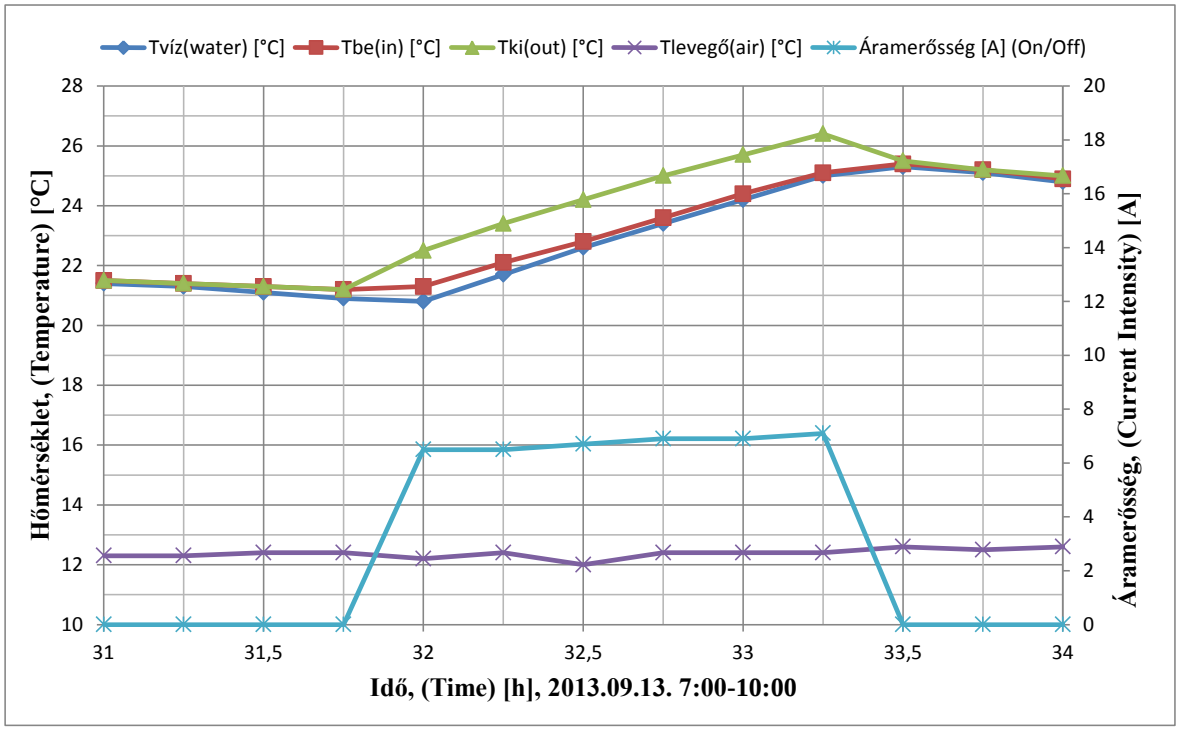


Fig. 4. The operating parameters of heat pump by time

Következtetések és javaslatok

A vizsgált őszi időszakban, a hőszivattyú hatékonyságát illetően, COP= 4,31-nél rosszabb értéket nem kaptunk. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a levegő-víz hőszivattyúk alkalmazása ideális megoldás a haltenyésztési rendszerekben található medencék vízének melegítésére, hőntartására. A tavaszi és őszi időszakban, a levegő hőmérséklete (elpárologtató hőmérséklete) már/még megfelelő (T ≈ 15-20°C) és a medence vízhőmérséklete (a kondenzátor hőmérséklete) ideális (T ≈ 21-25°C), egy hőszivattyús alkalmazásra.

A halmedencék fűtése, temperálása természetesen többletköltséget jelent a tenyésztési technológiában, ugyanakkor a nagyobb halszaporulat, a biztonság megtérülhet. A jelenlegi árak mellett Magyarországon a levegő-víz hőszivattyú alkalmazása kb. 30%-os költség-megtakarítást jelent, ha temperálás mellett dönt a tenyésztő. További előny, hogy a hőntartás ezzel a módszerrel közel 50%-os CO_2-kibocsátás csökkenést eredményezhet a fosszilis energiahordozók alkalmazásával szemben (számított kibocsátás 0,56 $kgCO_2/kWh$ villamos energia és 1,96 $kgCO_2/m^3$ földgáz értékekkel).

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” TÁMOP 4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 számú és a „Kutató Kari Kiválósági Támogatás – Research Centre of Excellence” – 17586-4/2013/TUDPOL számú projektek támogatták. Köszönetünket szeretnénk kifejezni a Microwell Magyarország Kft.-nek a közreműködésért.

Irodalomjegyzék

Dexheimer, R. D. (1985): Water-Source Heat Pump Handbook. National Water Well Association, Worthington, OH.

Heller L. (1948): *Die Bedeutung der Wärmepumpe bei thermischer Elektrizitätserzeugung. Universitätsdruckerei.* Budapest, doktori disszertáció.

Komlós F., Fodor Z., Kapros Z, Vajda J., Vaszil L. (2009): Hőszivattyús rendszerek (Heat Pump Systems). Magánkiadás, ISBN: 9789630675741, 215.

Komlós F., Fodor Z. (2011): Városok hőszivattyús fűtése. Átfogó tervre lenne szükség. Magyar Épületgépészet, 60. 5.

Lund, J. W. (1988): Geothermal Heat Pump Utilization in the United States. Geo-Heat Center Quarterly Bulletin, 11. 1.

Péteri A., Janurik E., Kepenyes J., (2013): A recirkulációs rendszerekben történő üzemi halnevelés biológiai és technikai háttere, valamint Kelet-Európai alkalmazásának lehetőségei. Magyar Akvakultúra Szövetség, 56.

Randy, F. P., Sr. Turner, L. C. (2011): HEAT PUMPS Operation, Installation, Service. Eco press, Mount Prospect, Illinois.

Reay, D.A., Mac Michael, D.B.A. (2008): Heat pumps. Pergamon Books Inc., Elmsford, NY. (United States). 350.

Zogg, M. (2008): History of Heat Pumps - Swiss Contributions and International Milestones. Final report. Swiss Federal Office of Energy, Berne.

NÖVENDÉKNYULAK KÜLÖNBÖZŐ PADOZATOK KÖZÖTTI SZABAD HELYVÁLASZTÁSA ALACSONY HŐMÉRSÉKLETEN

Gerencsér Zsolt[1], Matics Zsolt[1], Radnai István[1], Odermatt Meinrad[2], Szendrő Zsolt[1,2]

[1]Kaposvári Egyetem, 7400, Kaposvár, Guba S. u. 40.
[2]Olivia Kft, 6050 Lajosmizse, Mizse 94.
gerencser.zsolt@ke.hu

Összefoglalás

A kísérletben növendéknyulak helyválasztását vizsgálták három különböző padozat (műanyag rács, fémrács és szalma mélyalom) között. A kísérletet a Kaposvári Egyetemen, a Pannon tenyésztési program anyai vonalú növendéknyulaival végezték (n= 129). Választáskor (5 hetes életkor) a nyulakat három, egyenként 3,8 m^2 alapterületű fülkében helyezték el (43 nyúl/fülke), a vizsgálat 11 hetes korig tartott. A fülke 1/3-ad részén fémrács, 1/3-ad részén szalma mélyalom, 1/3-ad részén pedig műanyag rácspadozat volt. Infravörös kamerák segítségével hetente egyszer, 24 órás videofelvételeket készítettek. 30 percenként felírták az egyes padozatokon tartózkodó nyulak számát. A teremben az átlagos hőmérséklet 10,5°C volt. Az adatokat Chi^2-próbával értékelték, az egyes elhelyezkedések arányát a várható (33,3%) aránnyal hasonlították össze. A nyulak leggyakrabban a műanyag rácsot választották, minden életkorban szignifikánsan nagyobb arányban tartózkodtak ott (52-73%, P<0,001), mint a véletlenszerű elhelyezkedésnél várható 33,3%-os érték. A fémrács választási aránya 5,5 és 9,5 hetes kor között szignifikánsan elmaradt a 33,3%-tól (20-27%; P<0,001), 10,5 hetes korban viszont azzal közel megegyező volt (P>0,10). A nyulak minden életkorban a mélyalmot választották legritkábban (8-18%, P<0,001). Az eredmények alapján látható, hogy 10,5°C-os hőmérsékleten a nyulak életkortól és napszaktól függetlenül a műanyag rácsot részesítik előnyben, a mélyalmot pedig elutasítják.
Kulcsszavak*:* növendék nyulak, szabad helyválasztás, különböző padozat

Preference test of growing rabbits for different floor-types under low ambient temperature

Abstract

Location preference of growing rabbits was evaluated on different type of floors (plastic mesh, wire mesh and deep litter). The experiment was carried out on growing rabbits (n= 129) at Kaposvár University. The average temperature in the room was 10.5°C. At weaning (5-week-old) rabbits were placed into 3 pens having each with a basic area of 3.8m^2 (43 rabbits/pen) till the age of 11 weeks. The floor of pens was partly wire mesh (1/3), plastic mesh (1/3) and deep litter (straw, 1/3). Using infrared cameras, 24-hour-long video recording was made once a week. The number of rabbits on the different type of floors was recorded every 30 minutes. Data was analysed by Chi-square test detecting the difference between observed and expected (33.3%) proportion of location. The rabbits showed the highest preference for plastic mesh, at every age they spent more time there (52-73%, P<0.001) than the expected value (33.3%). Between the age of 5.5 and 9.5 weeks the preference of the wire mesh floor was significantly lower than 33.3% (20-27%; P<0.001), but at the age of 10.5 weeks it was similar to the value of 33.3% (P>0.10).

Deep litter was the least frequently chosen floor type at all ages (8-18%, P<0.001). Based on the results it can be concluded that at the temperature of 10.5°C the growing rabbits showed the highest preference for the plastic mesh and the lowest preference for deep litter.
Keywords*:* growing rabbits, preferences, different floor type

Bevezetés

A nyulak jólléte és kényelme egyre fontosabb szempont a tartástechnológia fejlesztése és kialakítása során. Az állatok közérzete szempontjából az egyik legfontosabb technológiai elem a padozat, mivel azon tartózkodnak, mozognak. A fogyasztók körében általános az a vélemény, hogy a nyúl a mélyalmon érzi jól magát. Ezzel szemben néhány kutató szabad helyválasztásos kísérletben azt állapította meg, hogy a növendéknyulak szívesebben választják a rácspadozatot, mint a mélyalmot (*Morisse és mtsai*, 1999; *Orova és mtsai*, 2004). *Bessei és mtsai* (2001) eredményei szerint magasabb hőmérsékleten (15°C felett) a nyulak a műanyag rácspadozatot választották szívesebben, míg alacsonyabb hőmérsékleten a mélyalmot kedvelték. *Princz és mtsai* (2008) megfigyelték, hogy a növendéknyulak mind az aktív, mind a pihenő időszakban szívesebben tartózkodtak a műanyag rácson, szemben a fémráccsal. Hasonló eredményekről számoltak be *Matics és mtsai* (2003) is.

Kísérletünkben a növendéknyulak helyválasztását alacsony hőmérsékleten, három különböző padozat (műanyag rács, fémrács és szalma mélyalom) között vizsgáltuk.

Anyag és módszer

A kísérletet a Kaposvári Egyetemen, a Pannon tenyésztési program anyai vonalú növendéknyulaival végeztük (n= 129). Választáskor (5 hetes korban) a nyulakat három, egyenként 3,8 m^2 (1,9x2,0 m) alapterületű fülkében helyeztük el (43 nyúl/fülke, 12 nyúl/m^2). A napi megvilágítás 16 óra (6:00-22:00), az átlagos hőmérséklet 10,5°C volt (*1. táblázat*). A nyulak a teljes kísérleti periódusban (5-11 hetes kor között) *ad libitum* kaptak tápot (5-9 hetes kor között: DE= 10,3 MJ/kg; nyersfehérje= 16,1%; nyerszsír= 2,8%; nyersrost= 16,9 % és gyógyszerezés= Robenidin 66 mg/kg, OTC 500 mg/kg, Tiamulin-f 50mg/kg; 9-11 hetes kor között: DE= 11,0 MJ/kg; nyersfehérje= 16,1%; nyerszsír= 4,4%; nyersrost= 16,0%). Emellett pedig tetszés szerint ihattak a súlyszelepes itatókból.

A fülke padozatának 1/3-a fémrács, 1/3-a szalma mélyalom, 1/3-a pedig műanyag rács volt (*1. ábra*). A mélyalmot naponta friss szalmával felülszórtuk, és hetente kicseréltük. Az etetők és az itatók mindhárom padozatrészen arányosan voltak elhelyezve. Az egyes etetőkből elfogyasztott takarmányt hetente mértük, és a fülkén belüli összes fogyasztás arányában kiszámítottuk az egyes padozatokhoz tartozó etetőkből fogyott takarmányt.

***1. táblázat*: Heti átlagos hőmérséklet a teremben**

	Életkor, hét (1)					
	5-6	**6-7**	**7-8**	**8-9**	**9-10**	**10-11**
Hőmérséklet, °C (2)	10,1	11,9	10,6	9,7	10,1	10,9

Table 1: The average temperature per week
age, week(1), temperature(2)

***1. ábra*: A kísérlet felépítése**



Fig. 1: Experimental design
feeding trough(1), wire mesh(2), deep litter(3), plastic mesh(4), drinking trough(5)

A fülkék fölé infravörös kamerákat szereltünk, és 5-11 hetes életkor között, hetente egyszer, 24 órás videofelvételeket készítettünk. A felvétel napján senki nem mehetett be a terembe, hogy ne zavarja meg a nyulak viselkedését. A videofelvételeken félóránként megszámoltuk az egyes padozatokon tartózkodó nyulak számát. A 24 órát négy egyenlő (6 órás) periódusra osztottuk: 5:00-11:00, 11:00-17:00, 17:00-23:00 és 23:00-5:00, és a padozatválasztást napszakonként is vizsgáltuk.
A padozattípusok közötti választást az életkor és a napszak függvényében, valamint annak a véletlenszerű elhelyezkedésnél várható 33,3%-os aránytól való eltérését Chi^2-próbával vizsgáltuk.

Eredmények és értékelés

A növendéknyulak életkor szerinti helyválasztása a *2. táblázatban* látható.
A nyulak leggyakrabban a műanyag rácson tartózkodtak, minden életkorban szignifikánsan nagyobb arányban választották ezt a területet, mint a véletlenszerű elhelyezkedésnél várható 33,3%-os érték ($P<0,001$). A kedveltségi sorban a fémrács padozat volt a következő. 5,5 és 9,5 hetes kor között a véletlenszerűen várható aránynál kissé kevesebb nyúl választotta ezt a padozattípust (20-27%, $P<0,001$), de 10,5 hetes korban a fémrács választásának aránya 33,3% volt. A nyulak legritkábban a mélyalmot keresték fel (8-18%; $P<0,001$). A padozatválasztásban – az életkor előrehaladtával - egy kiegyenlítődési tendencia figyelhető meg. A választás utáni héten a műanyag és fémrács, valamint a fémrács és a mélyalom választása közötti eltérés sorrendben 46 és 15%, a kísérlet végén 19 és 19% volt.

Eredményeinkhez hasonlóan *Matics és mtsai* (2003) és *Princz és mtsai* (2008) 16-18°C-os hőmérsékleten szintén azt figyelték meg, hogy a növendéknyulak a fémráccsal szemben szívesebben választották a műanyag rácsot. A fémrács és mélyalom közötti választásban kapott

eredmények - az alacsony (10,5°C) hőmérséklet ellenére - az irodalmi adatokkal megegyezőek (*Morisse és mtsai*, 1999; *Orova és mtsai*, 2004). *Bessei és mtsai* (2001) megfigyelése szerint 15°C alatt a növendéknyulak szívesebben választották a mélyalmot, e felett viszont a műanyag rácsot preferálták. Kísérletünkben minden életkorban 15°C alatt volt a hőmérséklet, azonban a mélyalom választása jelentősen elmaradt a másik két padozatétól. A mélyalom kedveltségét az alomanyag vizelettel és bélsárral történő szennyeződése befolyásolhatja. A hetenkénti alomcsere és friss szalmával történő napi felülszórás azonban minimálisra csökkentette ezt a hatást. Feltehető, hogy a két kísérlet eltérő eredményében a padozat tulajdonságai (anyagvastagság, lyukméret) is közrejátszhattak.

Matics és mtsai (2003), valamint *Princz és mtsai* (2008) – eredményeinkhez hasonlóan – az életkor előrehaladtával a legkedveltebb padozat preferálásának csökkenését és a kevésbé kedvelt választásának növekedését figyelték meg. Ezt a nyulak súlyának növekedése magyarázhatja: a növekvő nyulaknak ugyanaz az alapterület egyre szűkösebbé válik (nagyobb helyigény miatt), ezért néhány nyúl inkább a kevésbé kedvelt padozatokat választja.

***2. táblázat*: A nyulak különböző padozattípusok közötti helyválasztása (%), az életkor függvényében**

Életkor, hét (1)	**Padozat típus (2)**		
	Műanyag rács (3)	**Mélyalom (4)**	**Fémrács (5)**
5,5	69,7***^{D}	7,6***^{A}	22,8***^{B}
6,5	72,6***^{E}	7,7***^{A}	19,8***^{A}
7,5	66,1***^{C}	9,9***^{B}	24,0***^{B}
8,5	59,8***^{B}	17,7***^{E}	22,5***^{B}
9,5	60,6***^{B}	12,6***^{C}	26,7***^{C}
10,5	52,3***^{A}	14,4***^{D}	33,3^{D}

***-gal jelölt értékek szignifikánsan különböznek a 33,3%-tól P<0,001 szinten. A különböző betűkkel (A, B, C, D, E) jelölt értékek között az egyes oszlopokon belül szignifikáns eltérés van. (P<0,05) / Values with *** sign significantly differ from the 33.3% at P<0.001 level. Values with different letters in each colunm significantly differ at P<0.05 level.

Table 2: Effect of floor type on the choice of growing rabbit (%) depending on their age
age, week(1), floor type(2), plastic mesh(3), deep litter(4), wire mesh(5)

A napszak az egyes padozatok preferencia sorrendjét nem befolyásolta. Minden napszakban a műanyag rács volt a legkedveltebb, és a mélyalmot kerülték el leginkább (*3. táblázat*). Megfigyelhető, hogy az aktív időszakban (23:00-5:00) 8%-kal több nyúl tartózkodott a műanyag rácson (P<0,001), és 7%-kal kevesebb a fémrácson (P<0,001), mint a pihenő időszakban (11:00-17:00). *Princz és mtsai* (2008) ezzel ellentétes tendenciáról számoltak be. Mélyalmon csak kis (1,2%) eltérés volt a két napszak között.

A takarmányfogyasztásban az első 3 héten hasonló tendenciát figyeltünk meg, mint a helyválasztásban, azonban 8,5 és 10,5 hetes életkor között a műanyag rácson és a fémrácson elfogyasztott takarmány mennyiségében már nem volt eltérés (*2. ábra*). Összhangban a helyválasztással, a nyulak a mélyalmos részen fogyasztották a legkevesebb takarmányt. Az életkor előrehaladtával, hasonlóan a helyválasztáshoz, a takarmányfogyatásban is egy kiegyenlítődési tendencia figyelhető meg.

***3. táblázat*: A nyulak helyválasztása (%) különböző padozatok között a napszaktól függően**

Napszak (1)	**Padozat típus (2)**		
	Műanyag rács (3)	**Mélyalom (4)**	**Fémrács (5)**
23:00-5:00 aktív időszak (6)	71,8***^{C}	8,8***^{A}	19,4***^{A}
5:00-11:00	59,2***^{A}	14,4***^{D}	26,3***^{B}
11:00-17:00 pihenő időszak (7)	64,1***^{B}	10,0***^{B}	26,0***^{B}
17:00-23:00	58,9***^{A}	13,4***^{C}	27,7***^{C}
Teljes időtartam (24 óra) (8)	63,5***	11,6***	24,8***

***-gal jelölt értékek szignifikánsan különböznek a 33,3%-tól P<0,001 szinten. A különböző betűkkel (A, B, C, D, E) jelölt értékek között az egyes oszlopokon belül szignifikáns eltérés van. (P<0,05) / Values with *** sign significantly differ from the 33.3% at P<0.001 level. Values with different letters in each colunm significantly differ at P<0.05 level.

Table 3: Location choice of rabbits (%) among floor types depending nt he stages of day
Stage of day(1), floor type(2), plastic mesh(3), deep litter(4), wire mesh(5), active period(6), resting period(7), total time, 24h(8)

***2. ábra:* A takarmányfogyasztás megoszlása (%) a különböző padozatok között**

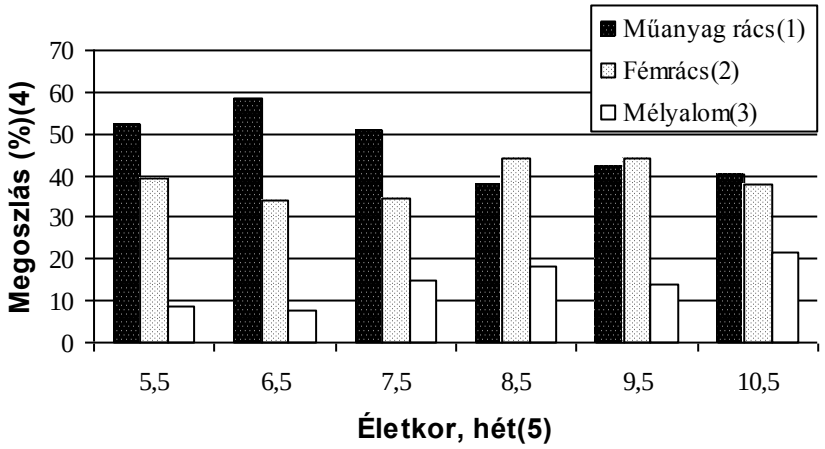


Fig. 2: Rate of feed intake of rabbits (%) on different floor types
plastic mesh(1), wire mesh(2), deep litter(3), rate, %(4), age, week(5)

Következtetések és javaslatok

10°C-os hőmérsékleten a növendéknyulak a három padozat (műanyag rács, fémrács és mélyalom) közül életkortól és napszaktól függetlenül a műanyag rácsot részesítették előnyben. A fémrács és a mélyalom választása elmaradt a véletlenszerű elhelyezkedésnél várható 33,3%-os értéktől, de a két padozat közül a fémrács volt kedveltebb. Mivel eredményeinket alacsony (10°C körüli) hőmérsékleten kaptuk, érdemes lenne ennél magasabb hőmérsékleten is megvizsgálni a helyválasztás alakulását.

Köszönetnyilvánítás

Gerencsér Zsolt publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.
A kutatás szakmailag kapcsolódik a GOP-1.3.1-11/B-2011-0045 projekthez.

Irodalomjegyzék

Bessei, W., Tinz, J., Reiter, K. (2001): Die Präferenz von Mastkaninchen für Kunststoffgitter und Tiefstreu bei unterschiedlichen Temperaturen. Arbeitstagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztiere und Heimtiere, Celle. Proc., 12. 133-140.

Matics Zs., Szendrő Zs., Radnai I., Biró-Németh E., Gyovai M. (2003): Examination of free choice of rabbits among different cage-floors. Agriculturae Conspectus Scientificus, 68. 6. 265-268.

Morisse, J.P., Boilletot, E., Martrenchar, A. (1999.): Preference testing in intensively kept meat production rabbits for straw on wire grid floor. Appl. Anim. Behav. Sci., 64. 71-80.

Orova, Z., Szendrő, Zs., Matics, Zs., Radnai, I., Biró-Németh, E. (2004): Free choice of growing rabbits between deep litter and wire net floor in pens. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. Proc.,1263-1265.

Princz, Z., Dalle Zotte, A., Radnai, I., Birò-Németh, E., Matics, Zs., Gerencsér, Zs., Nagy, I., Szendrő, Zs. (2008): Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. Appl. Anim. Behav. Sci., 111. 342-356.

MINTA-ELŐKÉSZÍTÉSI ÉS FRAKCIONÁLÁSI LEHETŐSÉGEK A TOJÁS PROTEOMIKAI VIZSGÁLATA SORÁN

Gulyás Gabriella, Radócz Tünde, Jávor András, Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem, Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állattenyésztéstani Tanszék
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
gulyas@agr.unideb.hu

Összefoglalás

Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, szaporodásbiológiai, immunológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat, bár ezek felhasználási területei még korlátozottak. Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy mérésen belül több ezer fehérje meghatározására, így nyomon követhetjük a sejtek válaszait a kísérleti beállítások hatására bekövetkező változásokra. A tojás proteomjának poliakrilamid gél alapú analízise még nem kiforrt, a nemzetközi irodalomban kevés számú részletesen közölt protokoll található, így a mintatisztítás és frakcionálás lépései igen hosszú optimalizálást igényelnek. Ezek mellett a tojásfehérje minták fehérjefrakciójának 77%-át három nagy gyakoriságú fehérje teszi ki: a nagy arányban előforduló fehérjék a gélképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket, ezért a tojásfehérje mintáknál nagy kihívást jelent, hogy csökkentsük ezek gyakoriságát. Munkánk során több minta-előkészítési és frakcionálási módszert teszteltünk: különböző összetételű lízispufferekkel szolubilizáltuk a fehérjéket, molekulasúly szerint frakcionáltunk szeparáló oszlopok segítségével. A nagy gyakoriságú fehérjék számának csökkentését egy fehérje-specifikus peptid-ligand kötődésen alapuló rendszerrel végeztük. Egy optimalizált eljárás kidolgozásával megnő annak a valószínűsége, hogy az adott kezelésre reagáló fehérje-biomarkereket azonosítsuk.
Kulcsszavak: tojás, proteomika, poliakrilamid gélelektroforézis

Possibilities of sample preparation and fractionation in egg proteomics

Abstract

The application of proteomics is relevant to physiology, reproduction, immunology, muscle and lactation biology in animal science, although its use is still limited. Thousands of proteins can be analysed using proteomics in an experiment, while other methods analyse just a few proteins at a time. Consequently, the cell response to the altered environment can be thoroughly monitored by proteomic tools. There is a lack in the knowledge of gel-based proteomic methods of egg as only a limited number of protocols can be found in the literature, thus sample purification and fractionation require a time consuming optimisation procedure. In addition, three high-abundance proteins represent 77% of egg white proteins. These proteins make the detection of low-abundance proteins very difficult, so the dynamic range of protein concentrations should be reduced. The aim of this study was to test different sample preparation and fractionation methods. Egg proteins were solubilized with different lysis buffers and separated based on molecular

weight of proteins with ultrafiltration. A highly diverse bead-based library of combinatorial peptide ligands was used to reduce the high-abundance proteins in egg samples. Development of an optimised method can increase the chance of identification of protein biomarkers.
Keywords: egg, proteomics, polyacrylamide gel electrophoresis

Irodalmi áttekintés

Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy mérésen belül több ezer fehérje meghatározására (*Lippolis és mtsai*, 2008). A proteomikai vizsgálatok számos bonyolult módszert kombinálnak a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására (*Dutt és mtsai*, 2000). Leggyakrabban használt eljárás az egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel (1D és 2D PAGE) szeparált fehérjék enzimes hidrolízis utáni tömegspektrometriás meghatározása. Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, szaporodásbiológiai, immunológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat, bár ezek felhasználási területei még korlátozottak (*Bendixen és mtsai*, 2011).

A tojás kétdimenziós poliakrilamid gél alapú analízisének metodikája még nem kiforrt, a nemzetközi irodalomban kevés számú részletesen közölt protokoll található, így a mintakezelés, tisztítás, frakcionálás lépései igen hosszú optimalizálási munkát igényelnek. Ezek mellett a tojásfehérje minták fehérjefrakciójának 77%-át három, nagy gyakoriságú fehérje teszi ki: 54% ovalbumin, 12% ovotranszferrin, 11% ovomucoid (*Boschetti és Righetti,* 2008), a tojás sárgájában is megtalálható számos nagy gyakoriságú fehérje. Ezek a nagy számban előforduló fehérjék a gélképeken elfedhetik a számunkra nagyobb jelentőséggel bíró kisebb gyakoriságú proteineket (*Farinazzo és mtsai*, 2009), ezért nagy kihívást jelent, hogy csökkentsük ezeknek a fehérjéknek a gyakoriságát. A 2D gél alapú vizsgálatok sikerességét nagymértékben befolyásolja a minta előkészítése (*Molloy,* 2000). Figyelembe kell vennünk a vizsgált fehérjék oldhatóságát, méretét, töltését, izoelektromos pontját, melyek alapján különböző fehérjefrakciókat hozhatunk létre.

Jelen tanulmányban célul tűztük ki, hogy különböző minta-előkészítési és frakcionálási lehetőségeket teszteljünk tojásfehérje és tojássárgája mintákon, melyek segítségével a későbbiekben a tojásminták proteomikai elemzésének hatékonysága javulhat.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

Friss tojást gyűjtöttünk ketreces tartástechnológiában tartott tyúkoktól. A tojásfehérjét és -sárgáját elválasztottuk egymástól, majd a tojásfehérjét mágneses keverővel homogenizáltuk, hogy csökkentsük a viszkozitását (*Qiu és mtsai,* 2012). A mintákat a további felhasználásig cryocsövekben, -80°C-on tároltuk.

Mintatisztítás és frakcionálás

A -80ºC-on tárolt mintákból, a tojásfehérje és -sárgája esetében is, 30µl-t homogenizáltunk 500µl lízispufferben. Két különböző lízispuffert teszteltünk: 1. puffer: 2M thiourea, 8,5M urea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 2. puffer: 8,5M urea, 2% CHAPS, 50mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. Egy órát jégen inkubáltuk a

mintákat gyakori vortexelés mellett, ezt követően 15000g-n 45 percig centrifugáltuk. A felülúszót használtuk a későbbi vizsgálatokhoz.

További kezelésként a felülúszó egy részét 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) segítségével is tisztítottuk. A kit megszabadítja a mintát a detergensektől, sóktól, nukleinsavaktól és lipidektől, valamint koncentrálja a fehérjéket. A tisztítás sikerességét egy- és kétdimenziós gélelektroforézissel ellenőriztük.

A méret szerinti frakcionálás szeparáló szűrők segítségével történt: három különböző mérettartományú filtert használtunk: 100kD, 50kD és 30kD. 1 ml (1mg/ml) mintát vittünk fel a 100kD-os centrifugális szűrőre, melyet 700g-n 30 percig centrifugáltunk. Az átfolyó fehérje oldatot az 50 és a 30kD-os fehérje szeparáló szűrőre vittük tovább, majd 10000g-n 30 percig centrifugáltuk (*Greening és Simpson*, 2010). A frakcionálás hatékonyságát egydimenziós gélelektroforézissel vizsgáltuk.

A nagy gyakoriságú fehérjék számának csökkentése ProteoMiner Kittel (Bio-Rad) történt (a gyártó által javasolt protokollt követve). A kit fehérje-specifikus elválasztást tesz lehetővé, mely peptid-ligand kötődésen alapul. Az elválasztás sikerességét egydimenziós gélelektroforézissel ellenőriztük.

Egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis

Az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézist megelőzően a mintákat SDS tartalmú pufferben forraltuk 5 percig. 30µg fehérjét vittünk fel a 4-12%-os grádiens gélekre, majd 170V feszültséggel futtattuk, míg a jelző festék el nem érte a gél alját.

A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézishez a különböző módon előkészített minták mindegyikéből 200µg fehérjét vittünk fel a 7cm-es pH 3-10-es és pH 5-8-as IPG stripekre. A rehidratáló oldat összetétele: 2M thiourea, 8M urea, 2% CHAPS, 15mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002% Bromphenol Blue. A pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban. Az izoelektromos fókuszálás lépései: 1. lépés 250V 20min Linear Ramp; 2. lépés 4000V 2,5h Linear Ramp; 3. lépés 4000V 10000Vh Rapid Ramp, 20°C-on 50µA/strip. A fókuszált stripeket az SDS-PAGE előtt equilibráltuk. 10 percig inkubáltuk az equilibráló I. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05M Tris/HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2% DTT), majd 10 percig az equilibráló II. oldatban (6M urea, 2% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2,5% iodoacetamide). Második dimenzióban 12%-os géleken történ a fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztása. A futtató puffer 1X Tris-Glycin-SDS oldat volt. A poliakrilamid géleken lévő fehérjefoltok láthatóvá tételére Colloidal Coomassie G-250 festéket használtunk (*Dyballa és Metzger*, 2009).

Eredmények és értékelés

Számos tesztelő futtatást követően kiválasztottuk a nagyobb hatékonyságú lízispuffert, melynek összetétele a következő volt: 2M thiourea, 8,5M urea, 4% CHAPS, 60mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte. A tojássárgája és a tojásfehérje minták esetén is ezt a puffert alkalmaztuk a további vizsgálatoknál. Az *1. és 2. ábrán* látható a tojásfehérje és tojássárgája poliakrilamid gélképe a kétdimenziós elválasztást követően. 2-D Cleanup Kit (BioRad) segítségével tiszítottuk tovább a felülúszókat, majd egy- és kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el a fehérjéket. A tojássárgája minták esetén a 2D gélképeken a Cleanup Kit 20%-kal növelte a látható fehérje spotok számát, a tojásfehérje mintáknál ezt nem tapasztaltuk. Az 1D géleken egyik mintatípusnál sem történt javulás Cleanup Kit hatására (*3. ábra*). Tojássárgája és -fehérje minták esetén a centrifugális szűrők segítségével végzett

szeparálással nem értük el a kívánt eredményt. Három különböző mérettartományú filtert teszteltünk (100kDa, 50kDa és 30kDa). A 100kDa-os szűrők, melyeknek a 100kDa-nál kisebb fehérjéket át kellene engedniük, szinte a teljes fehérjemennyiséget visszatartották. A 100kDa-os szűrőn történt szeparálást követően a fennmaradt fehérje frakció egydimenziós gélképe a *4. ábrán* látható. Ennél a két mintánál csak a 100kDa-nál nagyobb régióban szabadna sávoknak megjelenni a gélen. Az 50 és 30kDa-os szűrőkkel sem értük el a kívánt eredményt. Ennél a két típusnál, a gyártó ajánlása alapján, a 100kDa-os szűrőn átfolyó fehérje frakciót használtuk a szeparáláshoz. Szintén a *4. ábrán* látható a szeparálás eredménye; megfigyelhető, hogy az 50 és a 30 kDa-nál nagyobb régiókban is több fehérje sáv található. Azt valószínűsítjük, hogy a minta komplexitása miatt nem működtek megfelelő hatékonysággal a méret szerint szeparáló centrifugális szűrők.

A fehérje-specifikus elválasztást ProteoMiner (BioRad) kittel végeztük, mely egy peptid-ligand kötődésen alapuló rendszer. A kereskedelmi forgalomban nem kaphatók olyan peptid-ligand könyvtárak, melyek a tojásmintákban lévő nagy gyakoriságú fehérjék számát csökkentenék, de a vérplazmára optimalizált kitek esetleg működhetnek tojásminták esetében is. A *3. ábra* 5. oszlopában ProteoMiner kittel tisztított tojássárgája minták láthatók. Ha összehasonlítjuk ezeket a 2. oszlopban lévő csak lízispufferrel kezelt mintával, látható, hogy a ProteoMiner használatával a 100-200kDa-os, valamint az 50-75kDa-os régióban több fehérjesáv vált láthatóvá. A ProteoMiner-rel tiszított tojásfehérje mintáknál az egydimenziós poliakrilamid géleken nem jelentek meg új sávok (*3. ábra* 6. minta) a csak lízispufferrel kezelt mintákhoz képest (*3. ábra* 1. oszlop), de a nagy gyakoriságú fehérjék, pl. a 45 kDa körül látható ovalbumin és a 70kDa-nál látható ovotransferrin mennyisége csökkent.

***1. ábra*: Tojásfehérje 2D PAGE gélképe, pH 3-10 és pH 5-8 stripek használatával**

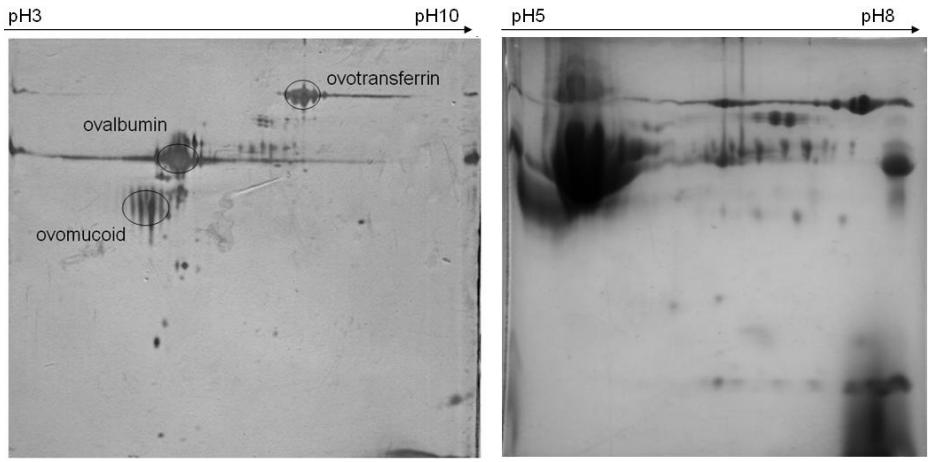


Fig. 1: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg white, pH ranges are 3-10 (left) and 5-8 (right)

***2. ábra*: Tojássárgája 2D PAGE gélképe, pH 3-10 és pH 5-8 stripek használatával**

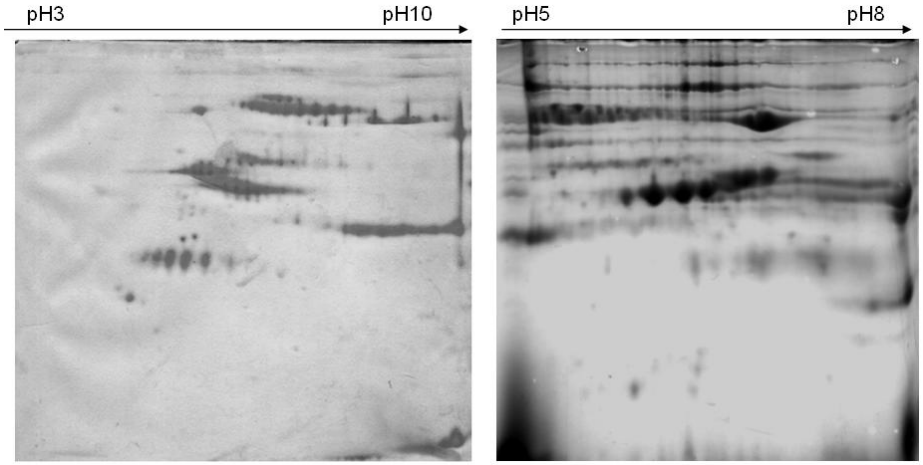


Fig. 2: Two-dimensional gelelectrophoresis of egg yolk, pH ranges are 3-10 (left) and 5-8 (right)

***3. ábra*: Tojásminták egydimenziós gélképe 2D-Cleanup Kit és ProteoMiner Kit használatát követően**

1. tojásfehérje, 2. tojássárgája, 3. tojássárgája (2D-Cleanup Kit), 4. tojásfehérje (2D-Cleanup Kit), 5. tojássárgája (ProteoMiner), 6. tojásfehérje (ProteoMiner)

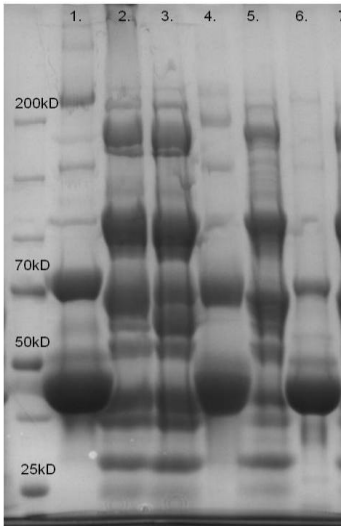


Fig. 3: One-dimensional gelelectrophoresis of egg samples using 2D-Cleanup Kit and ProteMiner Kit

1. egg white, 2. egg yolk, 3. egg yolk using 2D-Cleanup Kit, 4. egg white using 2D-Cleanup Kit, 5. egg yolk using ProteoMiner, 6. egg white using ProteoMiner

***4. ábra*: Méret szerinti frakcionálás centrifugális szűrőkkel**
1. tojássárgája 100kDa≥fehérjék, 2. tojásfehérje 100kDa≥fehérjék, 3. tojássárgája 50kDa≤fehérjék, 4. tojásfehérje 50kDa≤fehérjék, 5. tojássárgája 30kDa≤fehérjék, 6. tojásfehérje 30kDa≤fehérjék

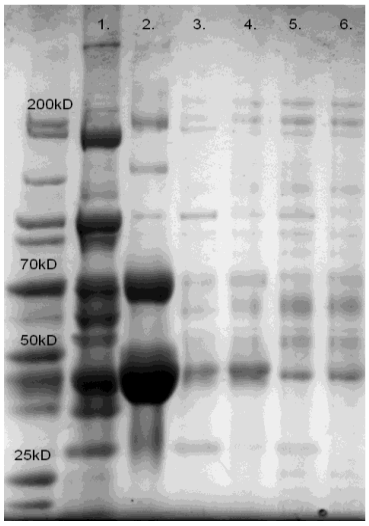


Fig. 4: Fractionation using centrifugal ultrafiltration
1. egg yolk 100kDa≥proteins, 2. egg white 100kDa≥proteins, 3. egg yolk 50kDa≤proteins, 4. egg white 50kDa≤proteins, 5. egg yolk 30kDa≤proteins, 6. egg white 30kDa≤proteins

Következtetések és javaslatok

A minta-előkészítés és frakcionálás során három fontos tényezőt kell szem előtt tartanunk. Az egyik a fehérjék kinyerésének hatékonysága, a másik kettő pedig az idő- és költségtakarékosság.

A megfelelő lízispuffer kiválasztása sarkallatos pontja a proteomikai vizsgálatoknak, hiszen itt dől el, hogy mennyi fehérjét tudunk oldatba vinni. Jelen esetben a magasabb koncentrációban jelen lévő kaotrópikus és redukáló ágenseket (urea, thiourea, DTT), valamint denaturáló szert (CHAPS) tartalmazó oldat bizonyult hatékonyabbnak. A pH 5-8-as stripek használatával jobb felbontást érhettünk el az adott tartományban, bár így azok a fehérjék, melyek ezen a régión kívül estek nem látszottak a gélen. A Cleanup Kit használata sok mintatípusnál elengedhetelen (pl. vérplazma), mert a magas sókoncentráció lehetetlenné teszi az izoelektromos fókuszálást. A tojássárgája minták esetén a 2D gélképeken a Cleanup Kit 20%-kal növelte a látható fehérje spotok számát. A többi esetben nem tapasztaltunk szignifikáns javulást. A ProteoMiner Kit használata az egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis alapján tojássárgája minták esetén indokolt, a tojásfehérje mintáknál nem növelte a fehérje sávok számát.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., Miller, I. (2011): Farm animal proteomics − A review. Journal of proteomics, 74. 282-293.

Boschetti, E., Righetti, P.G. (2008): The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species. Journal of proteomics, 71. 255-264.

Dutt, M.J., Lee, K.H. (2000): Proteomic analysis. Current Opinion in Biotechnology, 11. 176-179.

Dyballa, N., Metzger, S. (2009): Fast and sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrilamide gels. Journal of Visualised Experiments, 30. 1431.

Farinazzo, A., Restuccia, A., Bachi, A., Guerrier, L., Fortis, F., Boschetti, E., Fasoli, E., Citterioa, A., Righetti, P.G. (2009): Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. Journal of Chromatography A, 1216. 1241-1252.

Greening, D.W., Simpson, R.J. (2010): A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (≤ 25K) component of human plasma proteome. Journal of proteomics, 73. 637-648.

Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A. (2008): Centennial Paper: Proteomics in animal science. Journal of Animal Science, 86. 2430-2441.

Molloy, M.P. (2000): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. Analytical Biochemistry, 280. 1-10.

Qiu, N., Ma, M., Cai, Z., Jin, Y., Huang, X., Huang, Q., Sun, S. (2012): Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. Journal of proteomics. 75. 1895-1905.

A GAZDASÁGI LOVAK HASZNÁLATÁNAK ÉS TENYÉSZTÉSÉNEK HELYZETE HAZÁNKBAN

Hajdú Péter, Horvainé Szabó Mária

Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet
2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.
Hajdu.Peter.1@hallgato.szie.hu

Összefoglalás

A munka célja egyrészt a téma szakirodalmi összegzése, másrészt az igás hasznosítás lehetőségeinek és jelen helyzetének vizsgálata a ló fajban, melyhez a Magyar Hidegvérű Lótenyésztő Országos Egyesülete nyújtott segítséget tenyésztési adatok szolgáltatásával, illetve az egyesület tagjai egy kérdőíves felmérés során, annak kitöltésével. Ennek oka, hogy hazánkban az igáshasznosításban – a ménlétszám alapján – a hidegvérű fajták a legjelentősebbek.
Összesen 302 db kérdőívet küldtünk el, melyek közül 145 db érkezett vissza. A kérdőív három témakört érintett: általános gazdasági, tenyésztési és hasznosítási jellemzőket. Az egyesület által kiadott törzskönyvi adatok a ménállomány (n=186) vizsgálatára adtak lehetőséget.
A kérdőívek kiértékelése alapján megállapítható, hogy a mintában (n=145) a legnagyobb gyakorisággal előforduló igáshasznú fajta a magyar hidegvérű ló (62%). A gazdaságok többsége önálló tenyészet (84%), a telepek túlnyomó részében (60%) csupán 1-5 egyed található. Az állomány 78%-a 10 évesnél fiatalabb, amelyben a mének és a kancák aránya megfelelőnek mondható, mely tendencia a növekvő állatlétszám ellenére sem változott. A válaszadók szerint az igásállat használata olcsóbb, illetve az elvégzett munka minősége is jobb a gépek által végzettnél.
Az egyesület törzskönyvi adatait elemezve megállapítható, hogy az aktív fedezőmének közül a legtöbb Veszprém megyében (14%) található, de Borsod-Abaúj-Zemplén megyében nincs aktív mén bejegyezve. A genotípus és a minőségi osztályokba sorolás statisztikailag igazolható hatással van a mének testméreteire ($P<0,05$). Megállapítást nyert, hogy a hazai ménállomány egyedei – a percheron fajtába tartozók kivételével – a marmagasság tekintetében megfelelnek a fajta standardben megadott követelményeknek ($P<0,05$).
Kulcsszó: hidegvérű, igáshasznosítás, lótenyésztés

Use and breeding situation of farm horses in Hungary

Abstract

The aim of our study is to review the literature of this field and to analyze the possibilities and current situation of draught animal power utilisation in horse species, based on breeding data provided by the Hungarian Coldblood Horse Breeders Association and on a questionnaire survey taken part by the members of this association in. The reason of the data collection was that cold-blood breeds are the most important by stallion population in Hungary.

Altogether 302 questionnaires were sent to horse keepers, and 145 of those were returned. The questions covered three fields: general economical data, breeding and utilization traits. Data

provided by the breeding organization gave us the possibility to analyze the stallion population (n=186). Results of the questionnaire survey showed that nowadays the most important breed in draught animal power utilisation is the Hungarian Coldblood Horse (62%) in the sample (n=145). The majority of farms are independent herd (84%) and most farms have only 1-5 horses. 78% of the population is under 10 years old, and the ratio of stallions and mares, which is appropriate, hasn't changed in spite of the increasing number of animals. According to the respondents, the use of draught animals is cheaper and their work quality is better than that of machines.
Analyzing pedigree data, it appeared that most active stallions is in Veszprém county (14%), on the contrary, there are no active stallions in Borsod-Abaúj-Zemplén county. The genotype and the breeding quality classes have significant effect on the body measurements of stallions ($P<0.05$). The Hungarian stallion population excluding Percheron breed fit the requirements of the breed standard in the body measurements of height at withers ($P<0.05$).
Keywords: coldblooded, draught animal power utilization, horse breeding

Bevezetés

Vizsgálatainkat egy olyan hasznosítási móddal kapcsolatban végeztük, mely az elmúlt évtizedekben szinte a feledés homályába merült. Ez érvényes mind a gyakorlati alkalmazás, mind pedig a szakirodalom területére. Napjainkra a fejlett országokban a nagyfokú gépesítés kiszorította az igásállatokat a mezőgazdasági termelés szinte minden területéről, mondván, ez egy munka- és időigényes módszer, mely hatékonysága sem kielégítő. Az elmúlt években azonban a gazdálkodóknak mind nagyobb terhet jelent gépeik fenntartása, a növekvő vételi ár, üzemanyag, biztosítási, karbantartási költségek és a csökkenő hasznos élettartam miatt. Így nem véletlen, hogy a kisebb üzemmérettel rendelkező gazdálkodók kiemelt fontosságúnak tartják a gépek kiváltását.

Így vizsgálataink célja volt a szakirodalom alapján – történeti áttekintéssel – bemutatni az igáshasznosítás régi és jelen mezőgazdasági körülmények közötti alkalmazásának lehetőségeit (melyre most hely hiányában nem térnénk ki), továbbá felmérni a lófaj igáshasznosításának helyzetét Magyarországon. Ezen belül is a hidegvérű fajtakörre korlátoztuk a kutatást, mivel a szakirodalom alapján ezek jelentősége a legnagyobb. Végül a hazai hidegvérű ménállomány jellemzése történt törzskönyvi adatok alapján.

Anyag és módszer

Az igáshasznosítás hazai helyzetének felmérésére a kérdőíves kutatást választottuk. A Magyar Hidegvérű Lótenyésztő Országos Egyesület tagjainak, a nyilvántartás alapján 302 kérdőívet küldtünk ki. 153 érkezett vissza, s ezek közül is 6 db kézbesítés nélkül, míg további 3 tag befejezte tevékenységét. A kérdőívben 3 kérdéskör van, ezek: a gazdaság általános adatai, a telepen folyó tenyésztői munka és a hasznosításra vonatkozó adatok. Az egyesület nyilvántartásából 186 aktív mén tenyésztési és küllemi adatait vizsgáltuk. Az adatok statisztikai elemzéséhez az SPSS 18.0 programcsomagot használtuk. Az ábrák és grafikonok a Microsoft Office Excel program felhasználásával készültek.

Eredmények és értékelés

A vizsgált tenyészetek jellemzése

Az ENAR szerinti besorolása alapján a vizsgálatban részt vevő tenyészetek 84%-a önálló, míg 16%-a megyei körzetbe sorolt. Az *1. ábra* a tenyészetekben tartott állomány nagyságát, illetve annak változását szemlélteti az utolsó három évben. 5 kategóriát állítottunk fel. A telepek 60%-ában 5 vagy annál kevesebb állat található, míg a nagyobb állománnyal rendelkező gazdaságok száma drasztikusan kevesebb, s az idő függvényében köztük csökkenő tendencia figyelhető meg. A *2. ábra* a fajták megoszlását mutatja. A magyar hidegvérű fajta a legelterjedtebb, mely a gazdaságok 62%-ában jelen van, emellett kisebb arányban melegvérű lófajták, mint pl. a nónius, lipicai, sőt a kuriózumnak számító nóri lófajta is megtalálható.

***1. ábra*: A tenyészetek állományméret szerinti megoszlása 2010-2012 évek között**

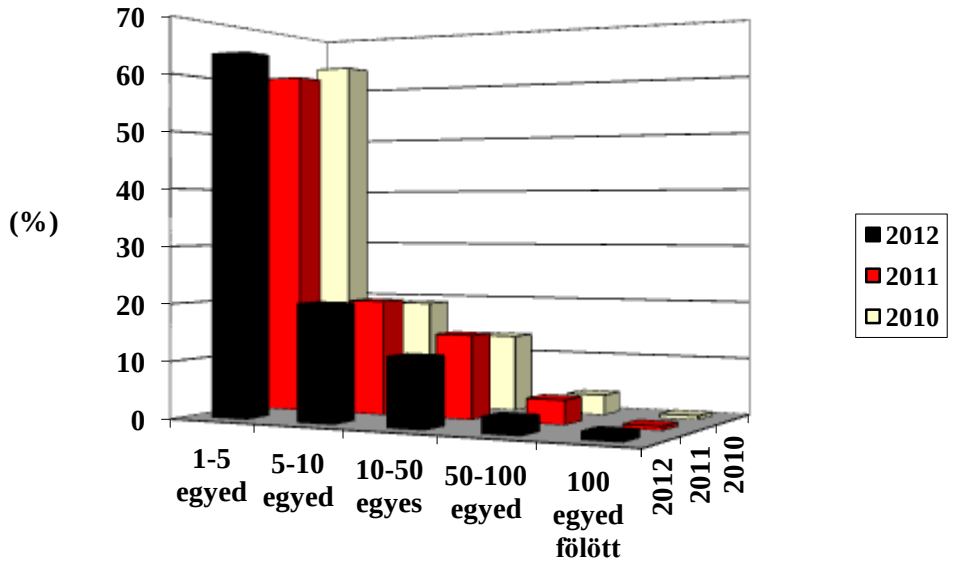


Fig. 1: Distribution of the farms by herd size between 2010 and 2012

A *3. ábra* a lóállomány életkor szerinti megoszlását és annak változását szemlélteti. 4 életkor kategóriát állítottunk fel. Megfigyelhető a fiatal állatok nagyobb részaránya, míg 2010-ben közel ugyanannyi állat tartozott az első és a második korcsoportba, az ezt követő két évben közel negyedével növekedett az első korcsoportba tartozó állatok száma.

2. ábra: A fajták százalékos megoszlása a tenyészetekben

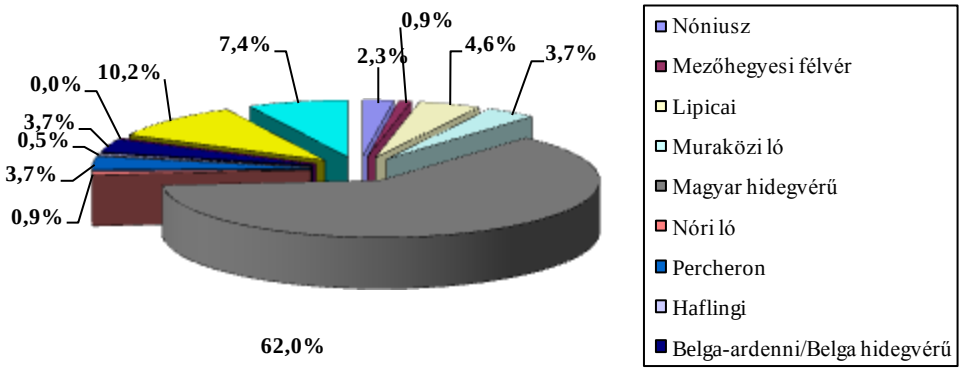


Fig. 2: Percentage distribution of the breeds in herds

3. ábra: A lóállomány életkor szerinti változása 2010-2012 között

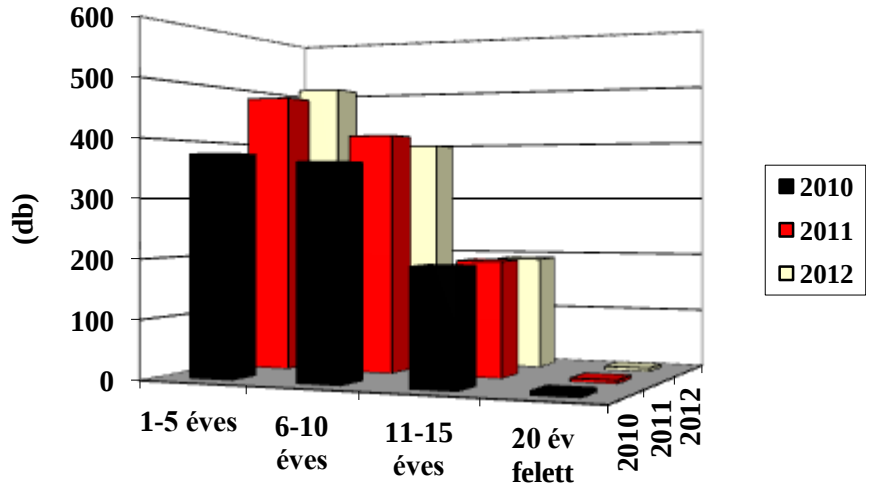


Fig. 3: Changing of horse herd by age between 2010 and 2012

A *4. ábra* a gazdák által alkalmazott szelekciós szempontok gyakorisági megoszlását mutatja. Megállapítható, hogy a válaszadók többsége – közel azonos arányban – a küllemet és a származást tartja a legfontosabbnak.

4. *ábra*: Az alkalmazott szelekciós szempontok

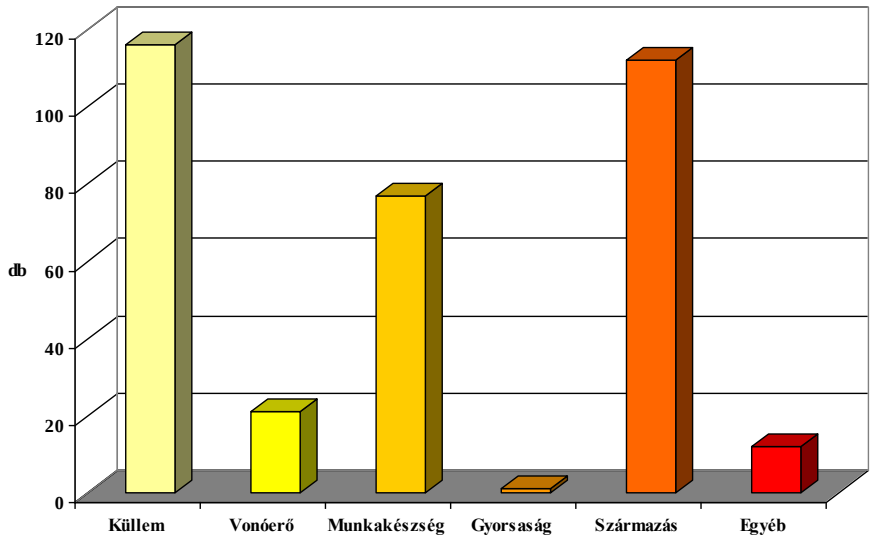


Fig. 4: Applied selection factors
Titels of the coloumns in order: body conformation, draught power, working capacity, speed, pedigree, others

A lóállomány hasznosítási típusok szerinti megoszlását elemezve kitűnt, hogy legtöbben igázás céljából tenyésztenek lovakat. Arra, hogy mi motiválja a gazdákat az igáshasznosításra közel 60%-uk a gazdasági megfontolást helyezte előtérbe. Ezt követően hasonló arányban hivatkoztak a hagyományőrzésre, a munkavégzés jobb minőségére és egyéb okokra. A megadott opciók közül az üzembiztosságot választották legkevesebben.

5. *ábra*: A vásárlók típusonkénti megoszlása

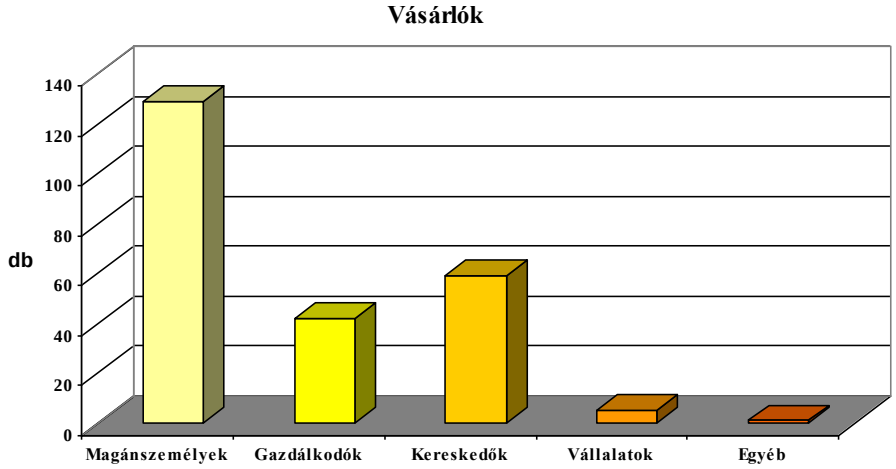


Fig. 5: Distribution of costumers by type
Titels of the coloumns in order: private person, farmer, tradesman, company, others

Az *5. ábra* a vásárlók típusait szemlélteti. A magánszemélyek aránya a legtöbb. A *6. ábrán* látható, hogy főleg tenyésztés céljából vásárolnak. Az adatokból kitűnik, hogy kisebb mértékben, de közel azonos arányban vásárolnak lovakat mezőgazdasági munkára és húsló előállításra.

6. ábra: A vevők vásárlásának célja

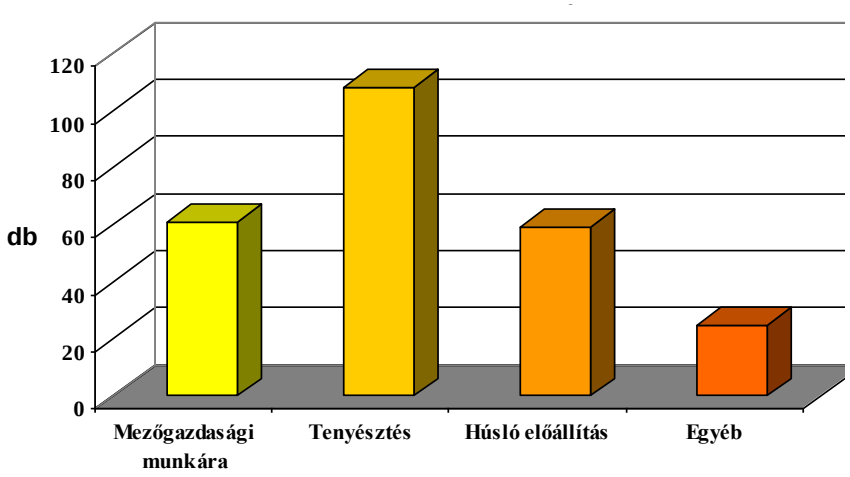


Fig. 6: The purchase intent of customers
Titels of the coloumns in order: agricultural capacity, breeding, beef horse production, others

A hidegvérű tenyészmén állomány jellemzése

Az Egyesület 2012-ben 186 aktív fedezőmént tartott nyilván, melyek 50-50%-ban állami, illetve magántulajdonban vannak. A mének megyék szerinti eloszlásából kiderül, hogy a legtöbb mén Veszprém megyében található. Borsod-Abaúj-Zemplén megyében nincs bejegyzett fedezőmén. Az Egyesület a méneket 4 kategóriába sorolta (*7. ábra*): őshonos veszélyeztetett, őshonos, melyek részaránya 15% és 21%, továbbá nem őshonos (4%) és nem őshonos ajánlott. Ez utóbbi teszi ki az állomány 61 %-át.

A méneket elit, I., I/II. és II. minőségi osztályokba sorolják. Az aktív mének közül csupán 6% ért el elit minősítést. A többség, közel 70 %, az I/II. és II. osztályba tartozik. A mének több mint fele főtörzskönyves, 46,2%-a került melléktörzskönyvbe. Az ősi sorok száma szerinti eloszlást vizsgálva megállapítható, hogy a legtöbb aktív apaállat csak egy utódgenerációval rendelkezik. A vélelmezhetően favorizált méneknek nyolc, illetve kilenc utódgenerációja is van. Természetesen ez utóbbiak létszáma a legkevesebb. Az egyesület nyilvántartásában 35 ménvonal található. 18 vonal csupán 1-1 állatot számlál, s további 12 vonalban sincs több 7 egyednél. A legtöbb ményt a magyar hidegvérű fajtán belüli B 13 vonal adja, még jelentős létszámú a P 1, P201, P 4 és P 3 vonalak, melyek a percheron fajtába tartoznak.

***7. ábra*: Az egyes ménvonalak gyakorisági megoszlása**

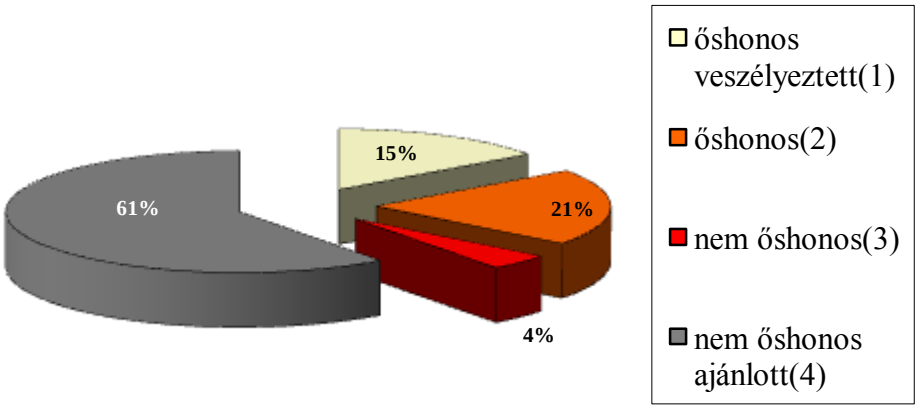


Fig. 7: The frequency distribution of the stallion lines
autochthonous endangered(1), autochthonous(2), non-autochthonous (3), non-autochthonous registered(4)

A *8. ábra* a mének életkor szerinti megoszlását szemlélteti. Nem jellemző a normál eloszlás, hiszen nagy a fiatal 4 és a 6 éves mének aránya.

***8. ábra*: A mének életkor szerinti megoszlása**

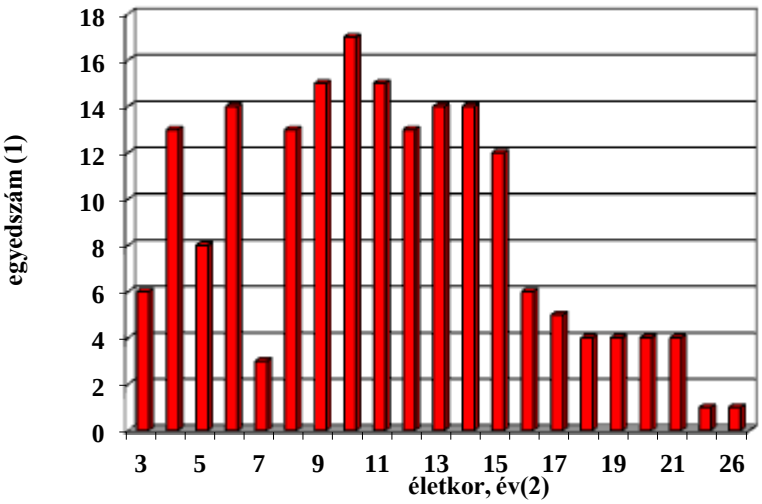


Fig. 8: Distribution of stallions by age
individual number(1), age, year(2)

A nyilvántartásban a testméretek közül a bottal és szalaggal mért marmagasság, az övméret és a szárkörméret szerepel. A korreláció-vizsgálat bizonyította, hogy a testméretek között pozitív, szignifikáns összefüggés van (P=0,0001, α=0,05). Varianciaanalízissel (*1. táblázat*) vizsgáltuk, hogy a ménvonalaknak van-e hatása a testméretekre. A genotípusnak a marmagasságra és az övméretre van statisztikailag igazolható (P=0,0001, α=0,05) hatása. A Tamhane's post-hoc teszt alapján a bottal mért marmagasságban a nem őshonos és az őshonos veszélyeztetett, valamint az őshonos vonalakba tartozó mének átlagértékei között van szignifikáns különbség (P=0,009, α=0,05).

***1. táblázat*: A ménvonalak hatása a testméretekre – a varianciaanalízis eredménytáblázata**

Testméretek(1)		**Eltérés-négyzet-összeg(2)**	**df**	**Átlagos négyzetes eltérés(3)**	**F**	**P-érték(4)**
Marmagasság bottal mérve(5)	Csoportok között(9)	623,681	3	207,894	8,960	**0,0001**
	Csoportokon belül(10)	4222,878	182	23,203		
	Összes(11)	4846,559	185			
Marmagasság szalaggal mérve(6)	Csoportok között	876,387	3	292,129	10,904	**0,0001**
	Csoportokon belül	4876,092	182	26,792		
	Összes	5752,478	185			
Övméret(7)	Csoportok között	1429,585	3	476,528	7,205	**0,0001**
	Csoportokon belül	12037,281	182	66,139		
	Összes	13466,866	185			
Szárkörméret(8)	Csoportok között	117,658	3	39,219	1,744	0,160
	Csoportokon belül	4091,726	182	22,482		
	Összes	4209,383	185			

Table 1: Effect of stallion lines on body measurements – result table of variance analysis
body measurements(1), sum of squares(2), mean square(3), significance level(4), height at withers measured with stick(5), height at withers measured with tape(6), heart girth(7), cannon girth(8), between groups(9), within groups(10), total(11)

Vizsgáltuk, hogy van-e hatása a mének minőségi osztályba sorolásának a testméretekre. Megállapítható, hogy a bottal, illetve szalaggal mért marmagasságra, valamint az övméretre statisztikailag igazolható hatással van az, hogy melyik minőségi osztályba sorolták (P<0,05). Viszont ugyanez nem mondható el a szárkörméretet illetően. Tukey és Tamhane's post-hoc

tesztekkel vizsgáltuk, mely minőségi osztályok között van statisztikailag igazolható eltérés. Az elit osztályba sorolt egyedek átlagértékeik, mindkét marmagasság paraméter tekintetében eltértek a másik három osztályba soroltakétól. Mindazonáltal különbség figyelhető meg az I. és I/II., továbbá az utóbbi és a II. minőségi osztályok között. Az övméret alapján a II. osztályba sorolt mének átlaga mutatott szignifikáns eltérést a többi csoport egyedeinek átlagától (P=0,002, α=0,05). A szárkörméret esetében viszont csak az I/II. és a II. osztályú mének átlagai között lehet statisztikailag kimutatható különbséget megfigyelni (P=0,024, α=0,05).

Végül a *vérvonalak hatását* elemeztük. Ehhez azokat a vérvonalakat vizsgáltuk, amelyek rendelkeztek a statisztikai elemzéshez szükséges egyedszámmal. A magyar hidegvérű fajtából a B 6, a B 36 és a B 13 vonalakat, míg a *nem őshonos vonalak* közül az A 1, a P 1, P 3, P 4 és a P201 jelűeket használtuk fel. Az átlagos marmagasság értékek alapján megállapítható (*9. ábra*), hogy mind az ardenni, mind a magyar hidegvérű fajtába tartozó vonalak ménjei megfelelnek a fajtastandard-nek (P=0,014, α=0,05), míg a percheron fajtába tartozó vonalak átlagértékei nem érik el a standard alsó határértékét. Az elemzés ugyan kimutatta, hogy egyes vérvonalak átlagos marmagasságában statisztikailag igazolt különbségek vannak (P<0,05), ugyanakkor azt nem igazolta, hogy a vérvonalnak a testméretekre általános hatása lenne.

***9. ábra*: A vérvonalak átlagos marmagassága (bottal mérve)**

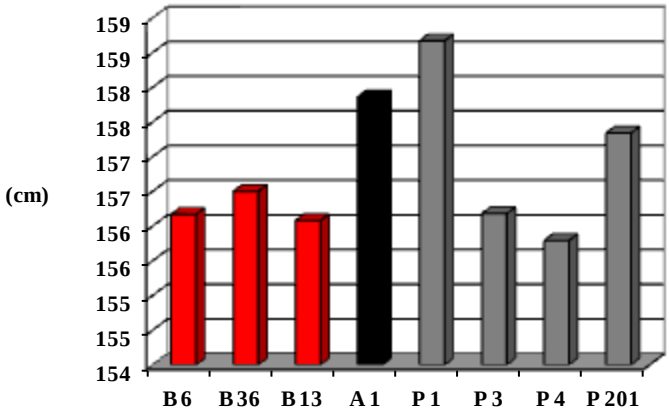


Fig. 9: The average height at withers (measured with stick) of the blood lines

Következtetések és javaslatok

A kérdőíves felmérés alapján megállapítható, hogy a tagok jelentős része nem érdekelt az adatszolgáltatásban, és a tenyésztő egyesület adatbázisa elavult. A legtöbb tenyésztőnek kevés állata van, ezért valószínűsíthető, hogy érdemi tenyésztési munka nem folyik gazdaságaikban. Magánszemélyeknek, és főként tenyésztés céljából adják el lovaikat. Feltételezhető, hogy ennek hátterében az egyesület által nyújtott előnyök kihasználása áll. Felvetődik az a kérdés, hogy az új tulajdonosok tenyésztésre megvásárolt lovaikkal ténylegesen tenyésztenek-e, vagy csak szaporítanak. Az eladásra szánt állatokat a tenyésztők java része kiképzi, amiből következik, hogy van kereslet a fogatolható hidegvérű lovakra. Ezt igazolni látszik, hogy a húsló-előállítás mellett a mezőgazdasági munkára történő használat a második leggyakoribb ok a vásárlók körében. Ugyanakkor ennek ellentmond a felmérésnek az az eredménye, hogy a gazdák többsége

nem, vagy csak részben műveli lovakkal saját termőföldjét. Erre talán az lehet a magyarázat, hogy vagy nem rendelkeznek szántóval, vagy inkább a vállalkozók szolgáltatásait veszik igénybe. Továbbá az adatokból egyéb hasznosítási lehetőségekre nem derült fény.

A mének elemzéséből megállapítható, hogy habár az Egyesület 35 mén vérvonalat tart nyilván, a vérvonalak több mint 50%-át (18) csak 1-1 mén alkotja. Ez utóbbi vonalak esetén felmerül, vajon lehet-e valóban már/még vonalakról beszélni.

Az ősi sorok és a mének életkorának elemzéséből kitűnt, hogy vannak preferált mének. Ezek fiatal koruk ellenére már számos utódgenerációval rendelkeznek. Arra, hogy mi áll ennek hátterében, az információkból nem derült fény. A feltárt kapcsolatok viszont arra engednek következtetni, hogy a tenyésztett fajták esetében a munkakészségnél a küllem komolyabb befolyásoló tényező a mének minősítésekor.

Mindezeket figyelembe véve javasolható az Egyesület számára olyan kölcsönös kapcsolatok kiépítése a mezőgazdasággal foglalkozó szervezetekkel, melyeknél lehetőség van igáslovak használatára. A tenyésztő egyesület „*gazdaságilóval”* láthatná el a termelőt, míg az adatokat szolgáltathatna a tenyésztéshez. Ezzel növelhető lenne a tenyésztői munka hatékonysága, a mind jobb és jobb minőségű haszonállatok előállítása, s a hasznosítás alapot biztosítana az igáshasznú fajták fenntartására.

Célszerű lenne további kutatásokat folytatni, és annak eredményeit terjeszteni a szakma berkein belül, segítve ezzel a tenyésztőket és a hasznosítás iránt érdeklődőket.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani Dexler Gábor lovas fakitermelőnek, Harka Csaba virágkertésznek, Szegedi Gábor ménesgazdának, Markos Lászlónak, a MHLOE elnökének és a Magyar Hidegvérű Lótenyésztő Országos Egyesület azon tagjainak, akik kérdőíveink kitöltésével hozzájárultak munkánkhoz.

A munkánkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat, illetve a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL és az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat támogatta.

A PARADICSOMTÖRKÖLY HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA BROJLERCSIRKE EGYES TERMELÉSI ÉS HÚSMINŐSÉGI PARAMÉTEREIRE

Holbok László[1], Erdélyi Márta[1], Kapás Sándor[2], Ancsin Zsolt[1], Bócsai Andrea[1], Balogh Krisztián[1], Mézes Miklós[1]

[1] Szent István Egyetem, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék, 2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
[2] Déli-Farm Kft., 6791 Szeged, Kiskundorozsma, Kettőshatári út 6.
laszlo.holbok@gmail.com

Összefoglalás

A paradicsomtörköly a konzervipar egyik legnagyobb mennyiségben képződő mellékterméke, amely döntően a paradicsom héját, magját és a gyümölcshús rostos alkotóit tartalmazza. Magas víztartalma, ill. rosttartalma miatt mindeddig döntően kérődzők takarmányozásában használták fel. A baromfi takarmányozásban történő felhasználásáról és hatásairól azonban viszonylag keveset tudunk, habár szárított formában könnyen bekeverhető az abrakkeverékbe.
A kísérletbe Cobb 500, szexált kakas állományt (n= 156) állítottunk be. Az állatokat 6 kezelési csoportba osztottuk, kezelésenként két ismétlésben. Két kísérleti csoport takarmányába paradicsomtörkölyt kevertünk 2,5, ill. 5% koncentrációban. Továbbá négy pozitív kontroll csoportot alakítottunk ki, melyek közül kettőben a paradicsomtörköllyel összevethető rosttartalmú rosthordozót kevertünk a takarmányba, a két kísérleti csoporttal azonos (2,5, ill. 5%) koncentrációkban. A másik két pozitív kontroll csoport takarmányába a rosthordozó mellett kantaxantint kevertünk, amellyel a paradicsomtörköly esetleges színező hatásának intenzitását kívántuk összevetni. A kísérlet 6 hétig tartott. Ez idő alatt heti rendszerességgel mértük a testúlyt és a takarmányfogyasztást. A hatodik hét végén laboratóriumi vágást végeztünk, amelynek során egyes vágási és húsminőségi paramétereket vizsgáltunk.
A termelési paraméterek tekintetében a paradicsomtörköly nem okozott lemaradást, sőt vágás idejére az 5%-os bekeverési arány bizonyult legkedvezőbbnek élősúly tekintetében. Meg kell jegyezni azonban, hogy takarmányfogyasztás is e csoportban volt a legnagyobb.
A vizsgált húsminőségi paraméterek közül kiemelendő a hússzín, ezen belül elsődlegesen a sárga szín intenzitását növelte a paradicsomtörköly, amely viszont a legtöbb faj esetében nem feltétlenül kedvező a fogyasztói megítélés szempontjából. Ehhez hozzájárul az a tapasztalat is, hogy a hús porhanyóssága romlott a bekeverési arány növelésével, egyúttal azonban a csepegési veszteség jelentős mértékben csökkent.
Kulcsszavak: takarmány, baromfi, paradicsomtörköly

Effects of dry tomato pulp on certain production and meat quality traits of broiler chicken

Abstract

Tomato pulp is one of the largest amount of by-products in the canning industry, which consists of peels, core culls and crushed seeds. Due to its high water and fibre content it has been used mainly in the nutrition of ruminants. Though its dried form can be easily used in poultry diets, its effect on production and quality traits is still not clear.
Hence, in our experiment 156 Cobb 500 cockerels were used. Birds were divided into 6 treatment groups, each with two repetitions. Feed of the two experimental groups was supplemented with 2.5 and 5% pomace, respectively. In two of our four – so called – control groups, same concentrations of a pure fibre supplement was added to the diet. While in two other groups, besides the above mentioned fibre supplement canthaxantine was also added to the feed, to compare the potential colouring effect of tomato pulp. The experiment lasted for six weeks, whilst body weight and feed intake of the birds were recorded weekly. After slaughter, some meat quality parameters were measured.
According to our results, tomato pulp did not have any negative effect on body weight and weight gain of the animals, actually, the highest final weight was measured in the 5% pomace supplement experimental group. However, feed consumption was measured at the highest in this group. Considering meat quality traits, pomace has significant effect on meat colour, particularly on yellow colour intensity, which is not really favourable from consumers' aspects in most species. In addition, tenderness of meat was negatively affected by increasing the rate of tomato pulp in the diet. At the same time, water holding capacity was improved in the experimental groups.
Keywords: forage, poultry, dry tomato pulp

Irodalmi áttekintés

Melléktermékek alkalmazása révén a takarmányozási költségek rendszerint csökkenthetőek, azonban felhasználásuk nagy körültekintéssel és a jogszabályi háttér, valamint a technológiai sorrend és fegyelem betartásával kezelendő.

Az élelmiszeripari melléktermékek rendszerint nagy táplálóértékkel rendelkeznek gazdasági állataink számára, egyesek értékes fehérjeforrásként, mások jelentős rost-, vagy egyéb szénhidrátforrásként hasznosíthatók. Ugyanakkor, esetenként mikotoxinokat vagy más élelmezési szempontból nem kívánatos anyagokat tartalmazhatnak.

Az elmúlt évtizedekben új iparágak jelentek meg, amelyek melléktermékei már ismert és új takarmány alapanyagok lehetnek a legtöbb gazdasági haszonállat takarmányozásában. Ugyanakkor olyan melléktermékek, amelyek évtizedeken keresztül folyamatosan rendelkezésre álltak, ám használatuk mégsem terjedt el, újra a figyelem középpontjába kerültek.

A hazai konzervipar legfontosabb alapanyagai az alma, csemegekukorica és a paradicsom. Ezek feldolgozása során eltérő mennyiségben képződnek a takarmányozásban felhasználható melléktermékek, rendszerint azonban ezek idényszerűen keletkeznek.

Magyarország egyik legnagyobb mennyiségben termesztett zöldségnövénye a paradicsom, a kedvező éghajlati viszonyok miatt kiváló minőségben és nagy mennyiségben előállított zöldségünk.

A paradicsomtörköly a legnagyobb mennyiségben képződő melléktermék a paradicsompüré-gyártásnak, a konzerviparon belül. Ipari hulladéknak tekinthető, de melléktermékként takarmányozási célra hasznosítható, szarvasmarha, sertés, nyúl, valamint vadak takarmányozásában (*Schmidt*, 1990). Újabban, ez a melléktermék újra a vizsgálatok kereszttüzébe kerül, mivel szárított formában folyamatos ellátása is biztosítottá válhat. Továbbá, a legújabb kutatások a paradicsomtörköly bioaktív anyagának (likopin) takarmányozási és húsminőségi hatásait vizsgálják.

A paradicsomhéj és a mag, amely a korábbiakban leírtak alapján kb. 50%-át adja a törkölynek, jelentős mennyiségű fehérjét és esszenciális aminosavat tartalmaz. A mag fehérjében sok metionin, cisztein és lizin található (*Persia és mtsai*, 2003).

A paradicsom termésének piros színét a likopin biztosítja, az érett paradicsomban a karotionidok 92%-át a likopin alkotja (*Ronen és mtsai*, 1999). Tojótyúkkal folytatott kísérletek alapján a takarmányba adagolt likopin hatékonyan felszívódik, amelyet a vér magas likopinkoncentrációja bizonyít. Ugyanakkor nagy hatékonysággal deponálódik a tojás sárgájában is (*Bárdos és mtsai*, 2005).

Az utóbbi években a termékminőség előtérbe kerülésével több olyan kutatást végeztek, amely a likopin színező hatását vizsgálták. A kísérletek elsősorban a tojássárgája színére koncentráltak, és az eredmények alapján, a likopin megfelelő dózisban sötétette a tojássárgája színét (*Kang és mtsai*, 2003). Érdekes módon, a hús színére gyakorolt potenciális hatására vonatkozóan nem állnak rendelkezésre kutatási eredmények.

Kísérletünk során ezért elsősorban arra kérdésre kerestük a választ, hogy a brojlercsirke takarmányába kevert paradicsomtörköly befolyásolja-e az állat termelési és húsminőségi paramétereit.

Anyag és módszer

A napos csibéket (Cobb 500, szexált kakas állomány) a mérlegelés után (n= 156) állítottuk be a kísérletbe. Az állatokat random 6 kezelési csoportra osztottuk, kezelésenként két ismétlésben, így a csoportok 26 egyedből álltak. A kísérleti elrendezést az *1. táblázat* szemlélteti.

1. táblázat: **Kísérleti elrendezés**

Csoport jele (1)	**Csoport (2)**	**Kezelés (3)**	**Ketrec (4)**	**Létszám (5)**
PT 2,5%	Paradicsomtörköly 1 (6)	2,5% paradicsomtörköly (6)	1, 7	2x13
PT 5%	Paradicsomtörköly 2 (6)	5% paradicsomtörköly (6)	2, 8	2x13
K 2,5%	Rostkieg. kontroll (7)	2,5% VitaSow®	3, 9	2x13
K 5%	Rostkieg. kontroll (7)	5% VitaSow®	4, 10	2x13
K 2,5% + Kx	Rostkieg. + színező kontroll (8)	2,5% VitaSow® + Kantaxantin	5, 11	2x13
K 5% + Kx	Rostkieg. + színező kontroll (8)	5% VitaSow® + Kantaxantin	6, 12	2x13
	Összesen (9):			**156**

Table 1: Experimental layout
group mark(1), group description(2), treatment(3), cage(4), individual number(5), dry tomato pulp supplement(6), fibre supplement control(7), fibre + coloring agent supplement(8), total number(9)

A kísérleti állatokat a nevelés teljes ideje alatt *ad libitum* takarmányoztuk. Az egyfázisú takarmányozás során gyógyszermentes intenzív nevelő takarmánykeveréket biztosítottunk a brojlercsirkék számára. A szárított paradicsomtörkölyt a két kísérleti csoportban 2,5%, ill. 5% koncentrációban az előbbi takarmánykeverékbe kevertük. A pozitív kontroll csoportokban a paradicsomtörköly nyersrosttartalmát a VitaSow® (Vitafort Zrt., Dabas) rosthordozóval helyettesítettük, a két kísérleti csoporttal azonos (2,5% ill. 5%) koncentrációban.

A kísérletben heti gyakorisággal mértük az állatok testsúlyát és takarmányfogyasztását. A 42. napon laborvágást végeztünk, melynek során a mellizomban mértük a húsminőség egyes fizikai (pH, szín, porhanyósság) paramétereit.

A vizsgálat során kapott adatok alapján, Statistica 4.5 szoftver segítségével számítottuk az egyes paraméterek átlagos értékét és varianciáját, majd az egyes csoportokat egyutas ANOVA (LSD-) teszttel hasonlítottuk össze.

Eredmények és értékelés

A kísérlet közel teljes ideje alatt, a legtöbb heti mérlegelés eredménye szerint, a PT 2,5% csoport egyedeinek testsúly értékei elmaradtak a többi csoportéhoz képest, és e csoport érte el a legkisebb vágósúlyt. Ezzel szemben, a legnagyobb vágósúlyt az 5% paradicsomtörkölyt tartalmazó takarmányt fogyasztó csoport érte el, annak ellenére, hogy az egyes heti mérések során nem mindig e csoport mutatta a legjobb teljesítményt (*2. táblázat*). Bár az is igaz, hogy a takarmányfogyasztás is e csoportban volt a legnagyobb (*1. ábra*).

***1. ábra*: A kísérlet teljes ideje alatt egy egyed által elfogyasztott takarmány mennyisége csoportonként**

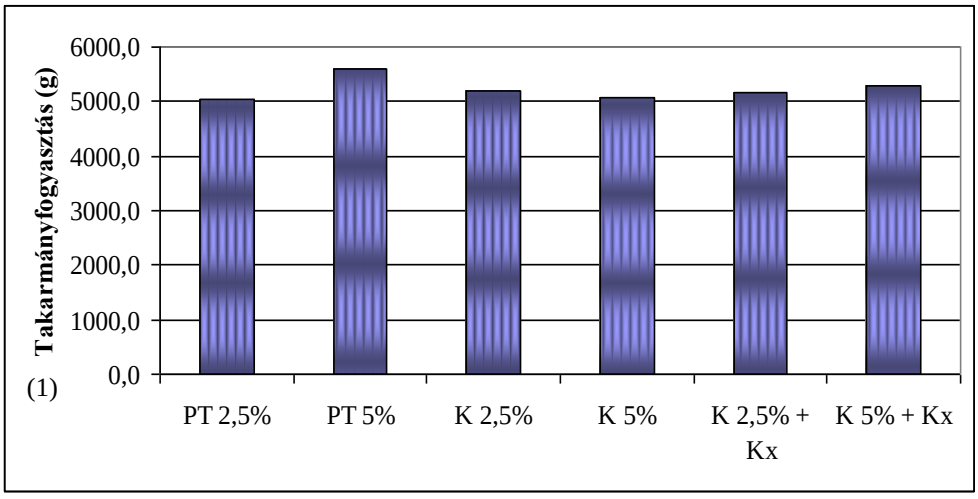


Fig. 1: Individual feed intake by groups during the whole experiment
feed intake, g(1)

***2. táblázat*: Az átlagos élősúly alakulása a nevelés ideje alatt**

Csop.(5)	Átl. élősúly (g/egyed) (1)	1. nap(4)	7. nap(4)	14. nap(4)	21. nap(4)	28. nap(4)	35. nap(4)	42. nap(4)
PT 2,5%	átlag(2)	42,2	137,4	343,0	693,3	1189,6	1845,6	2508,8[a]
	szórás(3)	2,5	22,3	67,6	126,9	198,3	296,5	333,6
PT 5%	átlag(2)	42,2	139,3	361,1	737,4	1272,2	1866,3	2608,5[b]
	szórás(3)	2,5	19,0	71,2	144,8	260,8	268,9	328,3
K 2,5%	átlag(2)	42,2	144,4	361,5	729,2	1228,5	1869,6	2591,6[b]
	szórás(3)	2,5	12,2	35,4	79,9	133,5	193,8	249,4
K 5%	átlag(2)	42,4	143,7	364,1	724,8	1221,1	1815,9	2566,2[b]
	szórás(3)	3,2	15,0	41,1	88,7	152,3	244,8	423,2
K 2,5% + Kx	átlag(2)	43,5	139,6	367,3	726,9	1235,4	1833,8	2565,4[b]
	szórás(3)	3,1	12,2	47,0	67,6	109,2	240,5	312,4
K 5% + Kx	átlag(2)	41,8	143,2	351,6	722,1	1221,4	1866,4	2551,1[ab]
	szórás(3)	3,4	16,6	43,3	86,5	140,1	199,7	221,8

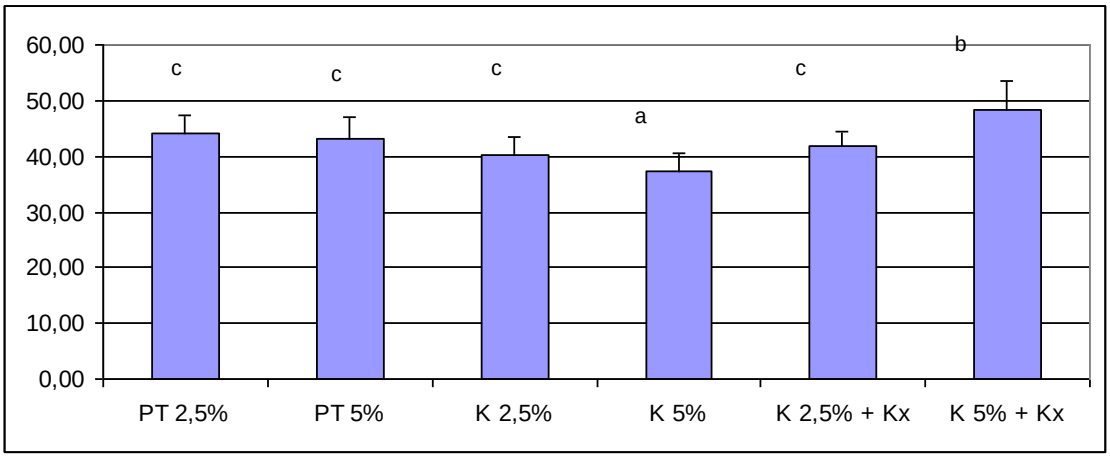
Azonos oszlopban eltérő betűkkel jelölt értékek szignifikáns mértékben eltérnek egymástól P<0,05 szinten. / In the same column values with different letters significantly differ at P<0.05 level.

Table 2: The average live weight during the period of rearing
g/individual(1), mean(2), std. deviation(3), x^{th} day(4), group(5)

A vizsgált húsminőségi paraméterek között a pH minden csoportban hasonlóan alakult. Szignifikáns eltérés csak a PT 2,5% (pH= 6,20) és PT 5% (pH= 6,42) között volt megfigyelhető (P<0,05). Hasonlóképpen statisztikailag igazolt különbséget tapasztaltunk a csepegési veszteségben a két PT csoport között (P<0,05), azonban e paraméter a nagyobb bekeverési arány esetében alakult kedvezőbben, miközben e csoport húsaiban mért nyíróerő számottevően nagyobb volt a PT 2,5% csoport értékeihez viszonyítva.

A hús színének műszeres vizsgálata során a hús világossága (77,07 – 83,24) és vörös szín intenzitása (29,98 – 35,21) minden csoportban hasonlóképpen alakult. Ezzel szemben a sárga szín intenzitásában nagy eltéréseket tapasztaltunk. A K 5% + Kx csoport húsa e paraméter tekintetében kiemelkedő volt feltehetőleg a kantaxantin hatására. Bizonyos mértékben a paradicsomtörköly hatására is nőtt a sárga szín intenzitása. Legkisebb azonban a két kontroll csoportban volt a b* értéke, a dózis függvényében (*2. ábra*).

***2. ábra*: A sárga szín intenzitásának (b*) alakulása az egyes csoportokban**



Az eltérő betűkkel jelölt oszlopok szignifikáns mértékben eltérnek egymástól P<0,05 szinten. / Columns signed with different letters significantly differ at P<0.05 level.

Fig. 2: Intensity of the yellow colour in each group

Következtetések és javaslatok

A paradicsomtörköly etetése kedvezően hatott a súlygyarapodásra. Az 5%-os bekeverési arány esetében az állatok öthetes korra elérték a vágásra alkalmas súlyt, bár e csoport tagjai fogyasztották a legtöbb takarmányt, így a takarmányértékesítés e csoportban alakult a legkedvezőtlenebbül. Ez az eredmény némiképp eltér az irodalomban leírtaktól, ahol a paradicsomtörköly 5, 10, de még 15%-os bekeverése esetén sem tapasztaltak számottevő változásokat a termelési paraméterekben (*El Moghazy és El Mouzhi*, 1982). Hasonlóképpen *Rahmatnejad és mtsai* (2009) is csak 24%-os bekeverési arány esetén találtak negatív hatást a takarmányértékesítésben. Az általuk alkalmazott alacsonyabb bekeverési arányok – 8% és 16% – esetén semmilyen negatív hatást nem tapasztaltak.

A paradicsomtörköly etetése és a húsminőség kapcsolatára vonatkozóan nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Kísérletünkben a hús pH értéke legkedvezőbben a paradicsomtörköly kisebb bekeverési aránya esetén alakult, azonban még itt is meghaladta az optimális 5,7–6,1 közötti értéket (*Fletcher*, 1999). Ilyen körülmények között a hús romlását okozó mikrobák megtelepedése és szaporodása gyorsan megtörténhet, azaz csökken a hús eltarthatósága.

A hússzín tekintetében minden csoportban a normális (48<L*<53) értéket (*Qiao és mtsai,* 2002) jelentősen meghaladó értékeket mértünk, azaz minden csoportban világosabb volt a normálisnál a mell hús. Ez a tapasztalat összhangban van *Nikolakakis és mtsai (*2004) eredményeivel, mely szerint paradicsomtörköly 10%-os bekeverésével javíthatók a színparaméterek. Kísérletünk nem támasztja alá azt az irodalmi adatot, miszerint a pH és a hús világossága között összefüggés mutatkozna, azaz minél alacsonyabbra csökken a pH *post mortem*, annál világosabbá válik a hús (*Fletcher*, 1999). Ugyanakkor a sárga szín intenzitásának növekedése a paradicsomtörköly hatására a kantaxantinhoz hasonló mértékű volt. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy miközben a vörös színű likopin jelentős része eliminálódott a paradicsomtörkölyben, addig az egyéb színanyagok – β-karotin, lutein – feltehetően többé-kevésbé megmaradtak. Ennek alátámasztására azonban további vizsgálatok szükségesek.

A hús sárga színintenzitásának emelkedése a legtöbb faj húsában kedvezőtlen hatású. Ezzel szemben a magyar vásárlók preferálják a csirkehús sárgásságát azzal indokolva, hogy az állat biztos több kukoricát fogyasztott és így egészségesebb.

Gyakorlati szempontból fontos tapasztalat, hogy a paradicsomtörköly bekeverési arányának növelésével a csepegési veszteség jelentős mértékben csökkent. Ez a tulajdonság a vágóhidak szempontjából az egyik legfontosabb tényező.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.2.B-10/1-2010-0011 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen", TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen" és a GOP 1.1.1-09/1 „Innovatív eljárás a paradicsomtörköly karotinoid tartalmának kivonására" c., továbbá a „Kutató Kari Kiválósági Támogatás" c. 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatásával valósult meg.

Irodalomjegyzék

Bárdos L., Kiss Zs., Gregrosits B., Réthy K., Kerti A., Szabó Cs. (2005): Studies on the effects of lycopene in poultry (hen and quail). ISAH. Warsaw. Proceedings, 2. 65-68.

El Moghazy, M.E.A., El Boushy, A.L. (1982): Some neglected poultry feedstuffs from vegetable and fruit wastes. WPSA J., 38. 18-27.

Fletcher, D.L. (1999): Broiler Breast Meat colour Variation, pH and Texture. Poultry Science, 78. 1323-1327.

Kang, D.K., Kim, S.I., Cho, C.H., Yim, Y.H., Kim, H.S. (2003): Use of lycopene, an antioxidant carotenoid, in laying hens for egg yolk pigmentation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 16. 12. 1799-1803.

Nikolakakis, I., Banakis, D., Florou-Paneri, P., Dotas, V., Giannenas, I., Botsoglou, N. (2004): Effect of dried tomato pulp on performance and carcass characteristics of growing quails. Archiv für Geflügelkunde, 68. 1. 34-38.

Persia, M.E., Parsons, C.M., Schang, M., Azcona, J. (2003): Nutritional Evaluation of Dried Tomato Seeds. Poultry Science, 82. 141-146.

Qiao, M., Fletcher, D.L., Smith, D.P., Norhcutt, J.K. (2002): Effects of raw broiler breast meat color variation on marination and cooked meat quality. Poultry Science, 81. 2. 276-278.

Rahmatnejad, M.B., Mirzadeh, KH., Chaji, M., Mohammadabadi, T. (2009): The Effects of Different Levels of Dried Tomato Pomace on Broilers Chicken Hematological Indices. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8. 10. 1989-1992.

Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. (1999): Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. The Plant Journal, 17. 4. 341-351.

Schmidt J. (1990): Takarmányozástan. Budapest, Mezőgazda Kiadó. 220.

A SZARVAMARHA PRION FEHÉRJE SZABÁLYOZÓ SNP VIZSGÁLATA TRANSZGÉNIKUS EGÉR MODELLBEN

Kerekes Andrea[1], Hoffmann Orsolya Ivett[1], Skoda Gabriella[1], Barta Endre[2], Dominique Rocha[3], Véronique Lejard[3], Hiripi László[1], Bősze Zsuzsanna[1]

[1] Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiotechnológiai Intézet
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
[2] Debreceni Egyetem 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.
[3] Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA UMR1313, Franciaország
kerekes@abc.hu

Összefoglalás

Kísérleteink során olyan, a szarvasmarha génjein előforduló, szabályozó egypontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) vizsgálatát végezzük, melyek expressziós különbségeket is hordoznak. Az intézet bioinformatikai csoportja „*in silico*" módszerekkel kiválasztotta azokat a lehetséges SNP markereket, melyek a gének szabályozó régióiban találhatók. Az eredményeket tovább szűkítették azokra a polimorfizmusokra, melyek transzkripciós faktor kötőhelyeken találhatóak. A célunk olyan expressziós különbségek keresése, melyek gazdaságilag fontos tulajdonságot befolyásolnak, végső célunk az általunk jellemzett szabályozó SNP-k alkalmazása a tenyésztésben, így a genom alapú szelekciós eljárás eredményesebb használata a szarvasmarha nemesítés során.

Az első vizsgált polimorfizmus a bovine prion fehérje gén (PRNP, BOS_13027) 5' régiójában található Sp1 kötőhelyben bekövetkezett bázis csere. *Nakamura és mtsai* (2007) „*in vitro"* luciferáz esszé alapján kimutatták, hogy a -6. pozícióban bekövetkező bázis csere (C-ről T-re), csökkenti a szarvasmarha PRNP promóter aktivitását a vad haplotípussal szemben. Azért nagyon fontos ez az eredmény, mert az már bizonyított, hogy a szarvasmarha PRNP gén expressziója kapcsolatba hozható a szarvasmarha szivacsos agyvelő gyulladásának kialakulásával. A prion fehérjét kódoló gén kifejeződésének csökkentésével, alacsonyabb lenne a betegség kialakulásának veszélye is.

Ezt a hatást kívántuk bizonyítani „*in vivo"*, tehát létrehoztunk két olyan transzgénikus egér vonalat, amelyek a szarvasmarha PRNP gén promóterének egy-egy allélváltozatát hordozzák a már leírt rSNP-nek megfelelően. A transzgénként bevitt promóter mögött egy zöld riporter gén (AcGFP) található. Ahhoz, hogy kizárhassuk az integrációs helyből következő különbségeket egy további (piros, DsRed) riporter gén is helyet kapott a konstrukcióban, egy erős virális promóter irányítása alatt.

Az injektálásokat követően 4 C és 3 T rSNP allélt hordozó alapító született. Az egér vonalak létrehozását követően az F1 generációban vizsgáltuk az expressziós különbségeket.

Kulcsszavak: prion, szivacsos agyvelőgyulladás, génexpresszió, polimorfizmus, SNP

In vivo validation of a regulatory SNP in the bovine prion protein gene in transgenic mouse model

Abstract

Regulatory single nucleotide polymorphisms (SNP) of bovine genes, which show allele specific expression levels were examined. Potential regulatory SNPs were selected with "*in silico"* methods focusing on transcriptional binding site consensus sequences. Our aim was to identify and validate rSNP alleles that cause expression differences in genes which influence economically important traits. The ultimate aim is to select a group of regulatory SNP's and use them in genomic selection. One of the first studied polymorphism was found in a Sp1 binding site of the 5' flanking region of the bovine prion protein gene. *Nakamura et al*. (2007) cloned both alleles of this rSNP into a luciferase-expressing plasmid, transfected them into N2a cells, and measured the reporter activities. Their results showed decreased expression level in one of the alleles, as a result of C to T transition at -6 position of the bovine PRNP promoter. There is evidence that the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) is associated with high expression of bovine PRNP gene. We may decrease the risk of BSE by selecting for the rSNP allele which results low activity. Our group intended to find *in vivo* evidence, for the role of this regulatory SNP therefore we created transgenic mouse strains carrying an indicator gene under the two different rSNP alleles of the bovine PRNP gene. The transgene construct harbors the green fluorescent gene (AcGFP) under the two different alleles of the bovine PRNP promoter. To normalize the results we used another reporter gene the DsRed, under a strong viral promoter to exclude the differences in the AcGFP expression levels caused by the integration site. We could establish seven transgenic lines (with 4C and 3T rSNP alleles) and measured the expression levels in the individuals of the F1 generation.

Keywords: prion, Bovine Spongiforme Encephalophatie, gene expression, polymorphism, SNP

Bevezetés

A szarvasmarha (*Bos taurus*) gazdasági jelentőségének köszönhetően, az első állatfajok között van, melynek teljes genomja szekvenálásra került, ezt 2006 augusztusában hozták nyilvánosságra (*Internet 1*). A gének szekvenálása során több mint 3 millió feltételezett egypontos nukleotid mutációt (SNP) találtak és írtak le különböző nyilvános adatbázisokban.

Kísérleteink során olyan szabályozó SNP-k (rSNP) vizsgálatát végeztük, melyek gén kifejeződésbeli különbségeket is hordoznak. Más állatfajokban már néhány kísérletet tettek a szabályozó polimorfizmusok (pl. génexpressziós szabályozást befolyásolók) meghatározására, és ezek gyakorlati alkalmazására a nemesítésben. Azonban a hús- és tejipar számára nagy jelentőségű szarvasmarha fajtákban egyelőre kevés rSNP alapú szelekciós markert találtak. Bár az SNP-k többsége nem génekben található, valamint a kapcsoltsági egyensúly hiánya miatt a gazdaságilag fontos tulajdonságokkal kapcsolatos polimorfizmusok nagy valószínűséggel közvetlenül nem járulnak hozzá ezen tulajdonságok kialakulásához. A célunk olyan expressziós különbségek keresése, melyek gazdaságilag fontos tulajdonságot befolyásolnak, így a tej- és hústermelésben hasznosak, valamint betegségekkel/rezisztenciával kapcsolatosak. Végső célunk az általunk jellemzett szabályozó SNP-k alkalmazása a tenyésztésben, így a genom alapú szelekciós eljárás eredményesebb használata a szarvasmarha nemesítés során.

Irodalmi áttekintés

A legkorábbi genetikai markerek látható jegyek voltak (pl. bőrszín, szarv megléte vagy hiánya), továbbá vércsoportok vagy enzim polimorfizmusok (pl. transzferrin). Ezek a markerek tulajdonképpen gének allélváltozatai és sem számukban, sem polimorfizmus tekintetében nem elégségesek a megfelelő genetikai térképezéshez. A rekombináns DNS technika megjelenésével fedezték fel a DNS polimorfizmusokat, melyek döntő többsége génektől független kromoszóma szakasz. Így fedezték fel a DNS-marker fajták közül a legfontosabbakat a mikroszatelliteket és az SNP-et. Az SNP-k (single nucleotide polymorphism) pont mutációk, melyek az evolúció során allélek formájában rögzültek, és végül fontos részévé váltak a populációk genetikai sokszínűségének (*Heszky és mtsai*, 2005). A gének szabályozó régiójába tartozó rSNP-k közül néhányról már bizonyították, hogy alléljai eltérő módon befolyásolják az adott gén kifejeződését. Ez úgy történhet meg, hogy a nukleotid csere következtében megváltozik a transzkripciós faktor kötőhely konszenzus szekvenciája az egyik allélben, és így a transzkripciós faktor nem fog kapcsolódni vagy a módosult kötőhely egy új faktor megtapadását teszi lehetővé. Ennek eredményeképpen a gazdaságilag fontos tulajdonságok is eltérő módon jelenhetnek meg a különböző rSNP variánsokat hordozó egyedekben (*Geoff és mtsai*, 2010).

Az általunk elsőként vizsgált szarvasmarha prion fehérje gén (PRNP, BOS_13027) szabályozó régiójában több ismert polimorfizmus is van. Német kutatók által a szarvasmarhában jellemzett inszerció/deléció polimorfizmusokról igazolták, hogy befolyásolják a gén expresszióját, valamint a szivacsos agyvelőgyulladásra (BSE, Bovine Spongiforme Encephalophatie) való fogékonysággal is valószínűleg kapcsolatba hozható (*Sander és mtsai*, 2005).

A fertőző agyvelő-degeneráció formájában fellépő szivacsos enkefalopátiák a központi idegrendszer lassan kialakuló degenerációjával járó betegségei, amelyek során az agy- és gerincvelő idegsejtjeiben vakuolumok jelennek meg, az agyvelő állománya szivacsszerűvé válik, az idegsejtek egy része elhal. Az elhalt idegsejtek hiányzó funkciójának megfelelő tünetek alakulnak ki, amelyek a gazdaszervezet pusztulásához vezetnek. Ilyen jellegű betegség kiskérődzőknél a surlókór, a szarvasfélék krónikus lesoványodással járó betegsége (Chronic Wasting Disease), valamint az embereknél elő forduló Creutzfeldt-Jakob betegség (*Prusiner és mtsai*, 1998).

A prion fehérje gént és annak funkcióját számos kutató csoport vizsgálta. *Cheng és mtsai* (2005) bizonyították, hogy a sejtfalon található prion fehérjék hatást gyakorolnak a vérképző őssejtek önmegújuló képességére. A PRNP gén promóterében SNP variációk is ismertek. *Nakamura és mtsai* (2007) kimutatták, hogy a szarvasmarha PRNP gén 5' határoló régiójában egy Sp1 kötőhelyben bekövetkezett báziscsere a -6. pozícióban C → T-re in vitro luciferáz mérés alapján csökkenti a promóter aktivitását, a vad haplotípussal összehasonlítva. Ez azért fontos, mert ismert tény, hogy a BSE iránti fogékonyság egyenes arányban áll a PRNP gén expressziójával.

Anyag és módszer

A kutatás a TET_09_FR_ANR_GEN NKTH-ANR (Franciaország) Pályázat Genomikai alprogram Állati genomika, Genomikai Bioinformatika pályázat keretein belül valósul meg. A projektben olyan SNP-k azonosítását és jellemzését céloztuk meg, amelyek befolyásolják a génexpressziót, és így valószínűleg a fenotípust.

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont bioinformatikai csoportja *„in silico"*

módszerekkel kiválasztotta azokat a lehetséges SNP markereket, melyek a gének szabályozó régióiban találhatóak. Az eredményeket tovább szűkítették azokra a polimorfizmusokra, melyek transzkripciós faktor kötőhelyeken találhatók. Ha transzkripciós kötőhelyet érint az SNP marker, akkor az nagyobb valószínűséggel hordoz funkcionális különbségeket. Az „*in silico*" kiválasztott polimorfizmusok számát Franciaországban a Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA intézetében dolgozó Dominique Rocha csoportja szűkítette tovább, akik hús- és tejhasznosítású szarvasmarha fajtákban vizsgálták, hogy az adott szabályozó SNP valóban megjelenik-e populációs szinten is. Az első polimorfizmus, melynek szabályozó szerepét *„in vivo"* is bizonyítani kívántuk a *Nakamura és mtsai* (2007) által már leírt és *„in vitro"* azonosított rSNP volt. A transzgénikus egér vonalak létrehozása előmag mikroinjektálással történt, a transzgén konstrukciók a PRNP egy-egy allélváltozatát tartalmazták. A promóter mögött egy zöld riporter gén (AcGFP) található, illetve egy további riporter gén (piros, DsRed) is helyet kapott a konstrukcióban egy erős virális promóter irányítása alatt (*1. ábra*). A kettős indikátor génre azért van szükség, hogy kizárhassuk az integrációs helyből fakadó expressziós különbségeket a létrehozott két egér vonalban.

1. ábra: **Prnp gén promóterében levő SNP (C/T) vizsgálatára alkalmas transzgének plazmid térképe**

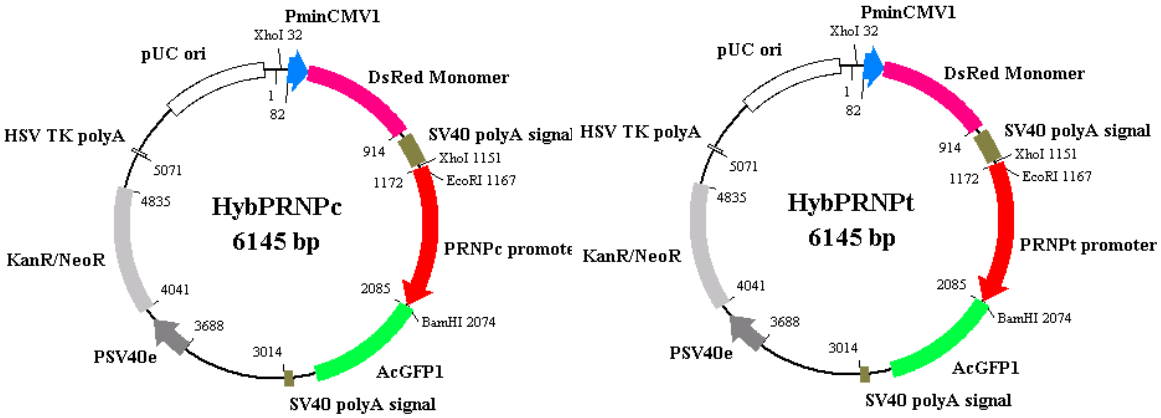


Fig. 1: Plasmid maps harboring the two different variants of the Prnp gene promoter

Az utódok azonosítását PCR módszerrel végeztük, az alapítókból egérvonalakat alakítottunk ki, majd az F1 generációban vizsgáltuk a gén expresszióját az agyban RT-PCR módszerrel, ezt követően kvantitatív real-time PCR-rel.

Eredmények és értékelés

Az injektálások során összesen 4 olyan alapító született, mely a PRNP C allélját hordozta, valamint 3 olyan, melyekben a T allél volt megtalálható. Az *1. táblázatból* jól látszik, hogy az előmag injektált zigóták 39,9%-a született meg, amelyek 4%-a hordozta a transzgént.

1. táblázat: **A Prnp C/T vektorok előmag mikroinjektálásának adatai**

Kimosott embrió (1)	Injektált/beültetett(2)	Megszületett(3)	Transzgénikus(4)
621	436	174 (39,9%)	7 (4%)

Table 1: Pronuclear microinjection data of vectors with PRNP alleles C/T
Flushed embryos(1), injected/transferred(2), born(3), transgenic(4)
4% of the injected embryos gave rise to transgenic founders.

Az alapítókból létrehozott két-két egér vonal (kettő T- kettő C) F1 generációjában vizsgáltuk a gén expresszióját. Az RT-PCR vizsgálatok szerint a PRNP promóter által szabályozott GFP mind a négy egérvonalban megjelent „*in vivo"* az agyban. Így bizonyítást nyert, hogy a promóterek megfelelőképpen működnek. A négy egérvonal két-két egyedének agyából izoláltunk RNS mintákat, majd két technikai ismétlésben Real-time PCR segítségével elvégeztük a kvantitatív expressziós vizsgálatokat. A kísérleti eredményekből látható, hogy kb. 40%-os expressziós szint csökkenést sikerült igazolni a T allél esetében „*in vivo"* körülmények között (*2. ábra*), ami azt jelenti, hogy a prion fehérjét kódoló gén, szabályozó régiójában található C/T reguláló SNP hatására a T allél esetében kisebb mértékű a prion fehérje gén kifejeződése.

2. ábra: **Allélspecifikus expressziószint különbségek**

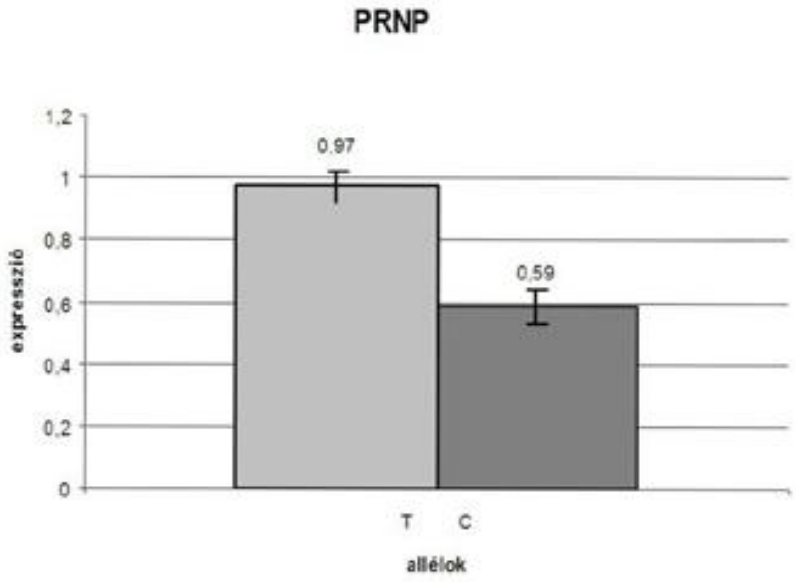


Fig. 2: Allele-specific differences in expression levels

Ez az eredmény azért fontos, mert ismert tény, hogy a BSE iránti fogékonyság egyenes arányban áll a PRNP gén expressziójával. Így, ha csökkentjük az állományokban a prion fehérjét kódoló gén kifejeződését, akkor csökken a betegség kialakulásának veszélye is. Ennek

lehetőségét eddig csak „*in vitro*” sejttenyészeteken történő vizsgálatok igazolták, így elsőként bizonyítottuk, hogy van különbség a két allélt tartalmazó promóter működésében „*in vivo*”.

A fenti vizsgálatot szeretnénk fehérje szinten is igazolni, hogy ezt követően az eredmények hasznosíthatóak legyenek a hazai szarvasmarha-tenyésztésben. A szubsztitúcióra történő tesztelés után szelekciós eljárásokkal ki lehetne válogatni azokat az egyedeket, melyek az SNP T változatát hordozzák, így jelentősen csökkenthető lenne a BSE fertőzés kialakulásának veszélye a szelektált állományokban.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a TET_09_FR_ANR_GEN NKTH-ANR (Franciaország) Pályázat Genomikai alprogram Állati genomika, Genomikai Bioinformatika pályázat keretein belül valósul meg.

Irodalomjegyzék

Cheng, C.Z., Andrew, D.S., Susan, L., Harvey, F.L. (2005): Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. Proc. Natl. Acad. Sci., 103. 7. 2184-2189.

Geoff, M., James, B., Izhak, H., Kowalczyk, A. (2010): is-rSNP: a novel technique for in silico regulatory SNP detection. Bioinformatics, 26. 18. 524-530.

Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform kiadó, Budapest.

Internet 1: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913

Nakamura, I., Xue, G., Sakudo, A., Saeki, K., Matsumoto, Y., Ikuta, K., Onodera, T. (2007): Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Specific Protein 1 Binding Site of the Bovine PRNP Promoter in Japanese Black Cattle: Impairment of Its Promoter Activity Intervirology, 50. 190-196.

Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArrnond, S.J., Cohen, F.E. (1998): Prion protein biology. Cell. 93. 337-348.

Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K., Leeb, T. (2005): Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. J. Biol Chem., 280. 45. 37408-37414.

HÍZÓSERTÉSEK TERMELÉSÉNEK ÉS HÚSMINŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA GYÓGYNÖVÉNNYEL DÚSÍTOTT TAKARMÁNYOK ETETÉSÉNEK HATÁSÁRA

Kerényi Viktória[1], Weber Mária[1], Erdélyi Márta[1], Apáti Nagy Gábor[2], Ábrahám Csaba[3], Szabó Rubina Tünde[1], Mézes Miklós[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.
[2]NITAK Nagyszénási Takarmánykeverő Kft. 5931 Nagyszénás-Lajosszénás
[3] Food Analytica Kft. 5711 Gyula, Dancza u. 13.
viki.kerenyi@gmail.com

Összefoglalás

Munkánk célja az volt, hogy két antioxidáns hatású gyógynövényőrlemény (rozmaring és kakukkfű) hatását vizsgáljuk a termelési eredménnyel és néhány húsminőségi tulajdonsággal kapcsolatban. Emellett célunk volt felmérni a gyógynövényes takarmányok sertések általi elfogadását. Az első kísérlet során mindkét csoport teljes értékű takarmánykeverékében antioxidánssal kiegészített premixet használtunk. A kísérleti csoport takarmányába azonban szárított rozmaringot és kakukkfüvet is kevertek. A második kísérletben a kontroll csoport a kereskedelmi fogalomban kapható takarmányhoz antioxidánssal dúsított premixet kapott, míg a kísérleti csoport premixébe csak a gyógynövények kerültek. Mértük a termelési mutatókat, a karajból (*m. longissimus dorsi*) vett húsminták esetében vizsgáltuk a beltartalmi értékeket és a zsírsav-összetételt, a porhanyósságot, a konyhatechnikai veszteségeket, a pH-t, a színt, a csepegési veszteséget, valamint organoleptikus vizsgálatra is sor került. A kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy az állatok szívesen fogyasztották a gyógynövénnyel dúsított takarmányt, statisztikailag igazolható eltérés azonban nem volt sem a napi takarmányfogyasztás, sem a napi testtömeg-gyarapodás, sem pedig a takarmány-értékesítés tekintetében a két csoport között. A húsminőségi paraméterek tekintetében kimutattuk, hogy nincs szignifikáns különbség a gyógynövényes takarmánnyal etetett sertések húsa és a kontroll csoport húsa között, azonban az organoleptikus vizsgálat a gyógynövénnyel etetett állatok húsát ítélte kedvezőbbnek.
Kulcsszavak: sertés, takarmány, gyógynövény, antioxidáns

Effect of feed enriched by herb on production and meat quality of fattening pigs

Abstract

The aims of our work were to examine the effect of two antioxidants herbs (rosemary and thyme) on production and some meat quality traits as well as to observe if the animals are willing to take the herbs-supplemented feed. The selected fattening pigs were divided into two groups: control and experimental ones. In the first experiment, fattening pigs were fed with complete feed mixture with premix enriched with antioxidants in both groups, however in the experimental group the feed were also mixed with dried rosemary and thyme. In the second experiment, the control group was fed with antioxidant-enriched feed premix, whilst premix of the experimental group contained only 3-3 % of herbs. Production traits were recorded, and in case of meat samples taken from loin, content, fatty acid composition, tenderness, culinary losses, pH, colour, drip loss were analysed, furthermore, organoleptic examination was also carried out. Results showed that fattening pigs were ready for taking the herbs-enriched feed, however, there was no significant difference between the herbs-supplemented and control groups in either daily feed

intake or daily weight gain and feed conversion. The meat of the two groups did not differ significantly in meat quality traits, however, during organoleptic examination meat of animals fed with herbs was regarded as favourable one.
Keywords: pig, feed, herbs, antioxidants

Irodalmi áttekintés

Gazdasági állataink közül a baromfi után a sertés található meg világszerte a legnagyobb számban. A világnépesség növekedése megköveteli a sertésállomány és a sertéshús-kihozatal növelését, mindezt úgy, hogy az kielégítse az egészséges táplálkozás iránti fokozódó igényeket és eleget tegyen az egyre szigorodó élelmiszeripari előírásoknak.

A húsból készült ételek, élelmiszerek már ősidők óta nélkülözhetetlenek az emberek étrendjében – nem véletlenül, hiszen kiapadhatatlan fehérje-, zsír-, vitamin- és ásványianyag-forrás. Az emberi szervezet az élelmiszerfehérjéket aminosavakra bontja, és ebből építi fel saját fehérjéit. A zsíroknak is jelentős biológiai szerepük van: a legnagyobb energiatartalmú tápanyagok (1 g zsír = 37 kJ) a sejtek membránjainak nélkülözhetetlen építőkövei, a zsíroldható vitaminok és aromaanyagok hordozói, a bőr alatti zsírszövet pedig mechanikai védő- és hőszigetelő réteg. A húsok a B-vitamin csoport egyes tagjait (B_1, B_2, niacin, B_6, B_{12}), a belsőségek főleg a zsírban oldódó vitaminokat, az A- és D-vitamint tartalmazzák nagyobb mennyiségben. Az ásványi anyagok közül ki kell emelni a húsok jelentős vas- és cinktartalmát, valamint a nátrium és a kálium megfelelő arányú jelenlétét.

Napjainkban a vágóértéket jellemző mennyiségi kritériumokon túl, egyre inkább előtérbe kerülnek a húsminőséggel szemben támasztott igények. Ennek oka az, hogy a fokozott hústermelésre irányuló hosszú távú szelekció szinte minden gazdasági állatfaj esetében, de különösen a sertés és baromfi fajoknál károsan befolyásolta a hús minőségét (*Szűcs*, 2002). A hús minőségi tulajdonságait (*1. táblázat*), vagyis az érzékszervi, táplálkozás-élettani, higiéniai és technológiai tulajdonságokat, a vágás utáni biokémiai változások határozzák meg.

A rozmaring és a kakukkfű két köztudottan antioxidáns hatású gyógynövény. A *Lamiaceae* családba számos gyógy-, fűszer- és illatszeripari növényfaj tartozik. Illóolajat halmoznak fel, amit a mirigyszőrök fejének sejtjei választanak ki és az őket borító kutikula alá préselik (*Verzárné*, 1982). Az illóolaj-összetétel fajonként és fajon belül is igen változatos. Hatóanyagaik között előfordulnak mono- és szeszkviterpének, monoterpén glikozidok és fenilpropán származékok is. Ezeknek a vegyületeknek jelentős baktericid és fungicid hatása is ismert. A keserűanyagokat többnyire diterpének alkotják. A család tagjaira jellemző a rozmaringsav jelenléte, ami vírus- és depresszió ellenes hatású (*Koczka*, 2008).

A rozmaring szárított levele 1-2,5%, a virágos hajtása 0,5-1,5% illóolajat, 6-8% cserzőanyagot, nikotinsavat és amidját, urzolsavat, glükolsavat. Illóolajának fő komponensei az eukaliptol (cineol), a borneol és észterei. Jellemző anyaga még a rozmaringsav nevű depszid. A depszidek oxisavak észterei, a legismertebb a klorogénsav, amely a kínasav és a kávésav észtere *(Verzárné*, 1982).

***1. táblázat*: A húsminőség kategóriái**

Érzékszervi tulajdonságok (1)	Táplálkozási tulajdonságok (2)	Élelmiszerbiztonsági tulajdonságok (3)	Technológiai tulajdonságok (4)
Szín (5)	Fehérjék (11)	Maradékanyagok (17)	Szín (5)
Szag (6)	Zsírok (12)	Szennyező anyagok (18)	Állomány (23)
Íz (7)	Vitaminok (13)	Adalékanyagok (19)	pH (24)
Márványozottság (8)	Ásványi anyagok (14)	Mikroorganizmusok (20)	Víztartalom (25)
Porhanyósság (9)	Emészthetőség (15)	Vízaktivitás (21)	Vízkötő képesség (26)
Lédússág (10)	Biológiai érték (16)	Toxinok (22)	Fehérjék, zsírok állapota (27)

(*Szűcs*, 2002 nyomán)

Table 1: Categories of meat quality
organoleptic properties(1), nutritional properties(2), food safety properties(3), technological properties(4), colour(5), smell(6), taste(7), marbling(8), tenderness(9), juiciness(10), proteins(11), fats(12), vitamins(13), minerals(14), digestibility(15), biological value(16), residues(17), contaminations(18), aggregates(19), microorganisms(20), water activity(21), toxins(22), texture(23), pH(24), water content(25), water binding capacity(26), status of proteins and fats(27)

A rozmaring jelentős antioxidáns kapacitással rendelkezik, amely a növényben jelenlevő rozmaringsav (koffeoil-α-hidroxil-dihidro-kávésav) tartalommal van összefüggésben (*Lamaison és mtsai,*1990). Emellett egyéb antioxidáns hatású vegyületeket, így karnozin savat, karnozolt, rozmanolt és epirozmanolt is tartalmaz, amelyek szintén rendelkeznek ilyen hatással (*Haraguchi és mtsai,*1995). A jól ismert antioxidánsok közül a rozmaring karotinoid és tokoferol tartalma is jelentős lehet még a szárítás és a feldolgozás után is. Lényeges a rozmaring szempontjából, hogy az abban megtalálható antioxidáns vegyületek jelentősebb hőstabilitással rendelkeznek, mint a BHT (butil-hidroxi-toloul), amely a gyártási folyamatok során jelenthet előnyt (*Munné-Bosch és mtsai,*1999).

A kakukkfű 1-2,5% illóolajat tartalmaz, melynek fő összetevője a timol (20-50%). Ezen kívül karvakrolt, p-cimolt, borneolt, linaloolt, cineolt, valamint különböző savakat és észtereket tartalmaz. A növényben találhatók még cseranyagok, keserűanyagok, szaponinok és gyanta is (*Koczka*, 2008). A timol és analógjai (karvakrol, eugenol, guaiakol, vanillin és zingeron) a monociklikus monoterpének csoportjába tartozó fenolszármazékok. A vanillin és a guaiakol kivételével lipofil tulajdonságúak, vízben alig vagy egyáltalán nem, alkoholban, kloroformban és éterben jól oldódnak (*Szentandrássy*, 2003). A karvakrol lipidoldékony, aszimmetrikus töltéseloszlással rendelkezik. Erős baktericid (*Chang és mtsai,* 2001), fungicid, rovarölő és féregellenes hatása miatt széles körűen alkalmazzák, emellett felhasználható élelmiszerek tartósítására és ízesítésére is.

Anyag és módszer

A vizsgálatok során az Agro Duál Kft. gyomaendrődi sertéstelepén tartott 3 vonalas hibrideket vizsgáltunk, amelyeket magyar nagy fehér x magyar lapály anyai (F1) és Pietrain apai partnerek részvételével állítottak elő.

***2. táblázat*: Kísérleti elrendezés**

	1. kísérlet(1)		**2. kísérlet(2)**	
Időtartam(3)	2012.03.25. – 2012.06.14.		2012.09.06. - 2012.11.12.	
Csoportok(4)	kontroll(8)	kísérleti(9)	kontroll(8)	kísérleti(9)
Állatlétszám (db)(5)	256	248	252	241
Premix(6)	A	A	A	X
Takarmány(7)	-	+	-	+

A: antioxidáns tartalmú premix; X: antioxidáns nélküli premix; -: normál táp; +: kísérleti gyógynövény tartalmú táp
A: premix with antioxidant content; X: premix without antioxidant content; -: normal forage; +: experimental forage with herb
Table 2: Layout of the experiment
first experiment(1), second experiment(2), time period(3), groups(4), number of animals(5), premix(6), feed(7), control group(8), experimental group(9)

Az 1. kísérlet során vegyes ivarban történt az állatok vágása. Csoportonként 15 egyedből (8 koca és 7 ártány) vettünk húsmintát, illetve végeztük el a méréseket. A gyógynövényes takarmány etetése 2012. március 25. – 2012. június 14. között folyt. A 2. kísérlet alkalmával szintén vegyes ivarban kerültek vágásra a sertések. Csoportonként szintén 15-15 egyedet mintáztunk meg és végeztük el rajtuk a

méréseket (kontroll csoport: 9 koca, 6 ártány; kísérleti csoport: 11 koca, 4 ártány). A gyógynövényes takarmány etetése 2012. szeptember 6. – 2012. november 12. között folyt.

Két takarmányozási kísérletet végeztünk. Az 1. vizsgálat során mindkét csoport teljes értékű takarmánykeverékében szintetikus antioxidánssal kiegészített premixet használtunk. A kontroll csoport takarmányozása a kereskedelmi forgalomban kapható teljes értékű keveréktakarmánnyal történt. A kísérleti csoport takarmányába az antioxidánsos premixen felül szárított rozmaringot és kakukkfüvet is kevertek. A 2. kísérlet során a kísérleti takarmányba nem került szintetikus antioxidánssal dúsított premix. Ennek következtében csak a kontroll csoport teljes értékű takarmánykeverékében használtunk antioxidánssal kiegészített premixet, tehát a kontroll csoport takarmányozása ebben a kísérletben is a kereskedelmi forgalomban kapható teljes értékű keveréktakarmánnyal történt. A kísérleti csoport premixébe nem adagoltak antioxidánst, míg a takarmányba szárított rozmaringot és kakukkfüvet kevertek. A kísérleti elrendezést a *2. táblázat* mutatja be.

A takarmányok összetételét tárolási vizsgálati rendszeren belül vizsgáltuk. A 3 hónapos tárolás során Weendei-analízis keretében vizsgáltuk a takarmányok nyers táplálóanyag-tartalmát, hexanal-tartalmát, savszámát és peroxidszámát. A premix esetében A- és E-vitamint, továbbá BHT (butil-hidroxi-toluol) tartalmat mértünk. A karajból (*m. longissimus dorsi*) vett húsminták esetében megvizsgáltuk a beltartalmi értékeket és a zsírsav-összetételt, a porhanyósságot, a konyhatechnikai veszteségeket, a pH-t, a színt, a csepegési veszteséget, valamint organoleptikus vizsgálatra is sor került. Továbbá feldolgozásra kerültek a termelési eredmények is: a testtömeg-gyarapodás, a takarmányfogyasztás és takarmányértékesítés. A vizsgálatok eredményeiből számtani átlagot és szórást számoltunk az egyes mérési paraméterek esetében. A statisztikai kiértékelést R 3.0.1. programban t-próbával végeztük.

Eredmények és értékelés

A kapott beltartalmi adatokat a *3. táblázat* mutatja be. Látható, hogy az 1. kísérlet során az értékek teljesen megegyeznek, míg a 2. kísérlet során a csoportok között nagyobb eltérés volt.
A kapott eredményeinkről elmondhatjuk, hogy a 3 hónapos tárolás során sem változtak meg a minták szárazanyag, nyerszsír és nyersfehérje értékei.

***3. táblázat*: Beltartalomra vonatkozó eredmények**

	1. kísérlet (1)		**2. kísérlet (2)**	
Időtartam (3)	2012.03.25. – 2012.06.14.		2012.09.06. - 2012.11.12.	
Csoportok (4)	kontroll* (5)	kísérleti* (6)	kontroll (5)	kísérleti (6)
Premix	A	A	A	X
A-vitamin (NE/kg)	260948	260948	206618	50281
E-vitamin (mg/kg)	2007	2007	1254	1085
BHT (mg/kg)	33,5	33,5	100	23,6

Table 3: Results of the inner contents
first experiment(1), second experiment(2), time period(3), groups(4), control group(5), experimental group(6)

A sertések napi takarmányfogyasztását, napi testtömeg-gyarapodását, illetve takarmány-értékesítését a *4. táblázat* mutatja be. Az 1. kísérlet során a takarmány-fogyasztást figyelve megállapíthatjuk, hogy alig tért el a kontroll és a kísérleti csoport eredménye – ezt tapasztaltuk a takarmány-értékesítés kapcsán is. A napi testtömeg-gyarapodás esetében viszont a kísérleti csoport alanyai többet gyarapodtak. A 2. kísérlet során is azt tapasztaltuk, hogy a testtömeg-gyarapodásban tért el legnagyobb mértékben a két csoport, míg a másik két paraméterben alig.

A színmérés eredményeit az *5. táblázat* szemlélteti. A hús világosságát (L*) tekintve elmondható, hogy az 1. kísérletből származó és gyógynövényekkel kiegészített takarmányt fogyasztó csoport karaj metszéslapján mért értékei némileg alacsonyabbak voltak, a hús színe tehát sötétebb volt a kontrollnál. A

2. kísérletből származó hízók esetében viszont a gyógynövényekkel kiegészített takarmányt fogyasztó sertések hússzíne volt világosabb. A 2. kísérletből származó állatok esetében a hús világosságát jelző L* értékek között jelentősebb különbség volt megfigyelhető, mint az előzőben, azonban a viszonylag nagy egyedi variancia miatt statisztikailag ezek az eltérések sem voltak szignifikáns mértékűek. Mind az a*, mind a b* esetében eltérést találtuk a kontroll és a gyógynövényes csoport mintái között.

Következtetések és javaslatok

Az állatok nemcsak a fogyasztásban, hanem hatásaiban is igen jól fogadták a gyógynövényes takarmányokat. A gyógynövényes takarmány etetésének megkezdésekor az első két héten nagyfokú takarmányfogyasztás volt megfigyelhető, vélhetően ízlett az állatoknak.

Az 1. kísérletben – szintetikus antioxidáns adagolása mellett – a két gyógynövény hatását vizsgálva bebizonyosodott, hogy – várakozásainkkal ellentétben – az antioxidáns hatású kiegészítők nem nyomták el a gyógynövények hasonló irányú hatását, így azok a takarmányok tárolása során is pozitívan nyilvánultak meg. A 2. kísérletben többlet antioxidáns adagolása nélkül sem maradt alul a gyógynövényes takarmány.

Nagy előrelépésnek tekinthető, hogy természetes takarmány-kiegészítővel legalább ugyanolyan jó – jelen esetben jobb – eredmény érhető el, mint a többletként adagolt mesterséges anyagokkal.

Igen fontos tényező, hogy a gyógynövény-kiegészítés többletköltsége jelen kísérleti takarmányok gyártását tekintve 52 Ft/q volt. Az ezzel a takarmánnyal elért jobb termelési eredmények azonban maradéktalanul ellensúlyozták ezt.

***4. táblázat*: A termelési mutatók alakulása**

	1. kísérlet (1)		2. kísérlet (2)	
Időtartam (3)	2012.03.25. – 2012.06.14.		2012.09.06. - 2012.11.12.	
Takarmány/csoport megnevezése (4)	kontroll (5)	kísérleti (6)	kontroll (5)	kísérleti (6)
Átlagos napi takarmányfogyasztás (kg) (7)	2,58	2,68	2,83	2,78
Átlagos napi testtömeg-gyarapodás (g) (8)	936	1011	865	922
Takarmány-értékesítés (kg/ttm. kg) (9)	2,75	2,6	3,27	3,02
Időtartam (nap) (10)	82		67	

Table 4: Change of some production parameters
first experiment(1), second experiment(2), time period(3), groups(4), control group(5), experimental group(6), average daily feed intake, kg(7), average daily weight gain, g(8), feed conversion, kg/weight kg(9), time period, day(10)

***5. táblázat*: A hússzín mérés eredményei L*a*b* színrendszerben**

Kísérletek	Csoportok		L*	a*	b*
1. kísérlet (1)	**gyógynövényes (2)**	átlag	53,19	19,91	1,38
		szórás	*1,64*	*0,97*	*0,86*
	kontroll (3)	átlag	56,69	18,91	2,11
		szórás	*1,58*	*0,96*	*1,47*
2. kísérlet (2)	**gyógynövényes (2)**	átlag	53,32	20,67	3,13
		szórás	*4,19*	*0,43*	*0,907*
	kontroll (3)	átlag	48,81	19,61	1,43
		szórás	*8,20*	*1,08*	*0,79*

*Table 5: Results of colour measurement of meat in the L*a*b* colour system*
first experiment(1), second experiment(2), herbal group(3), control group(4)

A NITAK Kft. jelenleg a vizsgálatsorozatok eredményei alapján (sertés–pecsenyelúd– tenyészlúd) kialakít egy gyógynövényes termékcsaládot. Terveik szerint árban a „normál" takarmányaikhoz igazítanák, ösztönözve partnereiket a természetes anyagok takarmányozásban történő felhasználására. Ez a hústermék vizsgálataink szerint nem tér el jelentős mértékben a „normál" sertéshústól, kritériumainak maradéktalanul megfelel.

További előnye lehet a gyógynövényes kiegészítéssel előállított sertéshúsnak, hogy a fogyasztóknak fontos piros színe intenzívebb volt, illetve az organoleptikus vizsgálatban részt vevők is pozitívabban nyilatkoztak a „gyógynövényes" húsról.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a NITAK Kft.-nek, különösen Apáti Nagy Gábornak és Tóthné Apáti Nagy Mónikának, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjunk a GOP-1.3.1-10/A-2010-0044 azonosító számú „Növényi eredetű természetes antioxidánsok hatása a keveréktakarmányok oxidációra érzékeny táplálóanyagainak stabilitására, valamint a termék minőségére " című pályázatuk vizsgálataiba.

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat, illetve *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú, *„Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen"* című pályázat is támogatta.

Irodalomjegyzék

Chang, H.M., Tai, T.Y., Huang, C.J. (2001): Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. Journal of Endocrinology, 26. 440-443.

Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A. (1995): Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from Rosmarinus officinalis. Planta Medica, 61. 333-336.

Koczka N. (2008): Gyógy- és aromanövények termesztése. Egyetemi jegyzet. Szent István Egyetem, Gödöllő. 13-21.

Lamaison, J., C. Petitjean-Freytget, A. Carnat (1990): Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivates and antioxidant activity of Apiaceae borraginaceae and Lamiaceae medicinais. Annales Pharmaceutiques Françaises, 48. 103-108.

Munné-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L. (1999): Enhanced formation of a-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. Plant Physiology, 121. 1047-1052.

Szentandrássy N. (2003): Timol hatásának vizsgálata szívizmon és vázizmon. Doktori (PhD) értekezés. Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, ÁOK.

Szűcs E. (szerk.) (2002): Vágóállat- és húsminőség. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest. 123-131.

Verzárné Petrei G. (1982): Farmakognózia. Medicina Könyvkiadó, Budapest. 168-170, 223-224.

EGÉSZSÉGES ÉS SÁNTA TEJELŐ TEHENEK SZÍVRITMUSA ÉS SZÍVRITMUS-VARIANCIÁJA FEJÉS SORÁN

Kézér Fruzsina Luca[1], Tőzsér János[1], Jurkovich Viktor[2], Kovács Levente[1]

[1]Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet, 2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
[2]Szent István Egyetem, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és Állatorvosi Etológiai Tanszék, 1078 Budapest, István u. 2.
kezer.luca@freemail.hu

Összefoglalás

Vizsgálatunkban egészséges (mozgáskép pont: 1–2, n= 28) és sánta (mozgáskép pont: 3–5, n= 24) tejelő holstein-fríz tehenek szívritmusát (heart rate, HR) és szívritmus-variancia (heart rate variability, HRV) paramétereit hasonlítottuk össze hagyományos fejőházi fejés során. A sánta tehenek rövid távú HRV értékei (HR, RMSSD, SD1, SD2/SD1) – az SD2-t leszámítva – nagyobbak voltak a fejés előkészítő szakaszában, mint az egészségesek ugyanezen mutatói (*P*= 0,026; *P*= 0,009; *P*= 0,009; *P*= 0,045, sorrendben). A fejés első percében a HR, az RMSSD és az SD1 paraméterekben adódott hasonló különbség (*P*= 0,016; *P*= 0,042; *P*= 0,039, sorrendben). A fő fejés alatt az SD2/SD1 paramétert leszámítva minden HRV paraméterben (HR, RMSSD, LF, HF, LF/HF, SD1, SD2) érdemi elérést tapasztaltunk (*P*= 0,048; *P*= 0,040; *P*= 0,044; *P*= 0,044; *P*= 0,044; *P*= 0,040; *P*= 0,047, sorrendben). Nem adódott azonban különbség a fejés utolsó percében. A fejés utáni várakozás szakaszában a HR, az RMSSD és az SD1 mutatók nagyobbak voltak a sánta állatoknál egészséges társaikhoz viszonyítva (*P*= 0,039; *P*= 0,039; *P*= 0,039, sorrendben). A két csoport közötti legnagyobb eltérést a fő fejési időszakban tapasztaltuk, ahol egy HRV paramétert leszámítva minden mutató a sánta tehenek nagyobb paraszimpatikus aktivitásáról tanúskodott az egészséges állatokhoz viszonyítva.
Kulcsszavak: sántaság, tejelő tehenek, szívritmus-variancia, fejés

Heart rate and heart rate variability of lame and healthy dairy cows during milking

Abstract

In our study heart rate (HR) and heart rate variability (HRV) of healthy (locomotion score: 1–2, n= 28) and lame (locomotion score: 3–5, n= 24) dairy cows were compared during a conventional milking process. Except of SD2, short-term HRV values (HR, RMSSD, SD1, SD2/SD1) were higher in lame cows during udder preparation than in non-lame ones (*P*= 0.026; *P*= 0.009; *P*= 0.009; *P*= 0.045, respectively). The same pattern was observed in HR, RMSSD and in SD1 during the first minute of milking (*P*= 0.016; *P*= 0.042; *P*= 0.039, respectively). During the stage of main milking – except of SD2/SD1 – all HRV parameters (HR, RMSSD, LF, HF, LF/HF, SD1, SD2) significantly differed between groups (*P*= 0.048; *P*= 0.040; *P*= 0.044; *P*= 0.044; *P*= 0.044; *P*= 0.040; *P*= 0.047, respectively). However, no difference was found between groups regarding the last minute of milking. After milking, before letting out of the milking parlour HR, RMSSD and SD1 were higher in lame cows compared with sound ones (*P*= 0.039; *P*= 0.039; *P*= 0.039, respectively). The greatest difference between the two groups was evaluated during the

main milking stage, where all values except one HRV parameter reflected higher parasympathetic activity of lame cows compared with non-lame ones.
Keywords: lameness, dairy cows, heart rate variability, milking

Bevezetés

A sántaság fertőző betegségek vagy sérülések következtében kialakult mozgásszervi betegség, amely tejelő tehenészetekben a tőgygyulladás és a szaporodásbiológiai zavarok után a harmadik legjelentősebb veszteségforrás (*Jurkovich és mtsai*, 2007). A sánta tehén kevésbé képes a környezethez alkalmazkodni, ugyanis a fájdalom súlyosan korlátozza mozgását, egyéb mozdulatait és aktivitását (*O'Callaghan és mtsai*, 2003). Ezek az állatok kevesebb időt töltenek evéssel, többet fekszenek (*Chapinal és mtsai*, 2009), és hátrébb szorulnak a rangsorban (*Galindo és Broom*, 2002).
A krónikus stressz következtében viselkedésük rendellenessé válik, takarmányfogyasztásuk csökken, egészségi állapotuk és szaporodásbiológiai mutatóik romlanak, csökken a kondíció és a tejtermelés (*Gonzalez és mtsai*, 2008).

Az utóbbi években egyre több tanulmány lát napvilágot Európában és a tengerentúlon is, amelyek a HRV stresszindikátorként való alkalmazhatóságát kutatják tejelő teheneken (pl. *Hopster és mtsai*, 1998; *Mohr és mtsai*, 2002; *Kovács és mtsai*, 2012).

Tejelő szarvasmarhák szívműködését legtöbbször betegségekkel, valamint az egyedek viselkedésével és technológiával szembeni tűrőképességével összefüggésben vizsgálták. Több vizsgálatban is használták a HRV mutatóit a technológia bizonyos fájdalommal, ill. mentális stressz-terheléssel járó elemeinek – szarvtalanítás, ivartalanítás, választás –, borjak vegetatív idegrendszeri működésére kifejtett hatásainak vizsgálatára (*Stewart és mtsai*, 2008; *Stewart és mtsai*, 2010). A fejés alatti HRV-mutatók változását ez idáig csak három szerző közölte (*Hagen és mtsai*, 2005; *Neuffer*, 2006; *Gygax és mtsai*, 2008). Ezekben a vizsgálatokban főként a fejési technológiákat hasonlították össze (különböző típusú robotizált, ill. hagyományos, halszálkás elrendezésű fejőállások), azonban nem találtak köztük állatjólléti szempontból jelentős különbségeket. A fejés folyamatának különböző szakaszait nem különítették el, csak a fejés alatti, illetve a nyugalmi HR- és HRV-értékek közötti változást értékelték.

A krónikus stressz vegetatív idegrendszeri vonatkozásainak vizsgálatára tejelő teheneken eddig kevés törekvés irányult (*Pomfrett és mtsai*, 2004; *Konold és Bone*, 2011). Ezek a vizsgálatok a szivacsos agyvelőgyulladás (bovine spongiform enchepalopathy, BSE) HRV-re kifejtett hatásait értékelték. Nem vizsgálták azonban a produkciós betegségek következményeként krónikus stressznek kitett állatok akut stresszorokra adott és élettani válaszait sem.

Vizsgálataink során igyekeztünk a sánta és egészséges tehenek rövid távú technológiai stresszre (hagyományos fejőházi fejés) adott HRV-ben mérhető vegetatív idegrendszeri válaszait, a fejés különböző fázisaiban összehasonlítani.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat egy nagyüzemi, tejtermelő tehenészetben végeztük holstein-fríz teheneken, 2012. november és december hónapokban.

Az állatokat mozgásképük alapján különböztettük meg 1–5 pontos skálán. A vizsgálatba vont állatokat a fenti pontrendszer alapján két csoportra osztottuk. Az 1-es és 2-es mozgásképű állatokat az egészséges (n= 24), míg a 3-as, 4-es és 5-ös mozgásképű állatokat a sánta (n= 28) kategóriába soroltuk.

Az EKG RR távolságainak rögzítését Polar Equine® (*Polar Electro Oy*, Finnország) RS800 CX műszerekkel végeztük. Az állatokat 8:00 és 9:00 óra között válogattuk ki, és az istállóból inszemináló állásokba tereltük, ahol a jeladót és az elektródahámot saját tervezésű hevederekkel rögzítettük rajtuk. Az egyik elektródát szívtájékon, a másikat a jobb lapocka fölött helyeztük el. A megfelelő vezetőképesség és az elektródák testfelszínhez való tapadása miatt az elektródákat elektróda-géllel kentük be a felhelyezés előtt. A HR-mérő órákat kívülről erősítettük a hevederekhez.

A műszerekhez való hozzászokási időszakot korábbi vizsgálataink és mások (*Mohr és mtsai*, 2002; *Stewart és mtsai*, 2008) ajánlása alapján, 1 órában határoztuk meg. Amikor az összes vizsgálati állat a nyugodt viselkedés jeleit mutatta, a termelőistállókba engedtük őket.

Az adatfelvételt 10:00 és 11:00 között kezdtük meg és az esti fejés utáni 60. percig folytattuk (18:30–20:00 óra), ekkor az állatokról az inszemináló állásokban eltávolítottuk a műszereket.

A fejés különböző szakaszait a HR vevőkészülékekkel szinkronba hozott digitális videokamerák (Canon Legria HF M36) videofelvételei, illetve vizuális megfigyeléseink alapján különítettük el az alábbiak szerint (*1. táblázat*).

1. táblázat: **A fejés során értékelt szakaszok**

Fejés fázisa (1)	Meghatározás (2)
Fejés előkészítés (3)	A fejőállás elfoglalása és a fejőkelyhek felhelyezése között eltelt idő (4)
A fejés 1. perce (5)	A fejőkelyhek felhelyezése után számított 1 perces időtartam (6)
Fő fejési idő (7)	A fejőkelyhek felhelyezése utáni 1. perctől és az utolsó fejőkehely levétele előtti 1. perc között eltelt idő (8)
A fejés utolsó perce (9)	A fejőkelyhek levétele előtti 1 perces időtartam (10)
Várakozás (11)	Az utolsó fejőkehely levétele és a fejőállás elhagyása között eltelt idő (12)

Table 1. The evaluated milking stages

milking stage(1), definition(2), preparation(3), admission time+udder preparation time(4), first minute of milking(5), 1 minute of time interval after the attachment milking clusters(6), main milking(7), time interval between 1st minute after the attachment milking clusters and 1st minute before the removal the last teat cup(8), last minute of milking(9), 1 minute of time interval before the removal milking clusters(10), waiting after milking(11), time interval between the removal of the last teat cup and stepping out of the milking stall(12)

A HR adatok elemzését a Kubios 2.0 HRV szoftverrel végeztük (*Niskanen és mtsai*, 2004). Az elemzéshez már korábbi vizsgálatokban (*Kovács és mtsai*, 2013) is alkalmazott módszereket használtunk (időtartományban való elemzés, Poincaré grafikon). Az elemzés során az alábbi paramétereket határoztuk meg (*2. táblázat*).

2. táblázat: **A vizsgálatban számított HRV paraméterek**

Elemző módszer (1)	**Paraméter (2)**	**Meghatározás (3)**	**Idegrendszeri aktivitás (4)**
Idő-tartományban (5)	HR (min^{-1})	A percenkénti szívverések száma (6)	SNS[1]
	RMSSD (ms)	Az egymást követő RR távolságok különbségének négyzetgyöke (7)	PNS[2]
Poincaré grafikon (8)	SD1 (ms)	Az egymást követő RR távolságok átlóra merőleges szórása (9)	PNS
	SD2 (ms)	Az egymást követő RR távolságok átlóval párhuzamos szórása (10)	SNS
	SD2/SD1	Az SD2 és az SD1 értékek hányadosa (11)	Szimpato-vagális egyensúly (12)

[1]szimpatikus idegrendszer (sympathetic nervous system)
[2]paraszimpatikus idegrendszer (parasympathetic nervous system)

Table 2. HRV parameters calculated in this study
Analysis method(1), parameter(2), definition(3), autonomic nervous system component represented(4), time domain(5), heart beats per minute(6), root mean square of successive interbeat interval (IBI) differences(7), Poincaré plot(8), standard deviation of instantaneous IBI variability measured from axis 1 in the Poincaré(9), Standard deviation of long-term continuous IBI variability measured from axis 2 in the Poincaré plot(10), SD2 divided by SD1(11), symphato-vagal balance(12)

Az állatok lépésszámát (lépés/perc) más szerzőkhöz hasonlóan (*Wenzel és mtsai*, 2003; *Gygax és mtsai*, 2008) határoztuk meg a fejés főbb fázisai során (fejés előkészítés, fő fejési időszak, fejés utáni várakozás a fejőállásban). Azok a lépések nem kerültek feljegyzésre, amelyek a szomszédos fejőállásban fejt tehén általi lökésekből adódtak.

Az adatok statisztikai kiértékelését az SPSS 18.0 programcsomaggal végeztük. A csoportok varianciájának egyezőségét Levene's teszttel vizsgáltuk. Ez alapján a sánta és egészséges állatok szívműködési értékeinek és a fejés folyamatának különböző fázisaiban mutatott viselkedésének összehasonlítását paraméterenként külön-külön Mann-Whitney teszttel végeztük.

Eredmények

A sánta tehenek rövid távú HRV értékei (HR, RMSSD, SD1, SD2/SD1) – az SD2-t leszámítva – nagyobbak voltak a fejés előkészítő szakaszában, mint az egészséges ugyanezen mutatói (*P*= 0,026; *P*= 0,009; *P*= 0,009; *P*= 0,045, sorrendben). A fejés első percében a HR, az RMSSD és az SD1 paraméterekben adódott hasonló különbség (*P*= 0,016; *P*= 0,042; *P*= 0,039, sorrendben). A fő fejés alatt az SD2/SD1 paramétert leszámítva minden HRV paraméterben (HR, RMSSD, LF, HF, LF/HF, SD1, SD2) érdemi elérést tapasztaltunk (*P*= 0,048; *P*= 0,040; *P*= 0,044; *P*= 0,044; *P*= 0,044; *P*= 0,040; *P*= 0,047, sorrendben). Nem adódott azonban különbség a fejés utolsó percében a két csoport szívműködési értékeiben. A fejés utáni várakozás szakaszában a HR, az RMSSD és az SD1 mutatók nagyobbak voltak a sánta állatoknál egészséges társaikhoz viszonyítva (*P*= 0,039; *P*= 0,039; *P*= 0,039, sorrendben).

Megbeszélés

A sánta és egészséges tehenek vegetatív idegrendszeri működésében tapasztalt eltérés a fejés előkészítés, a fejés utáni várakozás, és a fejés első perce során igen kifejezettek voltak a Poincaré paraméterekkel.

A két csoport közötti legnagyobb eltérést a fő fejési időszakban tapasztaltuk, ahol egy HRV paramétert leszámítva minden mutató nagyobb paraszimpatikus idegrendszeri aktivitást reprezentált a sánta teheneknél az egészséges állatokhoz viszonyítva.

Eredményeink magyarázata a sánta teheneket az elővárakozóban ért korábbi nagyobb mértékű stressz lehet. A vizsgálatunkba vont sánta tehenek ugyanis több időt töltöttek az elővárakozóban, mint egészséges társaik (22,3±12,5 vs. 9,2±6,4 perc), amelynek oka, hogy a felhajtás során rosszabb mozgási képességük miatt a sorban hátrébb szorultak. A tovább tartó zsúfolódás után – a fejőházban – a szimpato-paraszimpatikus egyensúly helyreállása során a paraszimpatikus tónus kompenzáló aktivitása jobban érvényesülhetett a sánta teheneknél.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú *Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program* című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A munkánkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás – Research Centre of Excellence – 17586-4/2013/TUDPOL támogatta.

Irodalomjegyzék

Chapinal, N., Passille, de A.M., Weary, D.M., Keyserlingk, von M.A.G., Rushen, J. (2009): Using gait score, walking speed, and lying behavior to detect hoof lesions in dairy cows. Journal of Dairy Science, 92. 4365-4374.

Galindo, F., Broom, D.M. (2002): The effects of lameness on social and individual behavior of dairy cows. Journal of Applied Animal Welfare Science, 5. 193-201.

Gonzalez, L.A., Tolkamp, B.J., Coffey, M.P., Ferret, A., Kyriazakis, I. (2008): Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. Journal of Dairy Science, 91. 1017-1028.

Gygax, L., Neuffer, I., Kaufmann, C., Hauser, R., Wechsler, B. (2008): Restlessness behaviour, heart rate and heart-rate variability of dairy cows milked in two types of automatic milking systems and auto-tandem milking parlours. Applied Animal Behaviour Science, 109. 167-179.

Hagen, K., Langbein, J., Schmied, C., Lexer, D., Waiblinger, S. (2005): Heart rate variability in dairy cows – influences of breed and milking system. Physiology and Behavior, 85. 195-204.

Hopster, H., Joop, T., Werf, van der J.T.N., Blokhuis, H.J. (1998): Side preference of dairy cows in the milking parlour and its effects on behaviour and heart rate during milking. Applied Animal Behaviour Science, 55. 213-229.

Jurkovich V., Olaszy K., Lehoczky J., Könyves L., Tirián A., Brydl E. (2007): Egyes lábvégbetegségek előfordulása tejhasznú tehenészetekben. Magyar Állatorvosok Lapja, 129. 468-473.

Konold, T., Bone, G.E. (2011): Heart rate variability analysis in sheep affected by transmissible spongiform encephalopathies. BMC Research Notes, 4. 539.

Kovács, L., Kézér, L., Tőzsér, J. (2013): Measuring stress level of dairy cows during milking using by geometric indices of heart rate variability. Scientific Papers: Animal Sciences and Biotechnologies, 46. 213-217.

Kovács L., Nagy K., Kira, K., Szenci O., Tőzsér J. (2012): Tejelő tehenek szívritmus-változékonysága a fejés körüli időszakban. Magyar Állatorvosok Lapja, 134. 653-661.

Mohr, E., Langbein, J., Nürnberg, G. (2002): Heart rate variability: A noninvasive approach to measure stress in calves and cows. Physiology and Behavior, 75. 251-259.

Neuffer, I. (2006): Influence of automatic milking systems on behaviour and health of dairy cows. Thesis PhD, University of Hohenheim, Germany.

Niskanen, J.P., Tarvainen, M.P., Ranta-aho, P.O., Karjalainen, P.A. (2004): Software for advanced HRV analysis. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 76. 73-81.

O'Callaghan, K.A., Cripps, P.J., Downham D.Y., Murray, R.D. (2003): Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. Anim. Welf., 12. 605-610.

Pomfrett, C.J.D., Glover, D.G., Bollen, B.G., Pollard, B.J. (2004): Perturbation of heart rate variability in cattle fed BSE-infected material. Veterinary Record, 154. 687-691.

Stewart, M., Stafford, K.J., Dowling, S.K., Schaefer, A.L., Webster, J.R. (2008): Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. Physiology Behavior, 93. 789-797.

Stewart, M., Verkerk, G.A., Stafford, K.J., Schaefer, A.L., Webster, J.R. (2010): Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. Journal of Dairy Science, 93. 3602-3609.

Wenzel, C., Schonreiter-Fischer, S., Unshelm, J. (2003): Studies on step-kick behavior and stress of cows during milking in an automatic milking system. Livestock Production Science, 83. 237-246.

MAGYARORSZÁG ANGOL TELIVÉR MÉNÁLLOMÁNYA 2008-2012-BEN

Kiss Barbara[1], Bélley Márta[2], Pongrácz László[1]

[1]Nyugat-magyarországi Egyetem, MÉK, Állattudományi Intézet, Mosonmagyaróvár, Vár 4.
[2]Magyarországi Galopp Versenyló Tenyésztők Egyesülete, Budapest, Albertirsai út 2-4.
pongracz@mtk.nyme.hu

Összefoglalás

Munkánk célja az volt, hogy a ménállományra fókuszálva olyan szempontok szerint tanulmányozzuk a hazai angol telivér tenyésztés helyzetét, mely a tenyésztők számára kevésbé hozzáférhető információkon alapul. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a tenyésztés problémáit nem lehet kizárólag az állomány kis méretével magyarázni. Az elmúlt öt idényben 105 mén kapott fedeztetési engedélyt. A csekély létszámú kanca (kevesebb mint 500) teljesítménye sok esetben kívánnivalókat hagy maga után, mely megállapítás gyakran vonatkozik a fedezőménekre is. A tenyészállatok ivararánya kedvezőtlen; a kancaállományt a mének fele is képes lenne ellátni, ráadásul az összes kancát nem fedeztetik (230-250/év). Ezenfelül nem egy olyan mén van, mely engedélye ellenére egyáltalán nem fedez. Mindezek alapján kívánatos lenne a ménlétszám karcsúsítása úgy, hogy csak a legjobb teljesítményű, korrekt küllemű, megfelelő vérmérsékletű hazai vagy import mének kapjanak fedeztetési engedélyt. Ezáltal növekedne a mének évenkénti ivadékainak száma, melyeknek versenyben mutatott teljesítménye alapján egyre megbízhatóbb következtetéseket tudnánk levonni az apák örökítő képességéről. A mének származását megvizsgálva megállapítottuk, hogy meglehetősen egyoldalú az állomány. Byerly Turk vérét csak egy inaktív mén képviseli, míg Godolphin Arabian ivadékok a hazai tenyésztésben nem tevékenykednek. Ugyanakkor e két ősménnek az utódai is alapítottak olyan vonalakat, amelyek külföldön a mai napig meghatározóak. Darley Arabian leszármazottai a tenyésztést és versenyzést egyaránt uralják (104 mén). Közöttük a Nearco-Nasrullah, illetve a Nearco-Nearctic-Northern Dancer törzsek ménjei jelentős számbeli fölényben vannak (59 egyed). A többi meghatározó Darley-vonalnak kevés hazai képviselője van, emiatt a ménállomány erősen Nearco-Northern Dancer központú (35 mén).
Kulcsszavak: angol telivér, hazai kanca és mén állomány, lótenyésztés

Thoroughbred stallions in Hungary between 2008 and 2012

Abstract

The aim of our work was to investigate the situation of Hungarian thoroughbred breeding focused on the stallion population, which is based on less accessible information for breeders. According to our observations it can be stated that problems of the thoroughbred breeding cannot be explained only with the small size of population. In the past five mating seasons 105 stallions got permission. In many cases, the performance of not only the small number of mares (<500) but also the stallions is not satisfactory. The gender ratio of pedigree stock is unfavourable; the half of the stallions would be able to serve the mare population, additionally, not all mares are mated. Furthermore, there is more than one stallion having permission not used in matings.

Consequently, reduce of the stallion population would be desirable in such a way that domestic or import stallions having the best performance and good temperament could get mating permission. Hereby, the number of the stallions' progeny per year could increase, and based on their performance shown on the race-track, more and more reliable conclusions could be drawn about the transmitting ability of stallions. As for the pedigree of stallions, it can be shown that the population is rather one-sided. The blood line of Byerly Turk is represented by only one inactive stallion, whereas, the descendants of Godolphin Arabian are missing from the national breeding system. However, offsprings of these stallions have established many breeding lines that also in these days play dominant role at international level. The descendants of Darley Arabian dominate both in breeding and racing (104 stallions). Among them, the stallions of the Nearco-Nasrullah and the Nearco-Nearctic-Northern Dancer lines are superior in numbers (59 individuals). The other Darley-lines are represented only by few stallions, therefore in the national population Narco-Northern Dancer prevails with 35 stallions.
Keywords: Thoroughbred, domestic mare and stallion population, horse breeding

Irodalmi áttekintés

Az angol telivér, kialakulása óta nagy hatást gyakorol a világ lótenyésztésére. Nemcsak a számos országban elterjedt lóversenyzés, hanem a félvér- és sportlótenyésztésben regenerátorként vállalt szerep is okot adott és ad erre napjainkban is. A múltbéli gondos és körültekintő tenyésztői munka és a szisztematikus versenyrendszer eredményeként alakultak ki azok a tulajdonságok, amelyek alkalmassá teszik a fajtát ennek a feladatnak a betöltésére. Az idő folyamán létrejöttek azok a kancacsaládok és ménvonalak, melyek a kimagasló teljesítmény fenntartásában meghatározóak voltak, és amiknek a hatása mindmáig megmutatkozik, valamint az utódokban fellelhető (*Bodó és Hecker,* 1992).

Az angol telivér hazánkban már több mint kétszáz éve jelen van és kifejti hatását lótenyésztésünkre. A jó mének a cél- és köztenyésztés javítását, a fajtákon belüli általános színvonal emelését és a nemesítést szolgálják, versenykarrierjük befejezése után (*Fehér,* 1990).

Ahhoz, hogy a lóállomány megfelelő irányba fejlődjön, pontosan tudnunk kell, hogy mi az, amit el akarunk érni, tehát meg kell tudnunk fogalmazni a tenyészcélt. A pontos megfogalmazás elengedhetetlen, hiszen ennek komoly genetikai és gazdasági megfontolásokat kell tartalmaznia (*Pongrácz*, 2005). Az állattenyésztésben a nemesítés eredménye szempontjából kiemelten nagy jelentőséggel bír a tenyésztési eljárás célszerű megválasztása, a párosítás. *Anker* (1998) szavaival élve, jó párosítást csak tenyészállataink alapos megfigyelése és értékelése, a megfelelő genetikai szemlélet, a tulajdonságok öröklésmeneteinek és azok összefüggéseinek ismerete, és mindezeknek a tenyésztői munkába való bevonása eredményezhet. A párosítás megtervezéséhez tehát elengedhetetlen az egyedek származásának pontos ismerete, tanulmányozása. Ez az angol telivért tenyésztők körében – a küllem és a teljesítmény mellett – a hármas követelmény egyik eleme, mondhatni alapja. Mivel a gyakorlatban a meglévő kancához/kancákhoz választjuk a ményt/méneket, kiemelten fontos az adott időszakban engedélyt kapott fedezőmének származásának vizsgálata, nyomon követése.

Anyag és módszer

Vizsgálataink elvégzéséhez szükségünk volt az elmúlt öt év (2008, 2009, 2010, 2011, 2012) fedezőmén listájára. Mivel ménkatalógus a korábbi években nyomtatott formában nem

került kiadásra, így a ménlistákat a Magyarországi Galopp Versenyló Tenyésztők Egyesületének hivatalos honlapjáról (*Internet1*) töltöttük le. Ezen felül a további vizsgálatokhoz a Magyar Méneskönyv XXIX. (2002-2007) kötetét használtuk fel, amelyet 2009-ben készítettek. Feldolgoztuk a Méneskönyv Vezetőség által készített 2008-as, 2009-es, 2010-es, 2011-es és 2012-es angol telivér kancafedeztetésekről szóló kiadványt. Egyes adatokat felhasználtunk a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal 2007-es Lótenyésztési évkönyvéből (*Internet2*), valamint a Központi Statisztikai Hivatal Statisztikai Tükréből (*Internet3*). Fontos alapot jelentett munkánk során a Pendragon Club által kiadott Telivér című folyóirat, melynek nyomtatott és elektronikus számai sok adatot szolgáltattak a vizsgálatokhoz (*Internet4*, *Internet5*, *Internet6*).

A meglévő adatok, adatbázisok alapján vizsgálataink a következőkre terjedtek ki:

- az elmúlt évek telivér állományváltozásainak vizsgálata, tekintve a mén-, kanca- és csikólétszámokat;
- a csikólétszámok és a kancafedeztetések alapján a mének foglalkoztatottságának vizsgálata;
- a hazai angol telivér fedezőmének ősménekhez való tartozás szerinti csoportosítása, és ezek alapján elemzés készítése a meghatározó ménvonalakról;
- a mének származásának és teljesítményének az elemzése;
- a mének apai származásában szereplő nagy örökítők meghatározása és csoportosítása.

Eredmények és értékelések

Munkánk során öt fedeztetési idényt (2008, 2009, 2010, 2011, 2012) vizsgáltunk. 2008-ban és 2009-ben 55 mén kapott fedeztetési engedélyt a Magyarországi Galopp Versenyló Tenyésztők Egyesületétől, 2010-ben 56, 2011-ben 51, 2012-ben pedig 54 mén került fel a ménlistára. Az átfedésekkel és az eltérésekkel együtt ez összesen 105 mént jelent. A mének között van 16 olyan, amely mind az öt szezonban szerepelt a listán. A négy éven keresztül szerepelt mének létszáma 17, a három idényben engedélyezettekké 14, a két szezonban szereplőké 23, és van 35 olyan mén, amelynek neve az általunk vizsgált öt szezon közül csak egynél volt fellelhető a listán.

A Magyar Méneskönyv Vezetőség által rendelkezésünkre bocsátott évenkénti Angol Telivér Kancafedeztetési és Fedezőmén-használati Statisztikák alapján elmondhatjuk, hogy az alacsony fedeztetési kedvhez viszonyítva túl nagy a ménkínálat. Kiderült ugyanis, hogy 2008-ban összesen 254 kancát fedeztettek és 55 engedélyezett fedezőmén volt, 2009-ben 237 kancafedeztetés volt és szintén 55 mén, 2010-ben 261 kancafedeztetés jutott 56 ménre, 2011-ben 239 fedeztetés volt és 51 fedezőmén, 2012-ben pedig 220 fedeztetés és 54 engedélyezett tenyészmén. A kancafedeztetések száma a 2008. évről a 2009. évre mintegy 10 %-kal visszaesett. A kancafedeztetések számát a 2010. évi nagyobb tenyésztési kedv a 2008. év szintjére visszaállította, azonban a 2011. évben tapasztalt 10 %-os csökkenés 2012. évben folytatódott, további 8 %-os visszaeséssel.

Ha minden mén szerepet kapott volna a tenyésztésben, akkor egy ménre minden egyes évben kevesebb mint 5 kanca (4,7; 4,2; 4,7; 4,7 és 4,1) jutott volna. A ténylegesen fedezett mének száma viszont 2008-ban 44, 2009-ben 37, 2010-ben 39, 2011-ben 43, míg 2012-ben 40 volt, tehát 2008-ban 11, 2009-ben 18, 2010-ben 17, 2011-ben 8, 2012-ben pedig 14 mén egyáltalán nem fedezett, annak ellenére, hogy engedélyezett fedezőmén volt. Véleményünk szerint ez támasztja leginkább alá az előbbi megállapítást.

Ha az elmúlt öt tenyésztési idény kancafedeztetéseinek számát a ténylegesen fedezett ménekre vetítjük, akkor egy ménre átlagosan 5-6 kanca jut (*1. ábra*), ami még mindig alacsonynak mondható, és még mindig fennáll a „túl kevés kancára túl sok mén" állítás.

***1. ábra*: Egy tenyészménre jutó átlagos kancalétszám a 2008-2012. években**

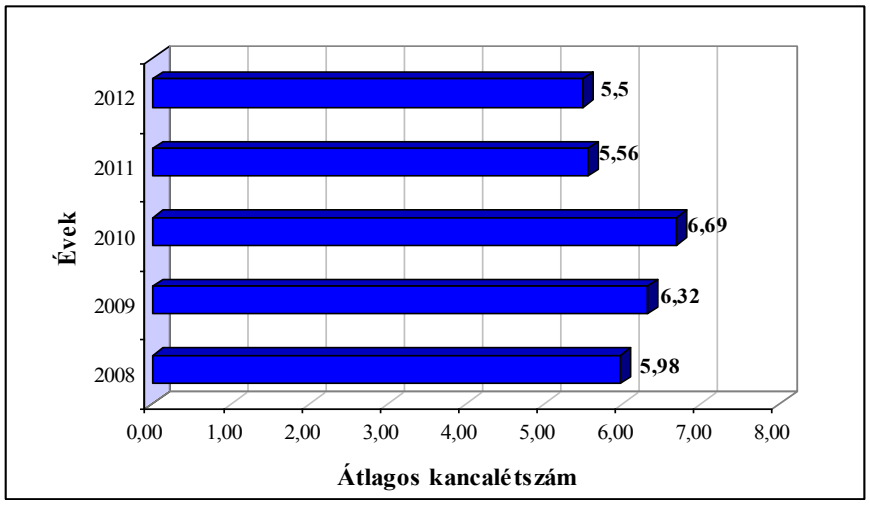


Fig. 1: Average mare number per one stallion between 2008 and 2012

Az engedélyezett és angol telivér kancák fedeztetésére ténylegesen használt angol telivér mének kihasználtságát vizsgáltuk oly módon is, hogy – a Magyar Méneskönyv Vezetőség adatai alapján – 2008-tól kezdve minden évben elkészítettük a fedezőménekre jutó kancafedeztetések megoszlási táblázatát: hány mén fedezett 1-3 kancát, 4-8 kancát, 9-15 kancát, 16-25 kancát és 25-nél több kancát. A *2. ábrán* egymás mellé rendeztük ugyanazon kategória, különböző években keletkezett számadatait. Megállapítható, hogy az évek alatt lényegében azonos ménlétszám mellett, a kancafedeztetések egyre csökkenő létszáma miatt – a 2010. év kivételével – minden évben a mindössze 1-3 kanca fedeztetésére használt mének száma a legmagasabb. Még 2010-ben is a ténylegesen használt méneknek kereken a harmada 3 kancánál többet nem fedezett. A többi évben ez az arány még magasabb: 2008-ban 41 %, 2009-ben 49 %, 2011-ben kiugróan magas, 56 %, és 2012-ben is 53 % volt a maximum 3 kancát fedező méneknek az aránya a ténylegesen tenyésztésbe vont mének között. Azaz a méneknek közel a fele 3 kancánál többet nem fedez évente.

***2. ábra*: Fedezőménekre jutó kancafedeztetések megoszlása 2008-2012-ben**

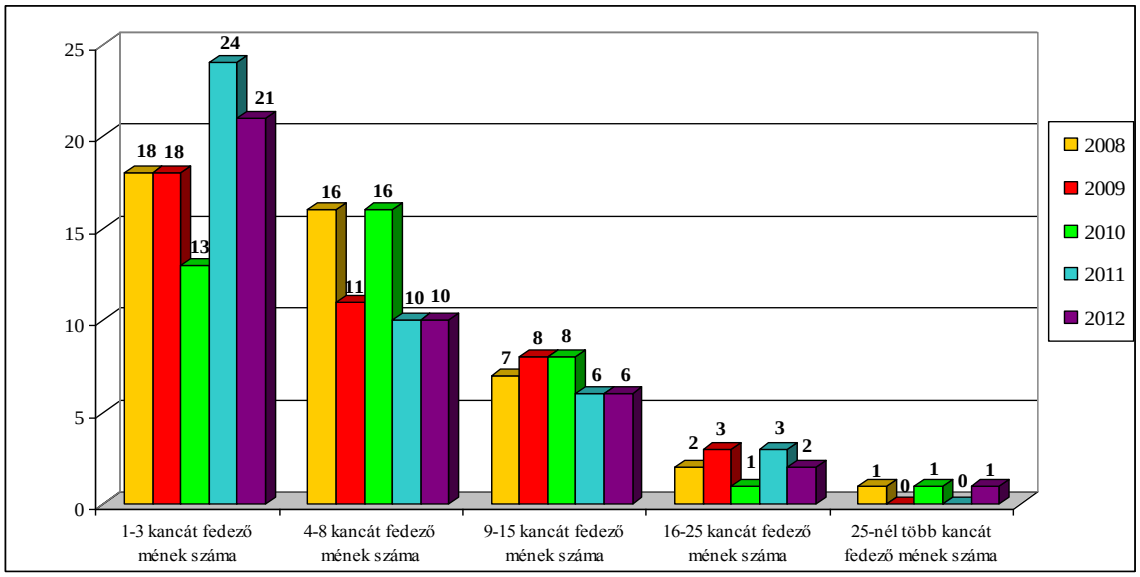


Fig. 2: Distribution of mare mating per stallions between 2008 and 2012

A vizsgált évek közül 2008-ban, 2009-ben, 2011-ben és 2012-ben csak 3 mén volt, ami legalább 15 kancát fedezett (2008: Lidohill, Overseas Transfer, Satin Stone; 2009: Satin Stone, Shaafi, Star Fury; 2011: Atheneum, Saldenzar, The Bogberry; 2012: Out Loud, The Bogberry, Steady As A Rock). 2010-ben pedig csupán 2 ilyen mén volt (Kegyúr, Satin Stone). Ezek közül a mének közül csak Satin Stone (2008, 2010) és Steady As A Rock (2012) fedezett 25 kancánál többet.

Régebben a telivértenyésztők nyilvántartották, hogy lovaik mely ősméntől származnak, illetve melyik kancacsaládba tartoznak. Fontos ez azért is, mert dolgozatunk témaköréhez a mének apai származásában szereplő meghatározó ménvonalak vizsgálata is hozzátartozik. A három híres vonalalapító ősmén: Darley Arabian, Godolphin Arabian, Byerly Turk. A szakemberek megállapították, hogy az utóbbi időben Darley Arabian ága bizonyos mértékben elnyomja a többi ágat, mert ennek leszármazottai adják a legjobb versenyzőket. Hazánkban az öt vizsgált szezonban szereplő 105 tenyészmén közül 104-nek az apai vonala Darley Arabianra vezethető vissza. Csupán egyetlen olyan ménünk van, amely Byerly Turk leszármazottja. A harmadik híres ősménnek apai származást tekintve nincs hazai képviselője. A Darley Arabian leszármazottak Magyarországon mindent uralnak: tenyésztést és versenyzést egyaránt. Közöttük viszont elenyésző számban szerepelnek St. Simon leszármazottai (4 mén), miközben a Nearco-Nasrullah, illetve a Nearco-Nearctic-Northern Dancer törzsekbe tartozó mének igen jelentős számbeli fölényben vannak (összesen 59 mén). A többi, napjainkban meghatározó Darley-vonalnak szintén csekély számú képviselője van Magyarországon, ami arra enged következtetni, hogy a hazai fedezőmén állomány, illetve a tenyésztés erősen Nearco-Northern Dancer központú (35 mén) (*1. kép*). A *Bokor és mtsai* (2010) által végzett populációgenetikai vizsgálatok ennek ellenére nem mutattak érdemi belterjességet a hazai angol telivér állományban.

***1. kép*: Northern Dancer** (Nearctic-Natalma)



Picture 1: Northern Dancer (Nearctic-Natalma)

Következtetések, javaslatok

Az elvégzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a magyarországi angol telivér tenyésztés problémáit nem lehet kizárólag az állomány kis méretével magyarázni. A csekély létszámú hazai kanca teljesítménye sok esetben kívánnivalókat hagy maga után, mely megállapítás sajnos gyakran vonatkozik az engedéllyel rendelkező fedezőménekre is. A tenyészállatok ivararánya kedvezőtlen; a kancaállományt akár a jelenlegi mének fele is képes lenne ellátni. Ráadásul az összes kancát nem is fedeztetik. Mindezt alátámasztja az is, hogy nem egy olyan mén található az országban, mely fedezetési engedélye ellenére egyáltalán nem, vagy csak néhány kancát fedez. A szakmai munka minőségére nézve ez egyáltalán nem kedvező, mert az ivadékvizsgálat, illetve a tenyészértékbecslés ilyen módon gyakorlatilag kivitelezhetetlen. Mindezek alapján kívánatos lenne a mének létszámának karcsúsítása úgy, hogy ténylegesen csak a legjobb teljesítményű, korrekt küllemű, valamint megfelelő vérmérséklettel rendelkező – import vagy éppen hazai tenyésztésű – angol telivér mének kapjanak fedeztetési engedélyt. Ezáltal növekedne a mének évenkénti leszármazottainak száma, melyeknek versenypályán mutatott teljesítménye alapján előbb-utóbb egyre megbízhatóbb következtetéseket tudnánk levonni a mének örökítő képességére nézve.

A mének származását közelebbről is megvizsgálva megállapítást nyert az a feltételezés, hogy meglehetősen egyoldalú az állomány. Byerly Turk vérét és híres tenyészvonalait ma már csak egy – gyakorlatilag inaktív – mén képviseli, míg Godolphin Arabian leszármazottak a hazai tenyésztésben nem tevékenykednek. Ugyanakkor e két ősménnek az utódai is alapítottak olyan vonalakat, amelyek külföldön mind a mai napig meghatározóak a fajtában. Véleményem szerint a hazai tenyésztők számára – a fent említett létszámcsökkentéssel párhuzamosan – megfontolandó lenne olyan, már bizonyított fedezőmén(ek) beállítása, amely(ek) vagy Byerly Turk, illetve Godolphin Arabian vonalába tartoznak, vagy a nálunk kevésbé reprezentált Darley Arabian törzseket képviselik.

Úgy véljük, hogy az angol telivér jelentősége a világ lótenyésztését – és az egyre inkább kiépülő telivéripart – illetően a jövőben nem fog csökkenni, sőt inkább növekedni fog. Éppen ezért fontos lenne hazánk telivértenyésztését egykori meghatározó szerepébe visszaemelni. Természetesen ehhez nemcsak az állományunk minőségén kellene javítanunk, hanem a verseny- és fogadási rendszert is meg kellene reformálni. Tenyésztés nélkül nincs versenyzés (vagy csak ideig-óráig), és versenyzés nélkül a tenyésztésnek sincsen létjogosultsága. A kettő minden esetben feltételezi egymást.

Irodalomjegyzék

Anker A. (1998): A genetika lóvátétele. A Telivér brossura különszáma, Pendragon Pedigree Service és Club, Budapest.

Bodó I., Hecker W. (1992): Lótenyésztők kézikönyve. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Bokor Á., Jónás D., Pongrácz L., Bokor J., Szabari M. (2010): Populáció-genetikai vizsgálatok a magyarországi angol telivér állományban. Állattenyésztés és Takarmányozás, 59. 4. 311-332.

Fehér D. (1990): Az angol telivér Magyarországon. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

Internet1: www.angolteliver.extra.hu

Internet2: www.mgszh.gov.hu

Internet3: www.ksh.hu

Internet4: www.angolteliver.hu

Internet5: www.infosztrada.hu

Internet6: www.pedigreequery.com

Pongrácz L. (2005): A ló tenyésztése és genetikája. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest.

NYÍLMÉREGBÉKÁK TERRÁRIUMI TARTÁSÁVAL KAPCSOLATOS TAPASZTALATOK

Kiss István

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Állattani és Állatökológiai Tanszék
2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.
Kiss.Istvan@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A nyílméregbékafélék családjába (*Dendrobatidae*) tartozó neotrópikus, esőerdei fajok általában élénk színezetűek. Nevüket a bőrük erős méreganyagáról kapták, amelyet ragadozóik ellen alkalmaznak. Terráriumi tartásuk több évtizedes múltra tekint vissza, az utóbbi időben különösen kedveltek lettek a hobbiállattartók körében. Terráriumi tartásuk és tenyésztésük eredményessége alapvetően azon múlik, hogyan sikerül biztosítani a megfelelő táplálékot, a természetes élőhelyi feltételeket (hőmérséklet, páratartalom, fényviszonyok és mindezek napszakos és évszakos változását). Fontos a terrárium megfelelő alapterülete és magassága, a dús növényzet kialakítása. A magas páratartalom mellett a folyamatos szellőzés lehetőségét is biztosítani kell. Táplálásukra elsősorban ecetmuslica, fiatal tücsök, ugróvillás alkalmas, de a vitamin és ásványi anyag utánpótlásról gondosodni kell. A fajok többségénél a szülői gondoskodásnak igen kifinomult formáival találkozhatunk. Egyesek a hátukon viszik a lárvákat a közeli víztérbe, mások gondoskodnak a fejlődő ebihalak táplálásáról is.
Kulcsszavak: Dendrobatidae, méreg, utódgondozás, terrárium, tartás, táplálás, tenyésztés

Experiences of keeping poison arrow frogs in captive husbandry

Abstract

Poison arrow frogs (*Dendrobatidae*) occur in the neotropical rainforest region of the world. All species are small, usually bright coloured. The name comes from the fact that they produce toxic skin alkaloids. Frogs use these toxins for defense against predators. In recent years the demand for poison frogs has greatly increased. The success of their keeping and breeding depends on the circumstances provided in terrarium (temperature, air humidity, light and their daily and seasonal change). The size of terrarium depends on the species and the number of frogs. Terrarium must be decorated in order to resemble the environment of a natural biotope as closely as possible. Frogs need high humidity with ventilation of air. The principal feed animals for poison frogs are springtails, fruit flies, tiny crickets supplied with vitamins and minerals. The majority of the species shows special parental care by males or females (depending on the species) transporting their tadpoles on the back. Furthermore, females of other species depose unfertilized eggs for her young.
Keywords: Dendrobatidae, toxin, parental care, terrarium, keeping, feeding, breeding

Témafelvetés

Kevés olyan állatcsoport van, amely iránt az elmúlt évtizedekben ilyen felfokozott érdeklődés nyilvánul meg a szakemberek, az orvosok és a hobbiállattartók körében, mint amilyet a nyílméregbékák iránt tapasztalhatunk. A herpetológusokat elsősorban a taxon evolúciós kapcsolatainak, a faj és a változatok szintjén jelentkező morfológiai, színezetbeli változatosság ok-okozati összefüggéseinek feltárása, különleges és komplex viselkedésük, szaporodásbiológiájuk megismerése, az élőhelyek eltűnésének és átalakulásának, valamint a fellépő új megbetegedések már mérhető és várható következményeinek kimutatása érdekli. A kutatóorvosokat a nyílméregbékák által előállított változatos összetételű toxinok („ugráló méregzsákok") embergyógyászatban való felhasználási lehetősége foglalkoztatja. A hobbi állattartók, terraristák elsősorban látványos színezetük („esőerdők ékszerei") és gyakran meglepő viselkedésük, szaporodásuk miatt érdeklődnek e fajok iránt. A tartásukhoz szükséges technikai felszerelések ma már bárki számára hozzáférhetőek, a kínálat igen széles körű. A korábbi bevéződött nézetek, miszerint e fajokat igen nehéz tartani és szaporítani, mára már megdőltek. A nyílméregbékák tartásának hazánkban több évtizedes múltja van (*Zsilinszky,* 1999; *Kovalcsik,* 2001a,b, 2002a,b,c).

Irodalmi áttekintés

A *Dendrobatidae* családba a legújabb taxonómiai revíziók alapján 172 faj sorolható 13 genuszba (*Grant és mtsai,* 2006, *Internet 1*, *Internet 2*). A folyamatosan bővülő információk alapján a nyílméregbékák rendszerezését és a fajok számát nem tekinthetjük véglegesnek.

A nyílméregbékák igen változatos élőhelyeken fordulnak elő a közép- és dél-amerikai előfordulási területein belül. Vannak kifejezetten síkvidéki, hegylábi, hegyi, köderdei fajok. A hőmérséklet és páratartalom jelentős eltéréseket mutat a területek között, így a terráriumi tartásnál, az egyes fajok igényeinek alaposan utána kell nézni az optimális feltételek biztosítása érdekében. A fajok döntő többsége nappal aktív, de előfordulnak kifejezetten éjszakaiak is, és vannak alkalmanként éjjel aktívak

A nyílméregbékák legtöbb fajának szembetűnő tulajdonsága a változatos és élénk színezet. Ez a figyelmeztető, aposzematikus jelzés nem rejtőszín, hanem felhívja a potenciális ragadozó figyelmét mérgező voltára (*Vences és mtsai,* 2003). A fajok jelentős részénél az elterjedési területen belül több színváltozat figyelhető meg. A változatok száma a *Dendrobates tinctorius* fajnál több mint 30, a *Dendrobates auratus* esetében mintegy 15, az *Oophaga pumilio* fajnál pedig több mint 100. A nyílméregbékák valamennyi faja mérgező váladékot termel, azonban nagy különbség van a méreg erőssége között. Mindössze néhány faj mérge halálos az emberre nézve, ha az a véráramba kerül. A több száz eddig elkülönített toxin közül legismertebbek a batrachotoxinok, pumiliotoxinok, histronicotoxinok és a gephrytoxinok. Ezek közül is leginkább mérgezőek a batrachotoxinok és a pumiliotoxinok. A batrachotoxinokat a *Phyllobates* fajok állítják elő, közülük is legerősebbet a *Phyllobates terribilis* faj.

A család tagjai kistestűek, többnyire 15-60 mm között mozog a testhosszúságuk. A nőstények általában valamivel nagyobbak. Hátsó végtagjuk viszonylag rövid, de jól ugrálnak és kiválóan másznak. Ujjaik vége ellaposodó, kiszélesedő, a megkapaszkodást, tapadást segítik. A lábujjak között az úszóhártya számos genuszban teljesen hiányzik (*Lötters és mtsai,* 2007). A hímeknek egy toroktájéki hanghólyagjuk van.

A kétéltűek körében a szaporodási és utódnevelési stratégiáknak számos formája ismert (*Beck, 1998*), de talán a nyílméregbékák családja mutatja a legkülönlegesebb megoldásokat

(*Summers és mtsai,* 1997, 1999). Az amplexus, ha egyáltalán előfordul, fejtájéki. Mivel nem vízbe helyezik a petéket, nem szükséges az ivartermékek leadásának szinkronizálása (*Lötters és mtsai, 2007*). A hím által kiválasztott védett helyre (avarrétegbe, üregekbe, levelekre) lerakott spermaadagra a nőstény ráhelyezi a petéket. A peték száma viszonylag alacsony, egyes fajok mindössze 2-5, mások esetleg 25-30 darabot is rakhatnak. A hímek a lárvák kikeléséig őrzik a petéket, nedvesítik azokat (*Summers, 1992, Summers és mtsai,* 1999). Számos fajnál mindkét szülő részt vesz ebben a munkában (*Zimmermann és Zimmermann,* 1984*; Summers és mtsai,* 1999). A kikelt lárvákat *Dendrobates* fajoknál többnyire a hímek viszik a hátukon a legközelebbi víztérbe, de az *Oophaga* genuszban ezt a nőstények végzik (*Young,* 1979; *Weygoldt,* 1980). A fajok többségénél az utódgondozás többnyire itt véget is ér, de az *Oophaga* fajoknál további feladatok várnak a nőstényre (*Burst,* 1993*, Weygoldt,* 1980). Miután minden ebihalát külön-külön kis vízterekbe (faodvakban, bromélia tölcsérekben összegyűlt víz) vitte, néhány naponként valamennyi utódát felkeresi és a vízbe petéket rak le, amit az ebihalak elfogyasztanak.

Tapasztalatok és javaslatok a terráriumi tartás és tenyésztés terén

A terrárium kialakítása

Egy jól berendezett terrárium, amely a békák számára megfelelő élőhelyet biztosít, kihívást jelent a létrehozójának, hiszen számos környezeti feltétel összhangját kell kialakítani. A témakörben megjelent könyvek (*Wright és Whitaker,* 2001; *Sihler és Sihler*, 2007; *Schmidt és Henkel*, 2008; *Haselhaus,* 1988, 1992; *Keller és Scheider*, 2005; *Lötters és mtsai,* 2007) és az interneten elérhető rajzok és fotók segítségével jól illusztrált leírások (*Internet 3-8*) közül lehet választani. A nyílméregbékák természetes élőhelyükön viszonylag kis területen, fajtól függően néhány m^2, vagy 10 m^2-en élik le életüket. Ez a tény nagymértékben megkönnyíti terráriumi tartásukat, hiszen az állatlétszám helyes megválasztásával viszonylag kisméretű helyen is tarthatók. Tapasztalatok alapján az ajánlható méret kistestű fajból 5-6 egyed számára: 60×40×50 cm, közepes testű fajból 5-6 egyed számára: 70×50×60 cm, nagytestű fajból 5-6 egyed számára: 80×55×70 cm. Ma már készítenek kifejezetten nyílméregbékák részére kialakított terráriumokat. Esztétikailag és kezelhetőség szempontjából is ajánlott a tolóüveges ajtó kiképzés, a lehajtható vagy más módon nyithatókkal szemben. A nyílméregbékák számára nem szükséges nagy vízfelület kialakítása, elegendő egy vízzel töltött, könnyen tisztítható kisebb tálka, vagy egy kisebb medence vízesés, csobogó kialakításával, amely a nagyobb terráriumokban esztétikai és páraemelő funkciója miatt ajánlott. A terrárium hátsó és két oldalsó felületét alkalmassá lehet tenni arra, hogy azon növényeket telepíthessünk meg, vagy az a békák számára alkalmas tartózkodási- és mászóhely legyen. Ez lehet műsziklás kivitel, vagy préselt parafa borítás. Ültessünk rá minél több növényt, ami természetes járófelületet képez. A terrárium belső terét tagoljuk ágakkal, amire növények is ültethetők. A terrárium aljára olyan közeget kell helyezni, ami tartja a nedvességet, de nem rothad, nem penészedik. Legáltalánosabb megoldás, hogy a kertészeti célokra gyártott égetett agyaggolyókból kb. 4-5 cm vastag réteget helyezünk el, aminek felszínére leveleket, vagy tőzeg, kókuszrost, fenyőkéreg, esetleg mohatakarást rakunk. Természetesen minden, a terráriumba kerülő anyagot (kókuszrost, tőzeg, kéreg, kövek, faágak) fertőtleníteni kell, amire alkalmas lehet egy konyhai használatból már kivont mikrohullámú sütő is. Amennyiben az elhelyezésre szolgáló helyiség hőmérséklete szükségessé teszi, gondoskodni kell a terrárium fűtéséről. Erre is több lehetőség adódhat, így például a víztérbe elhelyezett akváriumi fűtőtest, vagy a közegbe elrejtett szigetelt fűtőkábel, amit hüllők terráriumában szoktak alkalmazni. A nyílméregbékák hőmérsékletigénye fajonként eltéréseket mutathat, ezért

igyekezzünk olyanokat tartani, amelyek elvárásait könnyebben tudjuk teljesíteni. A legtöbb, gyakrabban tartott faj számára a hőmérséklet napközben legyen kb. 25-26°C, éjszaka 2-3 fokkal alacsonyabb. 30°C körül vagy afelett a legtöbb béka már nem érzi jól magát − a tartósan magas hőmérséklet komoly problémákat okozhat, ha nem tudnak elhúzódni hűvösebb helyekre. A nyílméregbékák többsége nem igényli az erős megvilágítást, hiszen természetes élőhelyükön a növényzet takarásában, félárnyékos helyeken fordulnak elő. A terráriumban olyan erősségű világítást alkalmazzunk, ami kiemeli a békák színét, és elegendő a beültetett növények fejlődéséhez. Általánosan használt a fénycsöves megvilágítás, de az utóbbi időben az energiatakarékos LED világítás is terjed. A terrárium méretéhez igazodóan, felül helyezzük el a neoncsöveket (egy kb. 60×40×50 cm-es terrárium esetében 2 db 18 W-os fénycső ajánlott). A terráriumot érdemes élő növényekkel dúsan betelepíteni, ügyelve arra, hogy elöl, középen hagyjunk szabad teret, ahol etetni lehet és ahol jól láthatóan mozoghatnak. A növények ültethetők közvetlenül a terrárium alját fedő közegbe, esetleg külön cserépbe, amelyet elrejtünk, vagy a medence oldalfalaira, az ágakra. Olyan növényfajokat válasszunk, amelyek jól tűrik a félárnyékot, ehhez ajánlható csoportok: bromeliák, páfrányok, az orchideák, valamint számos szobai dísznövény (*Ficus, Scindapsus, Syngonium, Philodendron, Calathea, Anthurium, Ctenanthe, Marantha, Tradescantia, Zebrina* spp.). A terrárium technikai felszereléseinek új generációs tagjai a párásítók, ködösítők, amelyek egy tartályból meghatározott időnként és időtartamba porlasztják a vizet a terráriumba.

A faj kiválasztása

A nyílméregbékák tartására vállalkozni komoly felelősséggel jár, hiszen ezek a fajok többnyire hosszú életűek, elérhetik akár a 10-15 éves kort, vagy még hosszabbat is. El kell dönteni, hogy mi a cél: több faj együttes tartása tenyésztés nélkül vagy egy-egy faj kisebb csoportjának tartása a szaporodás lehetőségével. A legtöbb faj nem agresszív, néhány példánya gond nélkül tartható együtt, ha a terrárium megfelelő méretű és elegendő búvóhely áll rendelkezésre. Csak megbízható személytől, kereskedőtől szerezzük be a kiválasztott faj egyedeit. Előzetesen érdemes mások tapasztalatairól tájékozódni. Lehetőség van hazai és külföldi terrarisztikai börzéken is a kívánt fajok beszerzésére (*Internet 8*).

Rendszeres gondozás

A nyílméregbékák ugróvillásokat, atkákat, hangyákat, termeszeket és minden kistestű rovart elfogyasztanak. Terráriumi tartásuk során a leginkább megfelelő táplálékot jelentik a különböző testméretű muslica fajok (*Drosophyla* spp.), ugróvillások (Collembola), valamint frissen kelt, „napos” tücskök (*Gryllodes sigillatus, Acheta domesticus*). Etetéskor rendszeres időközönként (néhány naponta) szórjuk be vitamin és ásványi anyag kiegészítők porával a muslicákat vagy a tücsköket. Erre igen sok kész készítmény alkalmas, amit a kereskedelemben beszerezhetünk. A nyílméregbékák tartása során rendszeres, napi, heti ellenőrzések, gondozási feladatok lépnek fel, amelyek elmulasztása az aprónak tűnő hiba esetén is drámai következményekkel járhat. A terrárium lakóit minden nap ellenőrizzük, nincs-e bármi probléma. A már külön tárgyalt etetésen túl, naponta legalább egy alkalommal végezzünk párásítást (a relatív páratartalom legyen min. 70-80%). Ez legegyszerűbb esetben kézi permetezővel történhet, de ha kiépítettünk egy automatikus párásító, ködösítő rendszert, akkor az naponta többször is ellátja a feladatot. A terráriumban elhelyezett vizes tálban legalább 2-3 naponta cseréljük a vizet (ioncserélt vagy esővíz), mert a békák előszeretettel ülnek bele, gyakran bele is piszkítanak. Ha

olyan elhatározásra jutnánk, hogy pár napra, vagy hétre magukra hagynánk békáinkat, akkor azt csak úgy tegyük, ha szakértő kezekbe adjuk őket. Olyan személyt kell segítségül hívni, aki megfelelő felkészültséggel bír, ilyen állatokat tart és ismeri az adott körülményeket.

Egészségvédelem

A nyílméregbéka tartása egészségügyi szempontból gondos figyelmet kíván. Számos olyan bakteriális, gomba- és féregfertőzés leselkedik békáinkra, amelyek ellen a küzdelem néha kétes kimenetelű – elsősorban az ismeretek hiánya miatt. Igen jó összefoglalást ad *Wright és Whitaker* (2001) munkája a lehetséges betegségekről és azok gyógyításáról. A tapasztalatok szerint a begyűjtött, vagy eredeti élőhelyén tenyésztett példányok gyakran hordoznak betegségeket, amelyeket nem ismerünk, és csak akkor látszik a baj, amikor már késő a védekezés. A tenyésztett állományokban sem lehetünk biztosak. Általánosságban elmondható, hogy legjobb védekezés a megelőzés. Ügyelni kell az általános higiénére, minden eszközt, a vizes tálakat, befogásra használt edényeket rendszeresen fertőtleníteni kell. Az újonnan beszerzett állatokat feltétlenül karanténba kell helyezni, legalább 6-8 hétre, amíg az esetleges betegségek tünetei jelentkeznek. Békáink jó egészségi állapotának fenntartása alapvetően attól függ, hogy megfelelően biztosítjuk-e az abiotikus (hőmérséklet-, fény-, és nedvességviszonyok) és biotikus tényezőket (pl. telepítési sűrűség, ivararány). Tartási hibákra és fertőzésre gyanakodhatunk, ha békáinkon a következő tüneteket észleljük: a korábbi időszakhoz képest nem vagy csak keveset mozognak, mozgásuk koordinálatlanná válik, lábaikkal gyakran próbálják tisztítani testfelszínüket, etetéskor nem jönnek a megszokott helyre, keveset esznek, esetleg azt is kiköpik, lesoványodnak, letargikusak lesznek, bőrük száraznak látszik, bőrükön elszíneződött foltok, duzzanatok jelennek meg, nyílt sebek képződnek, szájukon vagy a kloákán át a bélcső közeli szakasza kitüremkedik, a csapatból egy-egy példány hirtelen, minden előzetes tünet nélkül elpusztul (*Lötters és mtsai,* 2007). Az utóbbi évtizedben a kétéltűek természetes élőhelyein terjedt el a kitridiómikózis, amelyet egy rajzóspórás gomba, a *Batrachochytrium dendrobatidis* okoz. A kétéltűek bőrének szarusodó sejtjeiben, szaruképletein élnek, felborítják a szervezet ionháztartását, ami súlyos esetben szívleállásban nyilvánul meg.

Tenyésztés

Az adott faj szaporodási sajátosságainak megfelelően kell a terrárium tenyésztésre alkalmas méretét megállapítani. Ez attól is függ, hogy párban vagy kisebb csapatban lehet-e őket tartani. Van, aki kizárólag párban tartja, mások sikeresen szaporítják ugyanazon fajt 5-6 fős vagy akár nagyobb létszámú csoportban is. A nyílméregbékák ivarának megállapítása nem mindig egyszerű, mert a másodlagos ivari jellegek nem vagy csak kevéssé felismerhetők. Peterakásra többnyire a terráriumban található búvóhelyeket (nagyobb levelek, bromeliák levéltöve, félbevágott kókuszdió) használják. A petéket egy olyan edénybe kell helyezni, ahol legfeljebb állnak a vízben, de nem lepi el azokat. A víz meglétét rendszeresen ellenőrizni kell, nehogy kiszáradjanak a peték. A terméketlen petéket el kell távolítani, mert esetleges penészedésük könnyen átterjed a fejlődőkre is. Az embrionális fejlődés általában 12-14 napot vesz igénybe, kb. 22-24°C-on, ami ideális a legtöbb faj számára. Miután a lárvák áttörték a kocsonyás burkot is, szabadon mozognak, érdemes kivenni azokat és áttenni olyan edénybe, ahol kezdetben alacsony a vízmélység, de ez fokozatosan emelhető. Az ebihalak tartására megfelel bármely műanyag vagy üvegedény, ami könnyen tisztítható. Az ebihalakat jó minőségű haltáppal érdemes etetni. Ügyelni kell arra, hogy a víz hőmérséklete ne ingadozzon jelentősen, a 22-24 °C közötti érték megfelelő.

Az ebihalaknak először a hátsó lába fejlődik ki. Miután az első lábak is előbújnak, már a felszívódó farokból táplálkoznak, tehát nem vesznek fel táplálékot egészen az átalakulásukig. Ekkor át kell helyezni őket olyan nevelőedénybe, ahol a vízből ki tudnak mászni egy száraz felületre. A felszívódott farkú, átalakult kisbékákat ajánlott kisebb nevelőedényekbe helyezni. Számukra kezdetben érdemes ugróvillásokat, levéltetveket adni, később kistestű muslicát kaphatnak, majd jöhet a nagyobb méretű muslica.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Kovalcsik Gézának, hogy bevezetett a nyílméregbéka-tartás rejtelmeibe, és átnézve a kéziratot hasznos ötletekkel szolgált. A kézirat alapos áttekintéséért és a kiegészítésekért köszönetemet fejezem ki Hévízi Gergelynek, akivel az elmúlt évtizedben a felmerült tartási és tenyésztési problémákat megbeszélhettem. Köszönöm Fehér Tamásnak, hogy a kéziratot stilisztikailag átnézte és a terráriumtechnikai, a terrarisztikai vonatkozásokban kiegészítette.

A tanulmány létrejöttét a Kutató Kari Kiválósági Támogatás – Research Centre of Excellence – 17586-4/2013/TUDPOL segítette.

Irodalomjegyzék

Beck, C.W. (1998): Mode of fertilization and parental care in anurans. Animal Behavior, 55. 439-449.

Burst, D.G. (1993): Maternal Brood Care by Dendrobates pumilio: A Frog that Feeds Its Young. Journal of Herpetology, 27. 1. 96-98.

Grant, T., D.R. Frost, J.P. Caldwell, R. Gagliardo, C.F.B. Haddad, P.J.R. Kok, D.B. Means, B.P. Noonan, W.E. Schargel, W.C. Wheeler (2006): Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bulletin American Museum of Natural History, 299. 1-262.

Haselhaus, R. (1988): Pfeilgiftfrösche. Eugen Ulmer GmbH & Co.

Haselhaus, R. (1992): Poison arrow frogs: Their natural history & care in captivity. Ralph Curtis Books.

Internet 1: http://amphibiaweb.org/ (AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb.)

Internet 2: http://www.dendrobates.org/

Internet 3: http://www.terrarientechnik.de/

Internet 4: http://www.bens-jungle.de/index.php

Internet 5: http://www.blackjungle.com/

Internet 6: http://www.dendrobase.hu

Internet 7: http://www.dendrobates.hu/

Internet 8: http://www.terraristik.com/

Keller, G., Scheider, E-G. (2005): Pfeilgiftfrosche. Bede Books.

Kovalcsik G. (2001a): A sárgaszalagos nyílméregbéka (Dendrobates leucomelas Fitzinger, 1864). Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, III. 5. 14-15.

Kovalcsik G. (2001b): Háton hordott kannibál. Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, III. 2. 33.

Kovalcsik G. (2002a): Azúrkék famászó. Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, IV. 6. 34-35.

Kovalcsik G. (2002b): Ez rettenetes – a sárga vagy rettenetes nyílméregbéka (Phyllobates terribilis (Myers et Daly, 1978). Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, IV. 4. 16-17.

Kovalcsik G. (2002c): Ivadékgondozó szamóca. Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, IV. 2. 14-15.

Lötters, S., K.H. Jungfer, Henkel, F.W., Schmidt, W. (2007): Poison Frogs, Biology, Species & Captive Husbandry. Edition Chimaira & Serpents Tale.

Schmidt, W., Henkel, F.W. (2008): Professional breeders series: Poison frogs. Chimaira, Frankfurt.

Sihler, A., Sihler, G. (2007): A complete guide to Dendrobatidae. TFH Publications.

Summers, K. (1992): Mating strategies in two species of dartpoison frogs: a comparative study. Animal Behavior, 43. 907-919.

Summers, K., Bermingham, E., Weigt, L., McCafferty, S., Dahlstrom, L. (1997): Phenotypic and genetic divergence in three species of dart-poison frogs with contrasting parental behavior. J. Hered., 88. 8-13.

Summers, K., Symula, R., Clough, M., Cronin, T. (1999): Visual mate choice in poison frogs. Proc. R. Soc. B., 266. 2141-2145.

Vences, M., Kosuch, J., Boistel, R., Haddad, C.F.B, La Marca, E., Lötters, S., Veith, M. (2003): Convergent evolution of aposematic coloration in neotropical poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. Org. Divers. Evol., 3. 215-226.

Weygoldt, P. (1980): Complex brood care and reproductive Behavior in captive poison-arrow frogs, *Dendrobates pumilio* O. Schmidt. Behavioral Ecology and Sociobiology, 7. 329-332.

Wright, K.M., Whitaker,B.R. (2001): Amphibian Medicine and Captive Husbandry. Amazon.

Young, A.M. (1979): Arboreal movement and tadpole-carrying behavior of Dendrobates pumilio Schmidt (Dendrobatidae) in Northeastern Costa Rica. Biotropica, 11. 3. 238-239.

Zimmermann, H., Zimmermann E. (1984): Durch Nachzucht erhalten: Baumsteiger-frösche. Dendrobates quinquevittatus und D. reticulatus. Aquarien-Magazin, 18. 35-41.

Zsilinszky S. (1999): Nyílméregbékák a terráriumban. Terrárium. Terrarisztikai és herpetológiai magazin, I. 1. 8.

A HAZAI ÉTKEZÉSI SZOKÁSOK VÁLTOZÁSAI A HONFOGLALÁSTÓL-NAPJAINKIG

Kovács Alfréd Pál

SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattenyésztés-tudományi Intézet
2100 Gödöllő, Páter K. u. 1
Kovacs.Alfred@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Szent István, valamint az Árpád házi királyok uralkodása idején a hazai étkezési szokásokat német és görög hatások érték. Az étkezések csoportos rituálét jelentettek, s csak napi 2 fő étkezés volt (10-17 óra). Mátyás király uralkodása alatt történtek a legjelentősebb változások a hazai étkezési kultúrában. Az ételkészítést széles alapanyag felhasználás jellemezte. 1600-tól vált szokássá a déli béd. Ezidőtájt (1695-ben) adták ki az első nyomtatott szakácskönyvet is. Az 1700-as években terjedtek el az evőeszközök: kanál, villa, kés. Fontos változás volt az étkezés individualizálódása, úgy az ülőkénél, mint az asztalon. A XIX. Században alakulnak ki a jó minőségű étel alapanyagok (a hús és tej mellett), mint a liszt, cukor, zöldségek, gyümölcsök. A XX. Század elején jelennek meg a tájjellegű ételek Magyarországon. Ekkor történik a juhhúsról a sertéshúsra való áttérés. A két világháború között a magyar társadalom osztálytagozódása okozza a különbséget a különböző rétegek étkezési szokásai között. A szocializmus idején szintén eltérő szokásokat, valamint ételeket preferált a munkásság, a parasztság, illetve az értelmiség.
Kulcs szavak: étkezési szokások, alapanyagok, étkezési idő, evőeszközök, tájjellegű ételek

Changes of Hungarian nourishment customs from the Settlement to nowadays

Abstract

In the reign of Saint Stephen and kings of Home of Árpád Germanien and Greek influences had on Hungarian dietary customs.Meals were collective ritual events, but only two nourishments were on a day/at 10 and 17 o'clock/.In the reign of King Matthias the most important changes had happened in Hungarian dietary customs.Preservation of meals were based on wide primary materials. From 1600th years midday meal became into daily nourishments. At that time/ in 1695/ the first Hungarian printed receipt-book has published. In 1700th years cutleries: knife, fork and spoon had been general used. Individualisation was a very important change of nourishments had been taken not only at the seat, but also on the table.In the19th Century primary food materials/beside meat and milk/ as flour, sugar, vegetables and fruits established in an excellent quality. In early years of 20th Century regional type of meals appeared in Hungary. At that time a change over was from the consumption of mutton to pork. Between two world wars a class-division of Hungarian society caused a difference among nourishment customs of stratums of society. In the socialism working-class, peasantry and intellectual class preferred also different nourishment customs and meals.
Key words: nourishment customs, primary food materials, cutleries, dining time, regional type of meals

Szent István, valamint az Árpád-házi királyok uralkodása idején a hazai étkezési szokásokat német és görög hatások érték. Akkoriban a magyarok táplálkozását sok vad-, halétel, gyümölcs fogyasztása jellemezte. Számos zöldségféle és fűszernövény egészítette ki a gazdag, természetes eredetű hozzávalók választékát: pl. vöröshagyma, fokhagyma, gyömbér, ánizs, fahéj, bors, kapor.

A kolostorokban, falvakban, egyházi birtokokon bor, árpasör, valamint ecetes halak készítésével tették még változatosabbá az étrendet. Az edények közül a lábas, fazék volt a leggyakoribb főző alkalmatosság. A pásztorok bográcsot használtak ételkészítésre, s főként pásztortarhonyát és slambucot főztek. Napi két fő étkezést tartottak, ebédet és vacsorát, amelyek délelőtt 10, s délután 17-18 óra között zajlottak. A reggeli még nem volt ismert. A főúri udvarokban, s a szegény családokban az étkezések egyaránt csoportos rituáléknak számítottak.

A magyar étkezési szokásokban Mátyás király uralkodása idején is jelentős változások történtek. Bő ételválaszték, széles alapanyag felhasználás jellemezte az étkezéseket. Ezidőtájt nyert teret a rostélyon való sütés. A főzőeszközök között a legfontosabbak az üst, a lábasfazék, valamint a bográcsvolt. Ebben az időszakban kezdtek a magyarok először sütni kovászolt kenyeret, s a paprika, mint fűszernövény is megjelent a hozzávalók között, bár 1604-től még törökborsnak hívták, s csak 1775-ben nyerte el végleges elnevezését.

Az 1600-as évektől jött szokásba a déli ebéd, francia eredetű volt, s Habsburg közvetítéssel került hazánkba. A XVII. századig ismeretlen volt a paradicsom, a burgonya, s a metélt tészta. Török közvetítéssel került Magyarországra a kávé, tea, csokoládé.

Az 1700-as évek elején terjedt el a kanál, villa, kés használata. A főúri lakomákon nyugati hatásra étekfogó, terítő (pohárnok), szeletelő (asztalnok), valamint borsoló specialistákat alkalmaztak. A XVII. századtól már nők is lehettek szakácsok. Újdonság számba mentek a vajjal készült böjti ételek, a fűszerezett húsok, valamint a káposztás fogások.

A hazai szakácskönyvek, receptkönyvek története egészen az 1500-as évek közepére nyúlik vissza. Az első emlékek csak kéziratos szakács feljegyzéseket tartalmaztak. 1547-ben Zoltán Imre: Húsvéttól három napi ételek; 1603-ban pedig Thurzó Szaniszló: Nádasdy főúr 1 havi ételei című feljegyzései jelentették a főbb állomásokat. A kéziratos szakácskönyvek közül két kiadás érdemel említést:

1601. a Szentbenedeki Mihály által készített,

1662. a Zrínyiek Csáktornyai szakácskönyve.

A magyar gasztronómia első nyomtatott szakácskönyvét 1695-ben, Kolozsvárott adta ki Tótfalusi Kis Miklós, s a „Szakács mesterségnek könyvecskéje” címet viselte. Említésre méltó értékes emlék Koháry István (1649-1731) „Gasztronómiai tárgyú versek” című munkája, amelyet börtönbüntetése idején készített.

A XVII. században más, jelentős szokásváltozások is történtek a magyar étkezési kultúrában. A késői török időkben kialakult az ételkészítés széles alapanyagtára, s megjelentek olyan ételek, amelyek természetes részei napjaink ételválasztékának. Ilyenek voltak pl. a hurka, kolbász, rétes, torta, fánk. A törökök révén terjedt el hazánkban a dohány, a dió, füge, szőlő, gesztenye, mandula stb. Külön említést érdemel, hogy az 1600-as évek végétől fogyasztanak a magyar emberek főzelékeket. Ezekből az évekből jöttek divatba az olyan mártások, mint a meggy, paradicsom. 1651 óta használatos a zöldségfélék között a paradicsom elnevezés. A XVII. század második fele jelentette a hazai bortermelés, borkultúra hivatalos kezdetét is.

Az étkezési szokásokban – mondhatni -, történelmi jelentőségű fordulat játszódott le. Ekkor nyert teret az individualizálódás. A korábbi évszázadokban a csoportos étkezések domináltak, s csak a földművelő parasztok étkeztek időnként egymagukan. Az 1600-as évek végétől az étkező személy saját, egyéni ülő-, valamint étkező teret kapott. A több személyes

lócák, kanapék helyett egyszemélyes székek, ülőkék, hokedlik, sámlik kerültek az asztalok köré. Az asztalon pedig minden étkező embernek lett egyéni területe, amelyet illett tiszteletben tartani. Megszűnt az az évszázados szokás is, hogy a közös, nagy fazékból minden étkező kézzel veszi ki a húsokat, zöldségeket, tésztát, s azt a közös tálakon, tálcákon fogyasztja el. Megjelent a saját használatú tányér, pohár, villa. Ezek már a napjainkhoz hasonló ételfogyasztási módokat tették lehetővé.

A XVIII. század szintén tartogatott több olyan változást a hazai érkezési kultúrában, amelyek korszakalkotó jelentőséggel bírtak. Elsőként említhető, hogy a főételek közé ekkor került be a leves, amit francia szokás alapján vettek át korabeli honfitársaink. Mivel magyaros sűrű leveseket már az őshazában is készítettek, ez a francia souppon (leves) alapvetően különbözött ezektől, hiszen a mai levesekhez hasonló volt. Hatalmas jelentőségű átalakulások jellemezték a magyar főúri étkezési kultúrát, mivel Mária Terézia, valamint II. József számos francia étkezési szokást honosítottak meg Bécsben, amelyeket a magyar urak osztrák közvetítéssel adaptáltak hazai kastélyaikba, birtokaiba.

A XIX. Században újabb külföldi hatások révén fejlődött a hazai étkezési kultúra. A Habsburg befolyás erősödésével osztrák eredetű ételek jelentek meg a főúri lakomákon. Ilyenek voltak pl. a rántott csirke, v agy a paprikás csirke.

Ebben az időszakban érte el a magyar gasztronómia azt a szintet, hogy rendszeresen ellátták a szakácsokat jó minőségű, elegendő mennyiségű étel alapanyaggal: pl. liszt, cukor, zöldségek, gyümölcsök, fűszerek. A kifinomodott fogyasztói ízlést is ki tudták már szolgálni kiváló ételekkel, valamint étel-kiegészítőkkel. Ezek zömében hazai forrásokból származtak, de folyamatosak kezdtek lenni az import beszerzések is. Francia ételkülönlegességek, valamint hozzávalók színesítették az amúgy is széles választékot. A magyar ételek közé stabilan beékelődött az omlett, a kotlett és a parfé. A hozzávalók között pedig rangos helyet vívott ki napjainkig a zselatin, valamint a majonéz.

A XIX. század végér először Budapesten, majd a nagyobb vidéki városokban egyaránt nyitottak éttermeket, kávéházakat, cukrászdákat. Olyan márkanevek fémjelezték a magyar étkezési kultúrát, mint a PICK, HERTZ, GUNDEL családok vállalkozásai.

A XX. század több jelentős vonulattal is szerepel étkezési kultúránk fejlődésében. Az 1900-as évek elején a szegedi csikósok először főznek birkapörköltöt. A magyar háztartások túlnyomó részében a kemencét, búbos kemencét felváltja a sparherd. Így az ételkészítés gyorsabb, s változatosabb módszerei kerülnek előtérbe. Óriási jelentőségű, s napjainkig kiható a tájjellegű ételek megjelenése éppúgy, mint azok összeírása, gyűjtőmunkákba való feldolgozása. Az élelmiszerek választéka bővült a kovászolt búza- és rozskenyérféleségekkel, valamint a kukorica lepénnyel, máléval. Ebben a periódusban (a XX. sz. elején) válik állandó étel összetevővé az egyenletes minőségű burgonya. A Monarchiában élelmiszertermelő feladatot, s hazai osztrák tőkét kapó Magyarországon, a századforduló előtt elkezdődik a gabona, cukorrépa, s számos más ipari növény termesztése, aminek a fejlődéséhez feltörik a legjobb talajú legelőket is, így a juh-, a kecske- és a bivalyállomány a gyenge minőségű gyepekre szorul. Az abrakfélék termesztésének s felhasználásának kedvezményezett állattenyésztő ágazatai, a baromfi- és sertéstenyésztés, gyors fejlődésnek indulnak. A mezőgazdaság és az állattenyésztés belterjes irányba való fejlődését olyan fajták is jellemzik, mint a mangalica. A magyar ételek elkészítésében a sertészsír, valamint a sertéshús óriási előnyre tesz szert, s ezt a XX. század végéig meg is tartja

A két világháború között, Trianon után, a magyar társadalom fejlődését jól megfigyelhető osztálytagozódás jellemzi, ahol a szegények, a középosztály, valamint a gazdag réteg nemcsak eltérő vagyonú, közéleti, társadalmi súlya, hanem étkezési kultúrája között is igen jelentős

különbség alakul ki. A tápláltsági állapot a szegény rétegekben n agyon alacsony szinten mozog, míg a gazdag családok európai módon élnek, kávéházakba járnak, s életmódjuk, szokásaik közel vannak a Nyugat-Európai hasonló társadalmi helyzetű csoportjához. A második világháború után kiépülő szocialista társadalmi berendezkedés (1947-1990) ettől eltérő csoportokat hoz létre, s a munkásosztály, parasztság, értelmiség között szintén megtalálhatók az étkezési kultúra különbségei ugyanúgy, a fogyasztott, illetve preferált ételek, ételkülönlegességek szempontjából.

Az 1970-es évekig a nehéz, zsíros, erősen fűszeres ételek dominálnak, amit fokozatosan vált fel egy jóval polarizáltabb, heterogénebb étkezési szokásrendszer, hiszen a ’90-es évektől történő újra kapitalizálódás teljesen átírja a jövedelem viszonyokat, amik döntős hatást gyakorolnak az ételfogyasztás összetevőire éppúgy, mint színvonalára, minőségére, igényességére. A XX. század végére azonban általános a korábbi fogyasztási trendek csökkenése. Az igényes élelmiszerfogyasztók azok a jómódú állampolgárok, akik olyan korszerű összetételű, egészséges, változatos ételeket fogyasztanak, amelyek kalóriaszegények, ökológiailag ellenőrzöttek, illetve értékes tápanyag-összetevőket tartalmaznak.

A honfoglaláskori magyar ételkultúra teljesen más elvek szerint épült fel, s fejlődött, mint a Nyugat-Európai szokásrendszerek. Az őshazából hozott vallásos előírások, s az ételkészítési módszerek, eszközök idegenek voltak Európában. Évszázadokon keresztül számos külföldi hatás gazdagította, alakította, s ezek a folyamatok napjainkban is folytatódnak. A magyar étkezési szokások sokat adaptáltak, de kevesebbet sikerült a környező népeknek eltanulniuk. A közeledés tehát a hazai szokások háttérbe szorulását jelentette.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” és a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatták.

ELŐZETES EREDMÉNYEK: TEJELŐ TEHENEK SZÍVRITMUS-VARIANCIÁJA HAGYOMÁNYOS ÉS ROBOTIZÁLT FEJÉSI RENDSZERBEN

Kovács Levente, Jurkovich Viktor, Kézér Fruzsina Luca, Tőzsér János
Kovacs.Levente@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Vizsgálatunkban tejelő tehenek (n=18) fejés közbeni szívritmus-varinancia (heart rate variability, HRV) értékeit hasonlítottuk össze hagyományos, ill. robotizált fejési technológiában. A HR az elővárakozóban, a fejőházba/fejőrobotba való belépés előtt, a fő fejési időszakban, a fejés utolsó percében, a teljes fejést és a fejőállásban/fejőegységben töltött teljes időt tekintve is magasabb volt a fejőházi fejés alatt (P=0,000; P=0,000; P=0,010; P=0,028; P=0,046, P=0,005, sorrendben). A szimpatikus aktivitást jelző mutatók (SD2 és SD2/SD1) a fejőkelyhek felhelyezését megelőző időszakokban (elővárakozó, a fejőházba/fejőrobotba való belépés előtt, ill. a fejés előkészítése során) szintén magasabbak voltak a hagyományos fejési rendszerben (P=0,12, ill. P=0,13; P=0,012, ill. P=0,004; P=0,033, ill. P=0,031, sorrendben). Eredményeink szerint a fejőházi fejés nagyobb stresszt okoz az állatoknak, amely HR és a HRV monitorozásával jól kimutatható.
Kulcsszavak: hagyományos, robotizált fejés, szívritmus-variancia, stressz

Heart rate and heart rate variability of dairy cows in conventional and automatic milking systems: a preliminary study

Abstract

Heart rate variability (HRV) values of dairy cows (n=18) were compared in conventional and automatic milking systems during milking. HR was higher in the conventional milking parlour in the holding pen, before the entrance of the milking parlour, during main milking stage, during the last minute of milking, during the entire milking, and during the whole time spent in the milking stall/milking unit (P=0,000; P=0,000; P=0,010; P=0,028; P=0,046, P=0,005, respectively). Sympathetic parameters of HRV (SD2 and SD2/SD1) were also higher during milking stages before teat cup attachment (in the holding pen, before entrance the milking parlour/milking unit, during udder preparation) measured during the conventional milking process (P=0.12; P=0.13; P=0.012 and P=0.004; P=0.033; P=0.031, respectively). Based on our results, conventional milking caused higher stress for cows, which was well established by HR and HRV parameters.
Keywords: conventional milking, automatic milking, heart rate variability, stress

PECSENYELUDAK TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA GYÓGYNÖVÉNNYEL DÚSÍTOTT TAKARMÁNYOK ETETÉSÉNEK HATÁSÁRA

Körözsi Virág[1], Weber Mária[1], Erdélyi Márta[1], Apáti Nagy Gábor[2], Ábrahám Csaba[3], Szabó Rubina Tünde[1], Mézes Miklós[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.
[2]NITAK Nagyszénási Takarmánykeverő Kft. 5931 Nagyszénás-Lajosszénás
[3] Food Analytica Kft. 5711 Gyula, Dancza u. 13.
korozsi.virag@citromail.hu

Összefoglalás

Vizsgálataink arra irányultak, hogy miként hatnak a ludak húsminőségére a takarmányokhoz adagolt természetes gyógynövény kivonatok. A vizsgálathoz felhasznált gyógyhatású növények a kakukkfű, illetve a rozmaring voltak, amit pecsenyeludak takarmányaihoz adagoltunk. A kísérlet során azonban nem csak az állatokra gyakorolt hatásukat vizsgáltuk, hanem emellett tanulmányoztuk a takarmány tárolására kifejtett hatásukat is. A kísérlet során kontroll (normál kereskedelmi forgalomban kapható takarmánykeverékek illetve kísérleti csoportokat alakítottunk ki. Az első kísérleti gyártás során bekevert gyógynövény-mennyiség nem bizonyult elegendőnek a kontroll takarmányokban szereplő antioxidánsok helyettesítésére, amire a takarmányok tárolási vizsgálatai utaltak. Továbbá az állatokon is megfigyelhetőek voltak problémák (pl. tollasodási zavarok). A második – immár nagyobb – bekeverési arány már megfelelőnek bizonyult,ami az állatok termelésében is igen kedvezően mutatkozott meg.
Kulcsszavak: rozmaring, kakukkfű, pecsenyelúd, antioxidáns

MEAT PRODUCTION TRAITS OF GEESE FED WITH HERB-ENRICHED FEED

Abstract

We have investigated the effect of natural herb supplements - mixed to the feed - on the meat quality of geese. Thyme and rosemary was used in our study, which we mixed with the feed. Not only was the effect of these herbs on the animals, but also their influence on the storage of the feed was studied. Control (fed with commercial mixed feed) and experimental groups were formed during the investigation. The storage analysis suggested that the quantity of herbs mixed with the feed in the first experiment wasn't sufficient for replacing the antioxidants the control feed had. At the same time, some problems (e.g. feathering difficulties) were visible on the animals. The second – higher – mixing ratio proved to be appropriate, present very favourable in the production of the geese as well.
Keywords: rosemary, thyme, roast goose, antioxidant

Irodalmi áttekintés

Napjainkban a baromfihús fogyasztása növekvő tendenciát mutat. Az emberek egyre inkább törekednek az egészséges életmódra. Tudatosabbá vált, ezáltal az ételeink hozzávalóinak körültekintőbb kiválasztása is. Ez a tény arra sarkallja a baromfitenyésztőket, hogy az általuk nevelt állatok takarmányozásában is felhasználják ezeket az irányelveket, mivel ez alapjaiban befolyásolja a húsáruk minőségét, valamint az értékesítési lehetőségeket. A piaci versenyben azok a termelők képesek az élen haladni, akik mindamellett, hogy a termelést költséghatékonnyá teszik, képesek kielégíteni a vevők minőség iránti igényét. Központi szerepet játszik az állatok felnevelése során az alkalmazott takarmány minősége, beltartalmi értékei. Ahhoz, hogy a nevelés során az állatok növekedéshez szükséges tápanyag igényét kielégítsék, szükséges a takarmányok táplálóanyag kiegészítése. Ez történhet mesterséges anyagokkal, azonban napjainkban egyre jobban előtérbe kerül a természetes anyagok, köztük a természetes antioxidánsok alkalmazása a takarmánygyártás során. A lúd takarmányozása sem kivétel ez alól.

A betakarított takarmánynövényben az enzimek még hosszú ideig működőképesek. Ennek a hatásnak, ill. a levegő oxigéntartalmának köszönhetően a premix vitaminjai, különösen a karotin, az A- és E-vitamin nagy része megsemmisülhet (*Herold*, 1997).

Keverék takarmányok előállítása során tehát elkerülhetetlen az antioxidáns kiegészítés. Ennek oka, hogy ezek az anyagok védik a premixben található oxidációra hajlamos vitaminokat, ezenfelül pedig a zsír avasodását is megakadályozzák. A már létrejött peroxidokat hatását nem tudják semlegesíteni, de a folyamatot lassítják (*Schmidt*, 1996).

A jó stabilitással rendelkező, hatékony antioxidáns kiegészítés közvetett módon hatást gyakorol az állatok növekedési és termelési mutatóira (*Herold*, 1997).

Ez a kiegészítés történhet ipari útón előállított premixek segítségével. Azonban érdemes figyelembe vennünk a természet nyújtotta lehetőségeket is, ami nem csak az állatokra gyakorolhat pozitív hatást, de a takarmányok eltarthatóságának növelésében is lehetőségeket rejthet.

A gyógynövények jótékony hatásai már régóta ismeretesek, felhasználásuk széleskörű. Mindezt bizonyítja, hogy nem csak gyógyászati célra lehet őket felhasználni, hanem antioxidáns kiegészítra is.

Gyógynövényekről akkor beszélünk, ha az adott növény olyan hatóanyagot tartalmaz, mely az emberi vagy állati szervezetre jótékony, gyógyító hatást fejt ki. Legtöbbször ez a hatóanyag nem nagy mennyiségben található meg az adott növényben, emellett általában ezt a vegyületet a növény egy bizonyos szerve tartalmazza. A hatóanyagot tartalmazó növényi részt drognak nevezzük. A drogok tárolása a hatóanyag szempontjából fontos, hiszen egyes vegyületeik könnyen bomlanak. Ahhoz, hogy jó minőségű gyógynövényhez jussunk fontos megválasztani a gyűjtés idejét, mivel a vegetációs időszak meghatározza a hatóanyagok mennyiségét (*Bíró és mtsai,* 1971).

Jeles képviselője a gyógynövényeknek a rozmaring és a kakukkfű, melyek a kísérleteink során, mint természetes antioxidánsok kerültek felhasználásra.

A rozmaring (*Rosmarinus officinalis*) olyan illatos félcserje, mely a Földközi-tenger közelében vadon terem (*Rápóti és mtsai,* 1977). A gyógynövény szárított levele 1-2%, míg friss hajtása 0,5-1,5% illóolaj tartalmú. Ezen felül fontos megemlíteni a cserzőanyagot mely 6-8%-ot tesz ki (*Bernáth,* 2000). Kimutatták, hogy a növény hatóanyagai csökkentik a mind a glükóz mind pedig a koleszterol szintjét a vérben és lassítja az elhízást is. Emellett ezek az antioxidánsok potenciálisan növelik a máj glikolízisét és a zsírsav oxidációját (*Tu és mtsai,* 2013). A rozmaring levelekből izolált természetes antioxidáns kivonat jobbnak bizonyult, mint a BHA (Butil-hidroxi-

anizol) és egyenrangú hatást fejtett ki, mint a BHT (butil-hidroxi-toloul) (*Wu és mtsai,* 1982). Franciaország tradicionális fűszernövénye, de mára már az egész világot meghódította, mint közkedvelt fűszernövény. Népszerűsége kellemes aromája és emésztéssegítő hatásának tudható be. Ezenfelül nyugtató hatású és bőrproblémák kezelésére is használható (*www.vital.hu*).

A timol (isopropil-m-krezol) egy illékony fenol monoterpén, ami megtalálható sok növényfaj olajában, ezen belül pedig nagyon gyakori a mediterrán és a mérsékelt övi flórában. Antiszeptikus és gombaölő hatása miatt mind a humán, mind pedig az állatgyógyászatban felhasználják (*Soler-Serratosa és mtsai,* 1996*).* Feltételezhető, hogy a timolnak fájdalomcsillapító hatása van, amit az idegrendszer bizonyos receptoraira kifejtett hatásával lehet magyarázni. A zsírsejtek meghatározott receptorai kifejtett hatásával, előidézhet fokozott zsírsav és glicerin szintézist, ami az előfeltétele a hőveszteség csökkenésének (*Beer és mtsai,* 2007*).*

Anyag és módszer

A kísérletek az Anser Brach Kft. lúdtartó telepén, Battonyán zajlottak. A ludak a nevelő takarmánykeverékben kapták meg a gyógynövényeket. Kialakításra kerültek kontrol, valamint kísérleti csoportok. Összesen 5 kísérlet zajlott le. Az első két alkalommal adagolt gyógynövény mennyiség nem volt elegendő az álltok igényének fedezésére (tollasodási zavarok léptek fel, amit a termelői tapasztalatok alapján az antioxidáns kiegészítésre vezettek vissza). Így a következő kísérletekben a takarmányokhoz adagolt természetes antioxidáns mennyiségét megemeltük.

Vizsgáltuk a keveréktakarmányok beltartalmi paramétereit 3 hónap időtartamú tárolási vizsgálatok keretében, továbbá a hexanal tartalom, illetve a savszám és a peroxidszám kerültek megmérésre. A premixben megmértük az A-, E-vitamin szintet, valamint a BHT tartalmat.

A mintavételek során a takarmány-fogyasztást, a testtömeget és a selejtezéseket jegyeztük fel. A mintavétel egy időben történt a kísérleti és a kontroll csoportban. A testtömeg mérés a takarmány-mintavételekkel egy időben történt, csoportonként 10-10 állattal.

Eredmények és értékelésük

Az első két kísérlet alatt kiderült, hogy az adagolt gyógynövény mennyisége nem fedezte kellő mértékben az állatok szükségleteit. Ezért az ezt követő kísérletekben ezt a mennyiséget a duplájára emeltük. (A pontos mennyiségek cégtitoknak minősülnek.).

A takarmány tárolási vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a gyógynövénnyel való dúsítás hatására a vizsgált paraméterek negatív irányba nem változtak, elérték a mesterséges antioxidánsok által kifejtett hatást, továbbá a hexanal szintje a kísérleti takarmányokban is elérte az egyébként mesterséges antioxidánsokkal produkálható kedvező szintet. A 3 hónapos tárolási vizsgálat is bíztató eredményekkel zárult az első, csekélyebb gyógynövény-tartalommal is, amit ezek emelt szintje tovább fokozott.

1. táblázat: **Az első kísérlet során mért termelési értékek**

Élethét (1)	Kontroll-1 (5)		Kísérlet-1 (6)	
	Testtömeg (7)	Takarmány fogyasztás (g/liba/hét) (8)	Testtömeg (7)	Takarmány fogyasztás (g/liba/hét) (8)
Naposkor (2)	92 g		95 g	
1	355 g	340 g	358 g	350 g
2	815 g	730 g	811 g	690 g
3	1 480 g	1 070 g	1 505 g	990 g
4	2 320 g	1 420 g	2 270 g	1 380 g
5	2 960 g	1 570 g	2 920 g	1 550 g
6	3 480 g	1 790 g	3 520 g	1 810 g
7	4 100 g	1 940 g	4 260 g	1 890 g
8	4 380 g	2 150 g	4 400 g	2 100 g
9	**4 570 g**	2 270 g	**4 650 g**	2 190 g
Összesen: (3)		**13 280 g**		**12 950 g**
1 kg élőtömeg előállításához szükséges takarmány mennyiség (4)		**2,91 kg/ttkg**		**2,78 kg/ttkg**

Table 1: The data of the first attempt
(1) week (2) age (3) all (4) forage quantity for produce 1 kg weight (5) control (6) experiment (7) weight (8) forage intake (g/goose/week)

2. táblázat: **Az ötödik kísérlet során mért termelési értékek**

Élethét (1)	Kontroll-5 (5)		Kísérlet-5 (6)	
	Testtömeg (7)	Takarmány fogyasztás (g/liba/hét) (8)	Testtömeg (7)	Takarmány fogyasztás (g/liba/hét) (8)
Naposkor (2)	83 g		87 g	
1	310 g	360 g	325 g	370 g
2	840 g	780 g	850 g	800 g
3	1 530 g	1 100 g	1 480 g	1 130 g
4	2 270 g	1 470 g	2 200 g	1 520 g
5	3 220 g	1 880 g	3 310 g	1 860 g
6	3 820 g	2 020 g	3 950 g	2 080 g
7	4 240 g	2 120 g	4 370 g	2 170 g
8	4 820 g	2 370 g	4 930 g	2 290 g
9	**5 220 g**	2 680 g	**5 350 g**	2 550 g
Összesen: (3)		**14 780 g**		**14 770 g**
1 kg élőtömeg előállításához szükséges takarmány mennyiség (4)		**2,83 kg/ttkg**		**2,76 kg/ttkg**

Table 2: The datas of the fifth attempt
(1) weeks (2) age (3) all (4) forage quantity for produce 1 kg weight (5) control (6) experiment (7) weight (8) forage intake (g/goose/week)

Következtetések és javaslatok

Az állattartók szempontjából rendkívül fontos a felhasznált takarmány mennyisége a nevelés során, hiszen ennek költsége a változó költségek döntő hányadát képviseli. A termelési mutatók közül az 1 kg testtömeg előállításához szükséges takarmány mennyiség megegyezett vagy kevesebb volt a kísérleti csoportban, mint a kontrollban. Ezek alapján pozitívan értékeljük, hogy a természetes antioxidáns adagolás képes ugyanazt a hatást kifejteni, mint a mesterséges megfelelője. A ludak takarmányértékesítése a gyógynövényes takarmánnyal is elérte, esetünkben meg is haladta a kontroll takarmány etetése során elért értékeket. A kísérletek alapján elmondható, hogy a gyógynövények takarmány kiegészítésként való felhasználása ígéretesnek mondható a pecsenyeludak felnevelése során.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a NITAK Kft.-nek, különösen Apáti Nagy Gábornak és Tóthné Apáti Nagy Mónikának, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjunk a GOP-1.3.1-10/A-2010-0044 azonosító számú „Növényi eredetű természetes antioxidánsok hatása a keveréktakarmányok oxidációra érzékeny táplálóanyagainak stabilitására, valamint a termék minőségére ” című pályázatuk vizsgálataiba.

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence-17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat, illetve *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú, *„Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen”* című pályázat is támogatta.

Irodalomjegyzék

Beer, A-M., Lukanov, J., Sagorchev, P. (2007): Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. Phytomedicine. 14. 1. 65-69.

Bernáth J (szerk) (2000): Gyógy- és aromanövények Mezőgazda Kiadó, Budapest, 502-503.

Bíró és mtsai. (1971): Természettudományi kislexikon Akadémiai kiadó, Budapest, 438-439.

Herold I. (1977): Takarmányozás Mezőgazdasági Kiadó Budapest, 53,62

Rápóti és mtsai. (1977): Gyógyító növények Medicina Könyvkiadó, Budapest, 180.

Schmidt J. (1996): Takarmányozástan Mezőgazda Kiadó, Budapest, 43,46, 231.

Soler-Serratosa, A., Kokalis-Burelle, N., Rodriguez-Kabana, R., Weaver, C. F., King, P. S. (1996): Allelochemicals for Control of Plant-Parasitic Nematodes. 1. In vivo Nematicidal Efficacy of Thymol and Thymol/Benzaldehyde Combinations Department of Plant Pathology, Auburn University, 58.

Tu, Z. , Moss-Pierce, T., Ford, P., Alan Jiang T. (2013): Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extract Regulates Glucose and Lipid Metabolism by Activating AMPK and PPAR Pathways in HepG2 Cells J. Agric. Food Chem. 61. 11. 2803–2810.

Wu, J., Min-Hsiung, L., Chi-Tang, H., Chang, S. (1982): Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary Journal of the American Oil Chemists' Society, 8. 339-345.

www.vital.hu Letöltés ideje: 2013.08.22.

AZ ÚJSZÜLÖTT CSIKÓ EGYES ÉLETTEVÉKENYSÉGEINEK ÉRTÉKELÉSÉRŐL

Kummer Luca[1], Egri Borisz[1], Bába András[2]

[1]Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
9200 Mosonmagyaróvár, Vár 2.
[2] POLEQUI Állategészségügyi Bt., 2519 Piliscsév, Béke u. 137.
kummer.luca@gmail.com

Összefoglalás

Hazánkban jelenleg 6-7000 csikó születik évente. A vemhesülési arány 50-60%-os, míg a csikózási arány igen alacsony, 20% körüli. Az első szopás bekövetkezését sok tényező befolyásolja (többek között a felállás időpontja), de az újszülöttnek ahhoz minél hamarabb hozzá kell jutnia.
„A" és „B" ménesekben folytatott vizsgálatainkat az ellések körülményeinek felmérésével kezdtük, melyek során négy év (2009-2012) ellési szezonjait és választásig a született csikók életét követtük nyomon. Összegyűjtöttük az első felállás, az első szopás, valamint a bélszurok távozásának időpontjait. A két ménes adatait összehasonlítva kiderült, hogy „A" ménes csikói hamarabb álltak lábra, hamarabb jutottak a föcstejhez, és a meconium is hamarabb eltávozott szervezetükből, mint „B" ménes csikóinál.
Kulcsszavak: újszülött csikók, élettevékenységek, értékelés

About the evaluation of some vital function of the newborn foal

Abstract

Between six and seven thousand foals are born each year in Hungary. The pregnancy rate is 50 - 60%, while the live foal rate is at a very low 20%. Many factors influence the time of first suckling including the time of first stand up. It is most important for the foal to suckle as soon as possible.
We began the research with the measurement of the parturition circumstances in the "A" and the "B" studs throughout a four year period spanning 2009 - 2012. We collected data of newborn foals for (1) duration of birth to "stand up", (2) birth to nursing, and (3) birth to "passing of meconium". The data comparison revealed that the "A" stud foals stood up much sooner than the "B" stud foals. Consequently, that affected the duration of birth to nursing and first colostrum, as well as the duration of birth to "passing of meconium".
Keywords: neonatal foals, vital functions, evaluation

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A tenyészkanca tartása akkor válik gazdaságossá, ha minden évben ellik egy egészséges csikót. Az újszülött egészséges növekedése szoros kapcsolatban áll születésének lefolyásával és élete első napjainak körülményeivel (*Agócs,* 2005). A kedvező anatómiai viszonyok miatt a kanca viszonylag könnyen ellik, de az esetleges komplikációk miatt a közeljövőben ellő állatot folyamatos megfigyelés alatt kell tartani (*Szenci,* 1979).

Az újszülött csikó vitalitását nagyban befolyásolja az, hogy mikor történik az első felállási kísérlet, mikor jelentkezik először a szopási reflex, mikor leli meg a csecseket a csikó, és ha megtalálta, a kanca engedi-e szopni. Főként előhasi kancáknál lehet probléma, hogy csiklandósak, nem fogadják el az újszülöttet vagy épp ellenkezőleg flegmák, nem segítik a csikót (*Egri*, szóbeli közlés). Az ellést követően nagyon fontos, hogy a szopás időben megtörténjen (*Rásky,* 2005), ugyanis a kolosztrumban levő immunanyagok akkor hasznosulnak igazán, ha a csikó a születést követő 2 órán belül hozzájut a föcstejhez (*Horváth és mtsai*, 2005; *Rásky,* 2006; *Vincze és mtsai,* 2010), ami amellett, hogy a passzív immunitás kialakításában elsőrendű szerepet játszik, laxáns anyagokat is tartalmaz, amelyek a bélszurok eltávozását segítik elő. Ha a bélszurok nem távozik a születést követő 6-24. órában, akkor ún. „bélszurok-kólika" alakulhat ki (*Bucsy,* 1998; *Szilvássy,* 2007).

Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz szükséges információkat két magántulajdonú ménestől gyűjtöttük. A vizsgálatokat az ellések körülményeinek felmérésével kezdtük. A fedeztetési napló alapján a született csikók származását nyomon követhettük. Összegyűjtöttük a 2009-2012 évekbeli ellések lefolyásának körülményeit, a felállás, a csecsek megtalálásának, illetve a bélszurok távozásának időpontjait (összesen 109 egyednél). Az „A" gazdaságban az állomány felét hidegvérű, felét melegvérű lovak alkották, a „B" ménes kizárólag melegvérű fajtákat tenyésztett.

„A" ménes: Létszáma: 111 ló. A telep önellátó, 200-300 hektár rét, legelő és 20-30 hektár szántó állt rendelkezésre. A kancákat az év nagy részében a legelőn tartották. A kancák és csikóik október 1-től május 1-ig kaptak abrakot. A lucernaterületeket csak kétszer kaszálták, és ott is legeltettek, így a magas fehérjetartalom közvetlenül hasznosult. A kancák és csikóik 1 hónapon keresztül akkor kaptak vitamin-kiegészítést, amikor a csikó 3 hónapos lett. Később negyedévente 7-10 napos ciklusonként adagolták a vitamin-kiegészítést (FORAN-Chevinal Plus). 5 kg-os tömbökben a legelőre kihelyezett, szelén tartalmú nyalósó ad libitum állt a lovak rendelkezésére. Kizárólag természetes fedeztetést alkalmaztak. A csikók leválasztása november végén történt.

„B" ménes: Létszáma: 21 ló. A gazdaság 40 hektárnyi legelőt és 20 hektárnyi szántót birtokolt. A téli időszakban a kancák és csikók futóistállókban, részben lekötve töltötték éjszakáikat, nappal karámokban helyezték el őket. A melegebb időszakokban éjjel-nappal legelőn voltak. A kancák egész évben napi két alkalommal kapták a roppantott zab és tritikálé 50-50% arányú keverékét. A csikók csak zabot kaptak. Külön vitamin-kiegészítés nem volt, mert az ásványi anyagokat és nyomelemeket tartalmazó nyalósót (PÁKER) elegendőnek tartották. A telepen kizárólag mesterséges termékenyítést alkalmaztak. A választás csak 7-8 hónapos korban (december-januárban) történt.

Az eredmények matematikai feldolgozása során IBM SPSS Statistics Programot használtunk.

Eredmények és értékelésük

A négy év alatt a két ménesben összesen a várt csikók száma 121 volt, ebből 109 egyed jött komplikációmentesen a világra és 104 egyed érte el a választás korát. Vizsgálataink során a csikók első felállásának, első szopásának és a bélszurok távozásának időpontjait hasonlítottuk össze a két ménesben.

Az első felállás: „A" ménesben a csikók 62%-a állt lábra a születést követő 20 percben, és egy órán belül egy (születési rendellenességgel világrajött) állat kivételével mindnek sikerült felállnia. „B" ménesben az újszülöttek valamivel később állnak fel, 74%-uk 21-60 percen belül. A többieknek 1-2 óra volt szükséges a lábraálláshoz. Itt 20 percen belül egy csikó sem állt fel. Az összesítést szemlélve azt tapasztalhatjuk, hogy a csikók közel fele 20 percen belül feláll, 94%-uk pedig 1 órán belül (ld. 1. ábra).

1. ábra: **Csikók első felállási ideje (2009-2012) (n=109)**

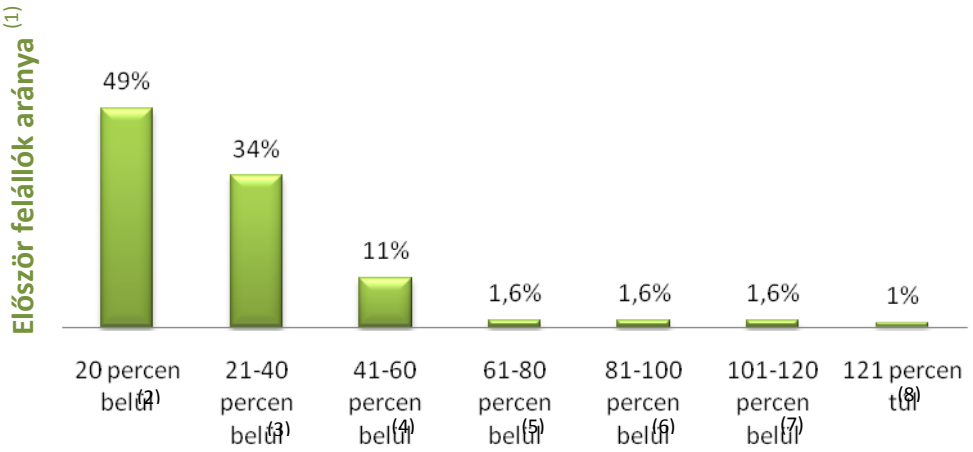


Fig. 1. The data of the first standing up (2009-2012) (n=109)
(1) The rate of the first stand up, (2) within 20 minutes, (3) between 21 and 40 minutes, (4) between 41 and 60 minutes, (5) between 61 and 80 minutes, (6) between 81 and 100 minutes, (7) between 101 and 120 minutes, (8) over than 121 minutes

Az első szopás: A csecsek megtalálása és az első szopás időpontja szoros összefüggésben áll a felállás időpontjával, de fontos szerepet játszik a kanca hozzáállása, valamint a csikó „leleményessége" is. „A" ménesben másfél óra leforgása alatt az összes csikó az éltető föcstejhez jutott, kivéve a „lábproblémával" született egyedet (aki csak 5 és fél órával később találta meg a csecseket), illetve egy hidegvérű újszülöttet, melyet anyja nem engedett magához (a csikó szopott volna). „B" ménesben a csikók 26%-a jutott a föcstejhez egy órán belül, a többség (61%) a születés utáni 80-120 perces időintervallumban tudott szopni, 13%-nak pedig még több idő, két és fél óra kellett ahhoz, hogy szervezetükbe juthassanak a kolosztrum immunanyagai. Az összesítés (ld. 2. ábra) eredményei szerint a csikók 53%-ának 40 perc kellett, hogy megtalálja a csecseket, és összesen 80%-uk tudott szopni egy órán belül.

2. ábra: **Csikók első szopásának ideje az ellést követően (2009-2012) (n=108)**

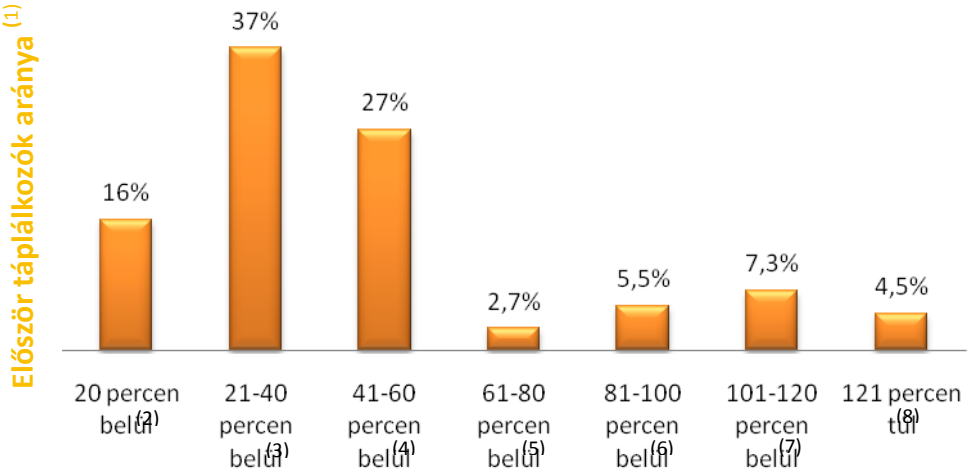


Fig. 2. The data of the first suckling (2009-2012) (n=108)
(1) The rate of the first suckling; (2) within 20 minutes, (3) between 21 and 40 minutes, (4) between 41 and 60 minutes, (5) between 61 and 80 minutes, (6) between 81 and 100 minutes, (7) between 101 and 120 minutes, (8) over than 121 minutes

A bélszurok távozása: Szoros pozitív (Pearson) korreláció (r=0,938) volt megfigyelhető a szopás és a magzatszurok távozásának időpontjai között. A várakozásoknak megfelelően „A" ménesben a csikók nagy része, 93%-a 1,5 órán belül ürítette a bélszurkot. „B" ménesben 2 órán belül a csikók mindössze 30%-a ürített a meconiumot, a többieknek 3-4 órára volt általában szükségük, 6 esetben beöntést is kellett végezni, valamint több alkalommal szájon át is adagoltak nekik paraffinolajat.

Az összesítés (*3. ábra*) alapján elmondható, hogy a csikók 58%-a tudta egy óra leforgása alatt üríteni a meconiumot, és további 23%-uk szabadult meg két órán belül a magzatszuroktól. Az újszülöttek 19%-ban csak több, mint két órán túl, és sok esetben segítséggel voltak csak képesek üríteni.

IBM SPSS Statistics Programmal kimutattuk, hogy összességében a csikók átlagosan 31± 31 percen belül álltak fel, átlagosan 53±45 perccel a születést követően jutottak a föcstejhez, és átlagosan az ellést követő 93± 96. percben ürítették a meconiumot.

3. ábra: **Csikók meconium-ürítésének ideje (2009-2012) (n=107)**

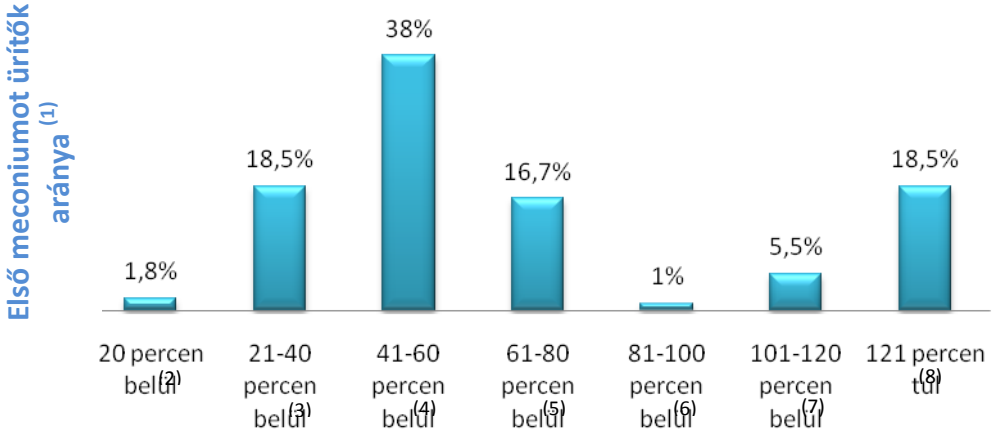


Fig. 3. The data of the „passing of meconium" (2009-2012) (n=107)
(1) The rate of the „passing of meconium", (2) within 20 minutes, (3) between 21 and 40 minutes, (4) between 41 and 60 minutes, (5) between 61 and 80 minutes, (6) between 81 and 100 minutes, (7) between 101 and 120 minutes, (8) over than 121 minutes

Amikor a két ménes 4 éves adatait hasonlítottuk össze, akkor azt tapasztaltuk, hogy „A" ménesben átlagosan 23 perc kellett a felálláshoz, 41 perc a szopáshoz, és 62 perc a bélszurok eltávozásához. „B" ménesben átlagosan 57 perc kellett a felálláshoz, 98 perc a szopáshoz és 210 perc a meconium ürítéséhez (*1. táblázat*).

1. táblázat: **Az első felállás, az első szopás és a bélszurok távozásának ideje (percben) (2009-2012)**

		Első felállás ideje (1)	Föcstej felvételének ideje (2)	Bélszurok távozásának ideje (3)
„A" ménes (4)	**Átlag** (7)	23,47	41,24	62,47
	n (8)	86	85	85
	Szórás (9)	28,345	40,472	50,182
„B" ménes (5)	**Átlag** (7)	57,39	98,04	210,00
	n (8)	23	23	22
	Szórás (9)	27,464	33,701	136,696
Összesen (6)	**Átlag** (7)	30,62	53,33	92,80
	n (8)	109	108	107
	Szórás (9)	31,295	45,447	96,364

Table 1. The duration of birth to first
"stand up" (1), birth to first suckling (2) and birth to "passing of meconium"(3) (in minutes) (2009-2012); (4) „A" stud, (5) „B" stud, (6) Total, (7) Mean, (8) Number, (9) Std. Deviation

A program segítségével kimutattuk azt is, hogy a felállás, az első szopás és a meconium távozásának időpontjai között szoros pozitív korreláció figyelhető meg. A felállás és a szopás időpontja között a korrelációs koefficiens 0,83; a felállás és a bélszurok távozásának ideje között 0,77; míg a szopás és a bélszurok távozása között az együttható értéke szinte igen szoros összefüggést mutatott, 0,89 volt (2. táblázat).

2. táblázat: **Összefüggések az első felállás, az első szopás és bélszurok távozásának időpontjai között (2009-2012)**

		Felállás (1)	**Szopás** (2)	**Bélszurok** (3)
Felállás (1)	Korrelációs koefficiens (4)	1,000	,829(**)	,770(**)
	n (5)	109	108	107
Szopás (2)	Korrelációs koefficiens (4)	,829(**)	1,000	,885(**)
	n (5)	108	108	107
Bélszurok (3)	Korrelációs koefficiens (4)	,770(**)	,885(**)	1,000
	n (5)	107	107	107

Table 2. Statistical contexts between the date of the first standing up (1), the fisrt suckling (2) and the „passing of meconium" (3) (2009-2012), (4) Correlation Coefficcient, (5) Number

Vizsgálataink ideje alatt a várt csikók 90%-a szövődmények nélkül született meg, majd 86%-a elérte a választási kort is.

Következtetések, javaslatok

Minden esetben, de előhasi kancáknál fokozottan ajánlatos ellenőrizni a született csikó kondícióját, ugyanis ezen kancák tejénél előfordul, hogy nem tartalmaznak elég immunanyagot, vagy maga a tej nem megfelelő mennyiségű (2009, „A" ménes). A csikó sokat szopik, de mégsem kerül a szervezetébe elegendő immunanyag, kondíciója sem lesz optimális. Tesztek segítségével megállapítható a csikó vérének immunglobulin-tartalma (*Egri és László,* 1991). Hiánytünetek (gyenge immunstátusz vagy mínuszkondíció) esetén azonnal meg kell kezdeni a csikó immunglobulinokkal történő ellátását, illetve kiegészítő táplálását.

Megfigyeléseink szerint a „B" ménes csikói viszonylag későn állnak fel. Míg „A" ménesben az életképes csikók nagyobb része az ellést követően egy órán belül felállt (mindössze egy egyed, s az is végtagjainak veleszületett rendellenessége miatt volt képtelen erre), addig „B" ménesben a csikók 78%-a tudott egy órán belül lábra állni. Mindezek következményeképpen nagyobb lehetőség van a nem megfelelő mértékű immunitás megszerzésére, valamint a bélszurok-kólika kialakulására. További vizsgálataink (IBM SPSS Statistics Program) ugyanis kimutatták, hogy a felállás, az első szopás és a meconium távozásának időpontjai között szoros pozitív korreláció figyelhető meg. A felállás és a szopás időpontja között a korrelációs koefficiens 0,859; a felállás és a bélszurok távozásának ideje között 0,792; míg a szopás és a bélszurok távozása között az együttható értéke 0,938 volt.

Irodalomjegyzék

Agócs, M. (2005): Az ellés megkezdődik. Lovas Nemzet. 11. 2. 20-21.
Agócs, M. (2005): Felkészülés az ellésre. Lovas Nemzet. 11. 2. 18-20.
Bucsy, L. (1998): Lótenyésztők kézikönyve. Mezőgazda kiadó, Budapest.
Egri, B., László, I. (1991): Újszülött és szopós csikók immunglobulin-ellátottságának ellenőrzéséről. Phylaxia Állatorvosi Közlemények. 1991. 27. 18-22.
Fekete, S. (2004. 11. 05.): A tenyészkanca és a szopós csikó korszerű takarmányozása. XII. Lógyógyászati Kongresszus. Üllő, Nagyállat Klinika.
Filipsz, I. (2002): Hogyan gondoskodhatunk csikóinkról? Nemzetközi Lovas Magazin. 4. 7. 44-46.
Filipsz, I. (2003): Csikó születik. Nemzetközi Lovas Magazin. 5. 4. 50-53.
Horváth, D., Horváth, A., Kutasi, O., Bakos, Z., Szenci, O. (2005): Az újszülött csikók immunglobulin-ellátottságának gyakorlati vonatkozásai. Magyar Állatorvosok Lapja. 127. 1. 3-11.
Horváth, Z., Fodor, L., Rusvai, M., Farkas, R. (2003): Lóbetegségek. Mezőgazda kiadó, Budapest.
Koterba, A. M. (1987): Proc. 9th Bain-Fallon Memorial Lectures: The Mare & the Foal (P. Huntington, ed.). Australian Equine Veterinary Association, Arterman, NSW. Australia. 131.
Papp, E. Zs. (2009): A kanca kolosztrum összetételének változása és előrejelző szerepe a várható ellés időpontjával kapcsolatban. Szakdolgozat. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika.
Rásky, P. (2005): Nagyító alatt a szoptató kanca tejtermelése és takarmányozása. Lovasélet. 6. 3. 28-29.
Rásky, P. (2006): Csikó születik. Az újszülött csikó táplálása. Lovasélet. 7. 4. 44-46.
Szenci, O. (1979): Csikó születik. Mezőgazdasági kiadó, Budapest.
Szenci, O. (2004. 11. 05.): Az újszülött csikó ellátásának gyakorlati vonatkozásai. XII. Lógyógyászati Kongresszus. Üllő, Nagyállat Klinika.
Szilvássy, L. (2007): Ha a csikó megszületett, avagy az újszülöttkori betegségekről. Pegazus. 3. 4. 54-56.
Vincze, B., Horváth, D., Kulik, M., Ritter, D., Szenci, O. (2010): Az újszülött csikó immunglobulin-ellátottságának és a kolosztrum minőségének ellenőrzése gyakorlati körülmények között. Magyar Állatorvosok Lapja. 132. 9. 507-515.

ÜGETŐ ÉS GALOPP LOVAK SZEMÉLYISÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Maros Katalin, Gidró Noémi, Nagy Viktória, Varga Áron, Veres Éva, Tőzsér János

SZIE MKK Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
maros.katalin@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A személyiség a lovak használhatóságának egyik igen jelentős tényezője. Kialakulásában a genetikai adottságokon túl az egyedi tapasztalatok (tanulás) is fontos szerepet játszanak. A személyiségi jellemzők vizsgálatának több módja is ismeretes. Egyrészt vannak standard viselkedési tesztek, melyek segítségével az egyedek adott szituációkban (pl. szociális izoláció, ismeretlen tárgy felbukkanása, stb.) mutatott reakcióit lehet vizsgálni. Az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy a lovak viselkedése ezekben a helyzetekben hosszú távon is stabil, ami a személyiség vizsgálatok egyik fontos követelménye. A másik gyakran alkalmazott módszer a kérdőíves felmérés, melynek révén a lovakkal napi szinten foglalkozó szakemberek szisztematikus kikérdezése zajlik.
Jelen munkánkban 40 db angol telivér és 50 db ügető fajtájú ló személyiségét vizsgáltuk meg kérdőíves felmérés segítségével. Vizsgálatainkban, a szakirodalomban már validált Ló Személyiségi Kérdőívet (HPQ: Horse Pesonality Questionnire, Lloyd és mtsa.-i, 2007) alkalmaztuk. Az elemzések során (főkomponens analízis) kapott személyiség komponensek a teljes variancia 66%-át magyarázták meg.
Kulcsszó: személyiség, ügető ló, galopp ló

PERSONALITY ASSESSMENT IN TROTTER AND RACE HORSES

Abstract

Personality is a very important aspect of the utility in horses. Genetic effects are involved in determining personality but individual experiences (learning) also have a significant impact on it. There are different methods to measure the personality of a given individual. Standard behavioural tests were developed that help to investigate the horse's reactions in a given situation (e.g. social isolation, appearance of a novel object). It is proved that individuals behave in a very similar way when tests are repeated. This phenomenon is also an important requirement when we credit a behavioural feature as a personality trait. Questionnaire based surveys are also frequently applied in personality studies. In this case horse specialists are interviewed about the individuals.
In this study we analysed the personality traits of 40 thoroughbred and 50 trotter horses with the help of a questionnaire. We used the so-called Horse Personality Questionnaire t (HPQ: Horse Personality Questionnaire, Lloyd et al., 2007). Principal Component Analysis was carried out on the data. The personality components explained 66% of the total variance.
Keywords: personality, trotter, thoroughbred

Bevezetés

Az etológiai kutatásokban, az utóbbi években egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a személyiség vizsgálatok. A személyiség jegyek kialakulásának hátterében álló mechanizmusok megértése különösen fontos lehet olyan állatok esetében (pl. a kutyák vagy a lovak) melyekkel gazdáik napi szinten foglalkoznak, akár hobby célból tartják azokat, akár versenyeznek velük.

A lovak értékét általában olyan jól mérhető tulajdonságaik alapján ítélik meg, mint fizikai karakterük és/vagy a teljesítményük. Pszichés tulajdonságaik kevésbé mérhetők objektív módon, személyiségük jellemzői általában szubjektív megítélés alá esnek. A lovakkal foglalkozó szakemberek ugyanakkor jól tudják, hogy milyen nagy viselkedésbeli különbségek vannak az egyedek között, ami használhatóságuk egyik igen fontos tényezője.

A lovak személyiségének alakulását alapvetően a veleszületett tulajdonságok és az élet során szerzett egyéni tapasztalatok (tanulás) befolyásolják. A vérmérséklet/temperamentum az egyedek genetikai adottságain alapul. A személyiség öröklött vonásait minél fiatalabb korban érdemes vizsgálni (*Wolff és mtsai*, 1997; *Lansade és mtsai*, 2008), hiszen az élet előre-haladtával a tapasztalatok egyre jobban megváltoztatják egy ló személyiségét. A genetikai háttér jelentőségét bizonyítja az is, hogy hasonló tartásmód mellett is gyakran jellemző módon eltér a különböző fajtájú lovak viselkedése. Például: az arab telivért általában igen reaktív, játékos, kíváncsi és gyorsan tanuló fajtának tartják, míg a Quarter lovakat nyugodt, engedelmes, türelmes, könnyen és gyorsan tanuló fajtaként jellemzik. Ezzel szemben az angol telivéreket aggódónak, izgatottnak, ingerlékenynek találták a kutatók. A telivérek e tulajdonságait azonban egyesek kifejezetten kedvezőnek ítélik a galopp versenyzés szempontjából, mivel ezek a jellemzők szoros kapcsolatban állhatnak olyan tulajdonságokkal is, mint a robbanékonyság vagy a kitartó futásra való hajlam (*Lloyd és mtsai*, 2008). Még mielőtt pálcát törnénk egy-egy fajta felett, fontos leszögezni, hogy van egy másik dolog is, ami a személyiséget befolyásolja, sőt alapvetően megváltoztathatja. Ez pedig a tanulás.

A veleszületett adottságokon túl az egyedet az élete során számos olyan környezeti hatás is éri, ami az alapjellemét nagymértékben módosíthatja. Ezek közül az egyik legfontosabb a kiképzés módja és a használat. A lovak használatának személyiségükre gyakorolt hatását igazolta például az a 700 egyedet érintő francia vizsgálat, melyben azt tapasztalták, hogy a díjlovak lényegesen erősebb emocionális reakciókat mutatnak a különböző viselkedési tesztekben, mint más sportlovak vagy az iskolalovak. Például izgatottabban viselkednek (többet ügetnek, horkantanak és trágyáznak) ha elválasztják őket a többi lótól, mint az iskolalovak vagy a díjugrató lovak; és gyakrabban jelennek meg náluk olyan abnormális viselkedésformák, mint pl. az istállójárás vagy a karórágás/levegőnyelés (*Hausberger és mtsai*, 2004). Ugyanezen tanulmány egyik legmeglepőbb tanulsága az volt, amikor kiderült, hogy az azonos módon tartott tenyészmének viselkedését milyen nagymértékben tudja befolyásolni az, hogy hogyan bánnak velük a mindennapok során. Összesen 9 tenyésztelep bevonásával hasonlítottak össze arab és francia hátas méneket. Mindegyik telepen hasonló módon tartották a tenyészállatokat és tartottak mindkét fajtából lovakat. Az arab lovak mindenhol reaktívabbak/félősebbek voltak, mint a francia hátasok, azonban ez a megállapítás csak a telepen belüli összehasonlításkor volt érvényes. A különböző telepek között igen nagy különbségek mutatkoztak az egyedek viselkedését illetően. Voltak helyek, ahol az állatok általában véve sokkal szelídebbek, és kezelhetőbbek voltak. Azaz egyes telepeken az arab mének jóval szelídebbnek, kezelhetőbbnek bizonyultak, mint a vérmérsékletét tekintve ugyan szelídebbnek kikiáltott, de más telepeken élő és – feltehetően - máshogy kezelt francia hátas fajtársaik.

A lovak személyiségét különböző viselkedési tesztekkel és/vagy kérdőívek segítségével szokás vizsgálni. A viselkedési tesztekkel olyan tulajdonságokat lehet mérni, mint pl.: a szociális függőség, amit az egyed társaitól való elválasztásakor mutatott reakciója jellemez. Az idegesség/félősség egy másik jellemző tulajdonság, amely megmutatja, hogy az állat hogyan reagál számára idegen, hirtelen felbukkanó, mozgó tárgyakra. A tanulékonyságot, mint jellemző személyiségvonást főként valamiféle új feladat teljesítése alapján lehet felmérni (*Hausberger és mtsai*, 2004).

A kérdőíves felmérés az állati személyiség kutatásának egy másik jól bevált módszere (pl. kutya: *Mirkó és mtsai*, 2012; ló: *Momozawa és mtsai*, 2003). Ilyenkor a kérdőívek kitöltésére a vizsgálatban szereplő egyedeket jól ismerő, velük napi szinten foglalkozó gazdákat/trénereket kérik fel.

Jelen vizsgálatunkban aktívan versenyző galopp és ügetőlovak trénereit kérdeztük ki az általuk ismert lovakkal kapcsolatosan, melynek során a lovak személyiség vizsgálatára kidolgozott Ló Személyiség Kérdőívet (Horse Personality Questionnaire, *Lloyd és mtsai*, 2007) használtuk fel. A kérdőíves felmérés egy – jelenleg is zajló - átfogóbb kutatás része, melyben arra vagyunk kíváncsiak, hogy az általunk vizsgált állomány lovainak személyisége hogyan jellemezhető, és az adott lovak személyisége mennyiben hozható összefüggésbe a teljesítményükkel.

Anyag és módszer

2013 tavaszán és nyarán összesen 90 db. aktívan versenyző lóról (50 ügető és 40 galopp egyed) gyűjtöttünk adatokat a kérdőíves felmérés során. A vizsgált egyedek a Kincsem Parkban és a Dunakeszi-alagi tréningközpontban egyedileg, bokszos tartásban voltak elhelyezve. A lovakat ezen felül naponta egyedileg karámozták, illetve a heti pihenőnapot kivéve, napi rendszerességgel edzették.

A vizsgálatban egy 4 oldalas kérdőívet használtunk, melyben a lovak alapadatain (pl. koruk, nemük) túl a tartásukkal, takarmányozásukkal, edzésükkel, egészségügyi állapotukkal kapcsolatban tettünk fel kérdéseket. A kérdések egy másik részét a „Ló Személyiség Kérdőív" (*Lloyd és mtsai*, 2007) alapján összeállított személyiségjegyekre utaló kérdéssor tette ki. A tulajdonságok viselkedési definícióját a trénerekkel az értékelést megelőzően megbeszéltük, majd ezek után került sor az adott egyedek jellemzésére. Összesen 32 különböző tulajdonságra kérdezetünk rá (*1. táblázat*), melyeket egyenként egy 7 fokozatú skálán minősítettek a lovakkal foglalkozó trénerek (1-es érték: egyáltalán nem jellemző; 4-es érték: átlagosan jellemző; 7-es érték: maximálisan jellemző az adott egyedre).

1. táblázat: **A kérdőívben szereplő személyiség jegyek elnevezése és azok definíciója**

Agresszív lóval	bántja, vagy fenyegeti a többi lovat
Agresszív emberrel	bántja, vagy fenyegeti az embereket
Makacs	nem könnyű vele, akaratos, nem együttműködő
Alárendelt	könnyen megadja magát, behódol másoknak; nem harcol azért, hogy megvédje magát
Gondoskodó	kedves, szeretetteljes, gondoskodó másokkal szemben
Bizalmatlan	nehéz elnyerni a bizalmát, csak kevés lóban /emberben bízik meg

Intelligens	könnyen tanul új feladatokat
Élénk	eleven, mozgékony, nem szeret sokáig egy helyben maradni
Aggódó	tart mindentől, szorong, kerüli a bizonytalan helyzeteket
Kíváncsi	mindig készen állt az új helyzetek megismerésére
Félős	nehezebb helyzet esetén fél, meghátrál
Bizonytalan	egyedül tétovázik megtenni valamit, a többiek biztatására vár
Ingerlékeny	kis ingerlésre is hevesen és negatívan reagál
Magányos	sok időt tölt magába fordulva
Munkaszerető	szeret jól dolgozni; mindig koncentrál a feladatra, amit kérnek tőle
Védelmező	megvédi lovasát/fajtársát egy veszélyes, vagy annak tűnő helyzetben
Lassú	nyugodt, megfontolt, lassú, nehéz siettetni
Erőteljes	izmainak erejében, szilárdságában bízik
Domináns	maga útját járja, irányítja a többieket, vezető egyéniség
Játékos	kezdeményezi a játékot, hamar csatlakozik játszó társaihoz
Kiegyensúlyozott	mindig nyugodt marad; nehéz felzaklatni
Közkedvelt	keresik a társaságát
Bevállalós	gondolkozás nélkül teljesítene egy ismeretlen feladatot
Ijedős	hajlamos túlzott reakciókra, könnyen idegessé válik, átlagosnál feszültebb
Magabiztos	biztos fellépésű, nem visszahúzódó, kezdeményező
Kíváncsi	mindig készen áll az új helyzetek megismerésére
Megértő	mások viselkedésére különböző, de mindig megfelelő módon reagál
Feszült	testtartása és mozgása feszes, merev, ijedős, visszahúzódó
Megbízható	megbízhatóan viselkedik és dolgozik, biztonságos körülötte lenni
Türelmes	mások viselkedése nem bosszantja fel
Rendhagyó, fura viselkedésű	rossz szokások, sztereotípiák jelenléte (pl. szitálás, nyelvöltögetés, levegőnyelés stb), szokatlanul viselkedik, vagy túlzásba visz valamit
Társaságkedvelő	szeret a többiek társaságában lenni/nehéz elvezetni a csapattól

A kapott adatokat főkomponens analízis segítségével értékeltük ki (SPSS programcsomag). A faktorok forgatását az ún. Varimax módszerrel végeztük.

Eredmények

A főkomponens analízis eredményének alapján azokat a faktorokat vettük figyelembe, melyek sajátértéke meghaladta az 1-et. Összesen 6 ilyen faktort találtunk, melyek összesen a variancia 66%-át magyarázták meg (2. Táblázat). Kiemeltük azokat a kategóriákat, melyek legalább 0,5-ös faktorsúllyal szerepeltek az adott faktorban. A faktorsúlyok nagyságrendje és előjele alapján megítélhető az, hogy az egyes faktorok kialakításában mely tulajdonságok kapnak alapvető szerepet.

***2. táblázat*: A főkomponens analízis alapján kapott faktorok struktúrája, a sajátértékek és a kumulatív variancia %-a**

VISELKEDÉSI TULAJDONSÁG	1-es faktor MEGBÍZHATÓSÁG	2-es faktor FÉLŐSSÉG	3-as faktor DOMINANCIA	4-es faktor TÁRSAS HAJLAM	5-ös faktor KÖZKEDVELTSÉG	6-os faktor ÉLÉNKSÉG
Türelmes	**,795**	-,125	-,058	,037	,249	-,105
Megértő	**,693**	-,261	,304	,182	,154	-,011
Megbízható	**,657**	-,159	,302	-,052	,163	,170
Gondoskodó	**,633**	-,293	-,045	,336	,381	,046
Kiegyensúlyozott	**,552**	**-,575**	,306	,210	-,007	,083
Intelligens	**,513**	-,382	,293	,318	-,051	,110
Feszült	**-,519**	,468	-,175	-,076	-,142	-,017
Agresszív emberrel	**-,541**	,271	,114	-,211	-,450	,241
Makacs	**-,713**	,324	-,084	-,155	-,190	,074
Aggódó	-,226	**,812**	-,080	,052	,042	,090
Ijedős	-,213	**,729**	-,390	-,092	-,076	,058
Félős	-,109	**,695**	-,369	,059	-,259	-,172
Bizonytalan	-,413	**,632**	-,377	,025	,002	-,123
Bizalmatlan	-,238	**,572**	-,163	-,258	-,309	-,185
Ingerlékeny	-,445	**,548**	,054	-,374	-,227	-,041
Rendhagyó, fura viselkedésű	-,293	**,524**	,384	-,155	-,174	,104
Magabiztos	,178	-,354	**,709**	,227	-,114	-,052
Erőteljes	,398	-,102	**,697**	-,127	,000	,169
Domináns	-,166	,033	**,650**	-,193	,160	,335
Játékos	-,086	-,226	**,634**	,342	,260	-,096
Bevállalós	,144	-,423	**,621**	,047	,217	,084
Munkaszerető	,280	-,166	**,606**	,099	,162	,166
Kíváncsi	,279	,006	,157	**,679**	,018	,027
Társaságkedvelő	,204	,101	,175	**,650**	,472	-,128
Magányos	,026	,255	,219	**-,694**	-,044	-,204
Alárendelt	,210	-,009	,118	,039	**,689**	,046
Védelmező	,409	-,232	,102	-,015	**,584**	,169
Közkedvelt	,192	-,235	,255	,368	**,546**	-,115
Élénk	-,022	,187	,383	,465	,009	**,648**
Lassú	-,081	,187	-,133	-,078	-,051	**-,781**
Agresszív lóval	-,484	,127	,025	-,359	-,105	,491
SAJÁTÉRTÉK	**5,13**	**4,71**	**3,96**	**2,70**	**2,30**	**1,79**
KUMULATÍV VARIANCIA %-a	**16,56**	**31,75**	**44,52**	**53,23**	**60,66**	**66,44**

A kapott faktorok csak részben mutatnak egyezést *Lloyd és mtsai* (2007) eredményeivel. Például a FÉLŐSSÉG, ami alapvetően az egyed bizonytalanságát, bizalmatlanságát tükrözi egy-egy adott helyzetben, mindkét vizsgálatban az egyik legmeghatározóbb személyiség jegy volt.

Ugyanakkor pl. az általunk MEGBÍZHATÓSÁG-nak nevezett faktor, a másik vizsgálatban ilyen formában nem szerepelt. Ez a tulajdonság sokkal inkább a lovak használhatóságára utalhat, a trénerek lovakkal szembeni elvárásait (türelmes, megbízható, stb.) tükrözheti. Eltérő értelmezést kaphat egy versenylóval kapcsolatosan, mint például egy hobby ló esetében.

Eldöntendő kérdés maradt, hogy ezek a személyiségjegyek mennyiben tükrözik a lovak személyiségét, vagy éppen a trénerek lovaikkal kapcsolatos elvárásait. A továbbiakban egyedi szintű elemzésekkel szeretnénk a lovakat megvizsgálni. Viselkedési tesztek elvégzését tervezzük

(új tárgy teszt, személy teszt) és megpróbálunk összefüggéseket keresni adott egyedek és azok versenyben elért teljesítménye között is.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

Hausberger, M., Bruderer, C., Le Scolan, N., Pierre, J.S. (2004): Interplay Between Environmental and Genetic Factors in Temperament/Personality Traits in Horses (*Equus caballus*) Journal of Comparative Psychology, 118. 434–446.

Lansade, L., Bouissou, M.F., Erhard, H.W. (2008): Ferafulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. Applied Animal Behaviour Science, 115. 182-200.

Lloyd, A.S., Martin, J.E.., Bornett-Gauci, H.L.I., Wilkinson, R.G. (2007): Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behaviour. Applied Animal. Behaviour Science, 105. 205–222.

Lloyd, A.S., Martin, J.E., Bornett-Gauci, H.L.I., Wilkinson, R.G. (2008): Horse personality variation between breeds Applied Animal Behaviour Science, 112. 369-383.

Mirkó, E., Kubinyi, E., Gácsi, M., Miklósi, Á. (2012): Preliminary analysis of an adjective-based dog personality questionnaire developed to measure some aspects of personality in the domestic dog (*Canis familiaris*). Applied. Animal. Behaviour Science, 138. 88–98.

Momozawa, Y., Ono, T., Sato, F., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Kusunose, R. (2003): Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. Applied. Animal. Behaviour Science, 84. 127–138.

Wolff, A., Hausberger, M., Le Scolan, N. (1997): Experimental tests to assess emotonality in horses. Behavioural Processes, 40. 209-221.

HAZAI ADATOK A VÖRÖS RÓKA *(VULPES VULPES)* ÉLŐHELYVÁLASZTÁSÁHOZ

Márton Mihály[1], Szentkirályi Petra[1], Horváth Zsuzsanna[1], Markolt Ferenc[1], Szabó László[1], Kozák Lajos[2] és Heltai Miklós[1]

[1]Szent István Egyetem, Vadvilág Megőrzési Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
[2]Debreceni Egyetem, Természetvédelmi, Állattani és Vadgazdálkodási Tanszék
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
marton.mihaly1990@gmail.com

Összefoglalás

A vörös róka hazánk legtöbb életközösségének csúcsragadozója. Állománya folyamatosan növekszik, amely nemcsak a vadgazdálkodásban, és a természetvédelemben, hanem a humán- és állategészségügyben is feladatokat ad. A gazdálkodás alapja a faj biológiájának ismerete. Jelen tanulmányunkban ehhez hozzájárulva magyarországi vizsgálatok eredményei alapján ismertetjük a róka hazai élőhelyválasztását, a búvóhelyként használt lakott kotorékok elhelyezkedése alapján. A gyep, szántó élőhelytípust a börzsönyi és a bakonyi mintaterületen erős elkerülés jellemezte, valamint a Gödöllői-dombságban teljesen elkerülte a faj. A tűlevelű vegetációt tekintve két esetben mutatkozott statisztikailag igazolható teljes elkerülés (Börzsöny, Gödöllői-dombság). A lomblevelű erdőt közepes (Börzsöny, Erdőspuszta) és erős (Gödöllői-dombság) preferencia jellemezte.
Kulcsszavak: vörös róka, élőhely-preferencia, kotorék, Magyarország

Habitat preference data of red fox in Hungary

Abstract

Red fox is the top predator of most Hungarian natural communities. Its steadily growing population shows increasing tendency which is not to be ignored both by wildlife management, nature conservation and animal and human health authorities. In our study we describe the country-wide habitat selection of this species based on Hungarian studies. Red fox preferred deciduous vegetation, whereas it avoided pine forests and open fields. In order to have a more detailed knowledge of habitat preference, other habitat parameters should be examined in further studies.
Keywords: red fox, habitat preference, burrow, Hungary

Bevezetés

A vörös róka Európa legtöbb országában, így Magyarországon is általánosan elterjedt, közepes testű ragadozó (*Mitchell-Jones és mtsai,* 1999; *Heltai,* 2010). Magas állománysűrűségének alapját az élőhely- és táplálékválasztásában megjelenő kiváló

alkalmazkodóképessége jelenti (*Lanszki és mtsai,* 2006; *Heltai,* 2010; *Márton és mtsai,* 2013), amelyhez hozzáadódik a veszettség elleni immunizálás pozitív hatása is (*Vos,* 1995). Nem specializálódik egyetlen élőhelytípusra sem, kizárólag a magas vízállásos, illetve az árvízzel veszélyeztetett területeket kerüli, mert itt nem tudja kotorékát megásni (*Heltai,* 2010). A nagytestű ragadozók hiányában, hazánk legtöbb életközösségének csúcsragadozójává vált (*Heltai,* 2010). A faj állománynövekedésének következtében predációs és egyéb hatásai erőteljesebbé válhatnak (*Csányi,* 2007). A növekvő ragadozási nyomás negatív hatással lehet a róka számára alternatív táplálékforrást jelentő vadászható és védett fajok állományára (*Csányi,* 2007; *Heltai,* 2010), emellett a közvetített fertőzések miatt (*Sréter és mtsai,* 2003; *Takács és mtsai,* 2012), az állat- és humán egészségügy esetében is növekedhet a faj jelentősége. Mindezek alapján egy biológiailag megalapozott, valamint ökonómiailag ellenőrizhető ragadozógazdálkodás kidolgozása, mind a természetvédelem, mind a vadgazdálkodás számára releváns feladat, amelyhez ismerni kell a faj állománysűrűségét, reprodukciós képességét, valamint táplálkozási- és élőhelyválasztási szokásait (*Heltai,* 2010; *Márton és mtsai,* 2013).

Jelen tanulmányunkban dombvidéki (Bakony, Börzsöny, Gödöllői-dombság) és alföldi (Erdőspuszta) mintaterületeken végzett vizsgálatok eredményei alapján szeretnénk bemutatni a vörös róka hazai élőhelyválasztását.

Anyag és módszer

Vizsgálati területek

A Bakonyban vizsgált dombvidéki terület bekerített vadaskert Veszprém közelében *(1. ábra)*. A területen belül a domborzat jórészt tagolatlan. Átlagos völgysűrűsége 2,5-2,6 km/km². A terület talaját alacsony termékenységű váztalajok alkotják. Az alapkőzet mészkő és dolomit, melyet csak néhol borít vékonyan lösz. Az erdő főfafaja a csertölgy *(Quercus cerris)*. A területen található megközelítőleg 400 ha szántóföldet vadföldként hasznosítják, melyen főként lucernát *(Medicago sativa)* termesztenek.

A Börzsönyben vizsgált mintaterület a déli lejtőn Márianosztra közelében helyezkedik el. A magasan erdősült terület uralkodó fafajai a csertölgy és a kocsánytalan tölgy *(Quercus petraea)*, ezen kívül jelentős mennyiségben fordul elő benne gyertyán *(Carpinus betulus)* és erdei fenyő *(Pinus sylvestris)* is. A nyílt terület nagyobbik része mezőgazdasági művelés alatt áll (73,9 %), ennek megközelítőleg fele kaszáló, fele gabonatermő terület. A kisebbik rész magasfüves-bozótos (26,1 %).

Az Erdőspuszta nevű mintaterületünk Debrecen mellett található, természetvédelmi oltalom alatt áll, a Pannon életföldrajzi régió egyik tipikus élőhelyét, az erdőspusztai élőhelyet reprezentálja. Az erdő jellemző fafajai közé az erdei fenyő, az akác *(Robinia pseudoacacia)* és a kocsányos tölgy *(Quercus robur)* tartozik. A szántóterületeken zömmel kukoricát *(Zea mays)* termesztenek, de megtalálható a búza *(Triticum aestivum)*, a tritikálé *(x Triticosecale)* és a torma *(Armoracia rusticana)* is. A talaj, illetve az alapkőzet leginkább homok, emellett foltszerűen kötöttebb talajtípusok is megtalálhatók.

A Gödöllői-dombságban kijelölt mintaterületünk Isaszeg és Pécel között található. A dombvidéki terület alapkőzete lösz és diluviális homok üledék. A talajerózió mértéke jelentős; a felszín tipikusan száraz. A mezőgazdasági művelés alatt álló területek aránya meghatározó (69,5 %). Az erdőterületek többsége akácos (11,27%) és erdei fenyves (9,12%).

1. ábra: **Az egyes mintaterületek elhelyezkedése Magyarországon**

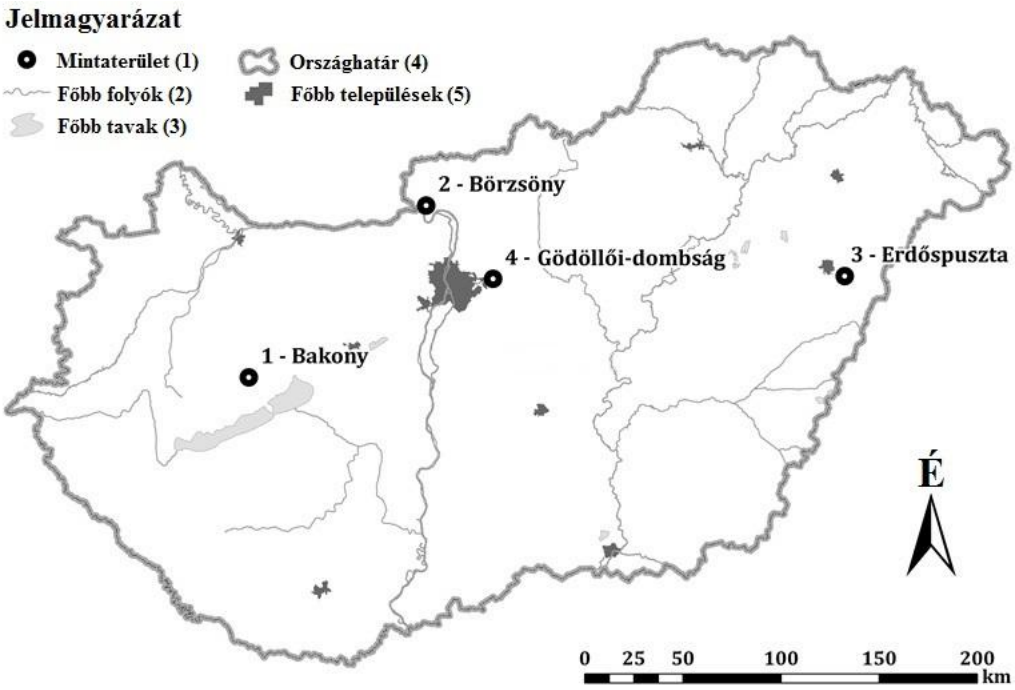


Figure 1: Locations of the study areas in Hungary
study areas (1), main rivers (2), main lakes (3), country border (4), main settlements (5)

Mintavételezés és adatfeldolgozás

A kotorékbecslés mind a négy vizsgálati területen szisztematikus módon kijelölt, egymástól 500 méterre lévő, párhuzamos, észak-dél tájolású sávos transzektekben történt. Ettől a börzsönyi mintavételezés annyiban tér el, hogy a fent említett becslés mellett a terület minden élőhelytípusát véletlenszerűen bejárva újabb kotorékokat kerestünk. Az adatgyűjtés során talált kotorékokról a faj közvetett jelei alapján (lábnyom, ürülék, szag) eldöntöttük, hogy lakottak-e vagy sem, valamint megállapítottuk, hogy a bentlakó faj róka vagy borz. Az egyes vonalszakaszok szélességét (azaz azt a távolságot, ahonnan az adott körülmények között egy kotorékot biztonsággal fel lehet fedezni) jobb- és baloldalon is folyamatosan feljegyeztük. A terepi munka elvégzése során az adatgyűjtéshez és értékeléshez *Heltai és Kozák* (2004), valamint *Heltai és Szemethy* (2010) által megadott módszereket használtuk fel.

A négy vizsgálati területen talált kotorékok pontos helyének meghatározása után, a preferencia értékeket az Ivlev formula (*Strauss,* 1979) alapján számítottuk ki: $P_x=(A-B)/(A+B)$ ahol A a faj kotorékainak aránya az adott élőhelytípusban, B az adott élőhelytípus aránya a területen, P_x az egyes élőhelytípusra eső preferencia vagy elkerülés értéke (+1 és -1 közé eső tartományban). A +1 a teljes preferenciát, a -1 a teljes elkerülést fejezi ki. Az élőhelytípusokat három nagyobb kategóriába vontuk össze (lomblevelű erdő; tűlevelű erdő: fenyő és fenyőelegyes erdő együtt; gyep és szántó együtt), mert egyes vegetációtípusok területe a vizsgálati terület teljes méretéhez viszonyítva nem volt megfelelő nagyságú, és ez a Chi^2-próba megbízhatóságát rontotta volna. Az összevonás után Chi^2-próbával vizsgáltuk, hogy a kotorékok eloszlása eltér-e az élőhelytípusok területi aránya alapján várttól. A preferencia értékek megbízhatóságát Bonferroni

Z-teszttel ellenőriztük (Z (3) = 2,40749; p < 0,05) (*Byers és Steinhorst*, 1984). Ezt követően a mintaterületeket a kotorékok élőhelytípusonkénti eloszlása alapján Chi^2-próbával hasonlítottuk össze. A statisztikai számítások során kizárólag a lakott kotorékokat vettük figyelembe.

Eredmények és értékelés

A kotorékok térbeli eloszlásán alapuló élőhelyválasztást vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy azok eloszlásai egy mintaterület kivételével (Bakony: χ^2 = 1,303; df = 2; p ≥ 0,05; n = 58) szignifikánsan eltérnek az élőhelyek területi arányából következően várttól. A róka a Börzsönyben (χ^2 = 13,357; df = 2; p < 0,005; n = 18), a Gödöllői-dombságban (χ^2 = 30,223; df = 2; p < 0,001; n = 7) és az erdőspusztai területen (χ^2 = 13,912; df = 2; p < 0,001; n = 12) kimutathatóan válogat a vegetációtípusok között. A további elemzések során e három mintaterülettel dolgoztunk. Ivlev-indexszel kiszámítottuk az összevont élőhelyi kategóriákra a preferencia értékeket. A fenyves és a gyep, szántó vegetációra mindhárom esetben elkerülést kaptunk. A lomblevelű erdő mindenhol preferáltnak mutatkozott *(2. ábra)*. A Bonferroni Z-teszt alapján a három élőhely kategóriára adott preferencia és elkerülés értékek a Börzsönyben és a Gödöllői-dombságban statisztikailag igazoltak, míg az erdőspusztai mintaterületen a tűlevelű vegetációra kimutatott elkerülés nem támasztható alá *(2. ábra)*.

2. ábra: **A vörös róka élőhelyválasztása a három összevont vegetációtípus alapján "*": p < 0,05; "NS.": p ≥ 0,05**

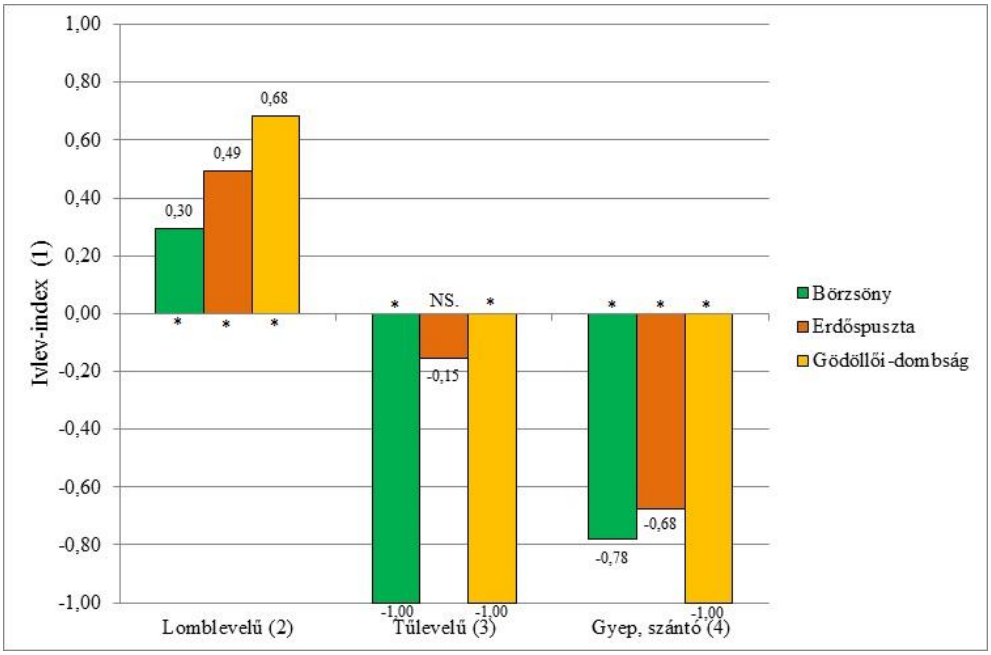


Figure 2: Habitat selection of the red fox based on the three merged vegetation types "": p < 0,05; "NS.": p ≥ 0,05*
Ivlev's selectivity index (1), deciduous (2), coniferous (3), grassland, cultivated land (4)

A mintaterületek kotorékeloszlásainak Chi^2-négyzet próbával történő összehasonlítása során egyik élőhelypáros között sem kaptunk szignifikáns különbséget (Börzsöny-Erdőspuszta: χ^2

= 5,250; df = 2; $p \geq 0,05$; n = 30; Börzsöny-Gödöllői-dombság: $\chi^2 = 0,405$; df = 1; $p \geq 0,05$; n = 25; Erdőspuszta-Gödöllői-dombság: $\chi^2 = 2,951$; df = 2; $p \geq 0,05$; n = 19).

Ezt követően a négy vizsgálati területen összességében feltárt lakott kotorékok vegetációtípusonkénti elhelyezkedése alapján adtuk meg a vörös róka összesített magyarországi élőhely-preferenciáját. A Chi^2-próba eredménye alátámasztja a faj országos szintű válogatását az összevont élőhely kategóriák esetében ($\chi^2 = 41,611$; df = 2; $p < 0,001$; n = 95). Pozitív Ivlev-index érték mutatkozik a lomblevelű vegetáció felé, míg a fenyvesek és a nyílt élőhelyeket tekintve elkerülés tapasztalható *(3. ábra)*. A Bonferroni Z-teszt a kapott eredményeket a lomblevelű erdő és a gyep, szántó vegetációtípusok esetében statisztikailag igazolja *(3. ábra)*.

3. *ábra:* A vörös róka magyarországi élőhelyválasztása

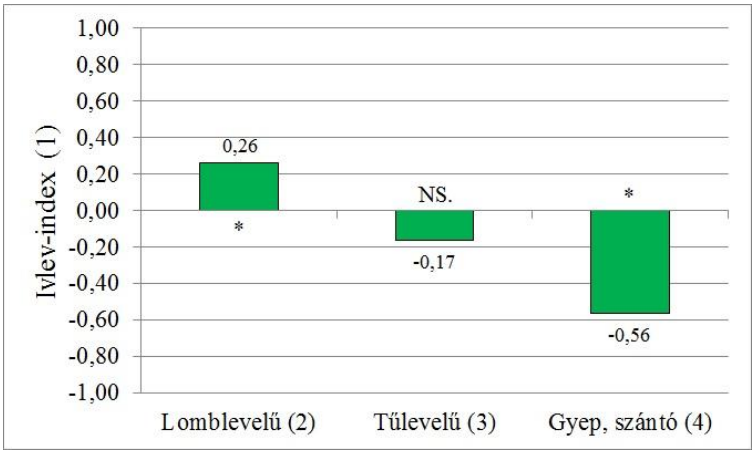


Figure 3: Habitat selection of the red fox in Hungary
Ivlev's selectivity index (1), deciduous (2), coniferous (3), grassland, cultivated land (4)

Következtetések és javaslatok

Négy vizsgálati területünk közül, három esetben volt kimutatható a róka válogatása a vegetáció típusok között. A gyep, szántó élőhelytípust két mintaterületen erős elkerülés jellemezte (Börzsöny: -0,78; Erdőspuszta: -0,68), valamint a Gödöllői-dombságban teljesen elkerülte (-1,00) a faj. A tűlevelű vegetációt tekintve kétszer mutatkozott statisztikailag igazolható teljes elkerülés (Börzsöny, Gödöllői-dombság), az erdőspusztai területen az Ivlev-index értéke gyenge elkerülést mutatott (-0,15), azonban ez az eredmény nem szignifikáns, így csak jelzés értékű. A lomblevelű erdőt közepes (Börzsöny: 0,30; Erdőspuszta: 0,49) és erős (Gödöllői-dombság: 0,68) preferencia jellemezte. A mintaterületek kotorékeloszlását összehasonlítva, különbség nem volt kimutatható, ez alapján elmondható, hogy a faj azokon a területeken, ahol válogat, mintaterületenként ugyanazokat a vegetációtípusokat kerüli el, illetve részesíti előnyben. Az országos szintű élőhely-preferencia a mintaterületekhez hasonló tendenciát mutat. Eredményeinket külföldi tanulmányokkal összehasonlítva változatos képet kapunk. A lomblevelű erdő preferált élőhelytípus Ausztráliában (*Phillips és Catling*, 1991), az Egyesült Államokban (*Major és Sherburne*, 1987) és Kanadában (*Jones és Theberge*, 1982). A fenyves vegetációt Olaszországban preferálta a faj (*Cavallini és Lovari*, 1991), míg az Egyesült Államokban elkerülte (*Major és Sherburne*, 1987). A nyílt területek felé preferencia mutatható ki Spanyolországban (*Fedriani és mtsai*, 1999) és Olaszországban (*Cavallini és Lovari*, 1991),

ellenben az Egyesült Államokban (*Gosselink és mtsai,* 2003) és Ausztráliában (*White és mtsai,* 2006) kerüli a faj ezt a vegetációtípust. Az eddigi vizsgálatok alapján összességében az a következtetés vonható le, hogy a vörös róka kotorékának helyét nem kizárólag a vegetáció típusa alapján választja ki. Fontosak lehetnek számára más élőhelyi paraméterek is, mint a genetikai talajtípus, illetve a táplálékforrás mennyisége és minősége (*Lanszki és mtsai,* 2006; *Heltai,* 2010).

A róka kiváló alkalmazkodóképessége miatt az élőhely-preferencia általános szintű. Részletes megismerése érdekében a további kutatásokat ki kell egészíteni talajtani, vízrajzi és a táplálékforrást érintő vizsgálatokkal.

Irodalomjegyzék

Byers C. L., Steinhorst R. K. (1984): Clarification of a technique for analysis of utilization-avability data. Journal of Wildlife Management, 48. 3. 1050-1053.

Cavallini P., Lovari S. (1991): Environmental factors influencing the use of habitat in the red fox, *Vulpes vulpes*. Journal of Zoology, 223. 323-339.

Csányi S. (szerk.)(2007): Vadbiológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 135.

Fedriani J. M., Palomares F., Delibes M. (1999): Niche relations among three sympatric Mediterranean carnivores. Oecologia, 121. 138-148.

Gosselink T. E., Van Deelen T. R., Warner R. E., Joselyn M. G. (2003): Temporal Habitat Partitioning and Spatial Use of Coyotes and Red Foxes in East-Central Illinois. The Journal of Wildlife Management, 67. 90-103.

Heltai M., Kozák L. (2004): A borz kotoréksűrűségének felmérése két alföldi területen. Vadbiológia, 11. 83-91.

Heltai M. (szerk.)(2010): Emlős ragadozók Magyarországon. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 240.

Heltai M., Szemethy L. (2010): A róka és a borz kotoréksűrűségének felmérése egy kijelölt területen. In: Szalkay Cs., Penksza K. (ed.): Természetvédelmi, környezetvédelmi és tájökológiai praktikum. Műszaki Könyvkiadó Kft., Budapest, 218.

Jones D. M., Theberge J. B. (1982): Summer home range and habitat utilisation of the red fox (*Vulpes vulpes*) in a tundra habitat, northwest British Columbia. Canadian Journal of Zoology, 60. 807-812.

Lanszki J., Heltai M., Szabó L. (2006): Feeding habits and trophic niche overlap between sympatric golden jackal (*Canis aureus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian ecoregion (Hungary). Canadian Journal of Zoology, 84. 1647-1656.

Major J. T., Sherburne J. A. (1987): Interspecific Relationships of Coyotes, Bobcats, and Red foxes in Western Maine. The Journal of Wildlife Management, 51. 606-616.

Márton M., Markolt F., Szabó L., Heltai M. (2013): Burrow densities of Eurasian badger (*Meles meles*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in Börzsöny mountains. Review on agriculture and rural development, 2. 1. 79-84.

Mitchell-Jones A. J., Amori G., Bogdanowicz W., Krystufek B., Reijnders P. J. H., Spitzenberger F., Stubbe M., Thissen J. B. M., Vohralik V., Zima J. (szerk.)(1999): The Atlas of European Mammals. Academic Press, London. 250.

Phillips M., Catling P. C. (1991): Home Range and Activity Patterns of Red Foxes in Nadgee Nature Reserve. Wildlife Research, 18. 677-686.

Sréter T., Széll Z., Egyed Zs, Varga I. (2003): Echinococcus multilocularis: An Emerging Pathogen in Hungary and Central Eastern Europe? Emerging Infectious Diseases, 9. 384-386.

Strauss R. E. (1979): Reliability Estimates for Ivlev's Selectivity Index, the Forage Ratio, and a Proposed Linear Index of Food Selection. Transactions of the American Fisheries Society, 108. 344-352.

Takács A., Szemethy L., Takács A. A., Takács P. T., Heltai M. (2012): Adatok az eurázsiai borz (*Meles meles*) parazitákkal való fertőzöttségéről Magyarországon. Magyar Állatorvosok Lapja, 134. 106-110.

Vos A. (1995): Population dynamics of the red fox (*Vulpes vulpes*) after the disappearance of rabies in county Garmisch-Partenkirchen, Germany, 1987-1992. Annales Zoologici Fennici, 32. 93-97.

White J. G., Gubiani R., Smallman N., Snell K., Morton A. (2006): Home range, habitat selection and diet of foxes (*Vulpes vulpes*) in a semi-urban riparian environment.Wildlife Research, 33. 175-180.

Mézes és Kovács / AWETH Vol 9.3. (2013)

TRACEABILITY OF FARM ANIMALS, THEIR MEAT AND MEAT PRODUCTS

Miklós Mézes[1], *Alfréd Kovács*[2]

[1]Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Science, Institute of Basic Animal Science, Department of Nutrition
H-2103. Gödöllő, Páter Károly u. 1., Hungary
[2]Szent István University, Faculty of Agricultural and Envinronmental Science, Institute of Animal Breeding, Department of Cattle and Sheep Breeding
H-2103. Gödöllő, Páter Károly u. 1.
Mezes.Miklos@mkk.szie.hu

Abstract

Traceability as applied to live animals and animal products, such as meat, has been used for several thousand years for commercial and breeding purposes. During the last decade concerns about the safety and quality of food increased at consumer level which includes the requirement for traceability. Numerous methods are available for the identification of farm animals at individual or population levels. However these methods are usually not standardised, therefore not validated, and this statement can be extended to meat and meat products. Beside the traditionally used methods recently introduced the microchip technique for the individual identification of live animals. Otherwise, identification of meat and meat products after slaughtering arise some problems at the levels of species, genotypes or individuals. Nowadays, among the methods for the identification of farm animal species, the widely used are the molecular methods, based on 12S rRNA, DNA and microsatellite (STR) markers. Other methods, such analysis of myosin light chain or analysis of mutations by sequencing of the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) gene in pig and its analogue gene in poultry (*CMC*) also seems to be useful. A novel method, based on the ratio of stable isotopes of nitrogen and carbon ($^{15}N/^{14}N$; $^{13}C/^{12}C$).was also proposed for the identification of populations.
Keywords: traceability, meat, meat products, molecular markers

Gazdasági állatok, azok húsának és hústermékeinek nyomonkövethetősége

Összefoglalás

A gazdasági állatok azonosítását kereskedelmi, majd tenyésztési célból már sok ezer éve alkalmazzák. Az élelmiszerek minősége és biztonsága iránti igény az elmúlt évtizedekben egyre fontosabb kritériummá vált a fogyasztók részéről, amely magában foglalta a nyomon követhetőség iránti növekvő igényt is. Az állatfajok egyedi és populáció szintű azonosítására számos módszer áll rendelkezése. Ugyanakkor ezek a módszerek általában nem standardizáltak és validáltak és ez a megállapítás igaz azok húsára és az azokból készült termékekre is. Az egyedek azonosítására a hagyományos módszerek mellett újabban egyre inkább a elterjedtek a

mikrochip technikák. A vágást követően azonban a hús- és hústermékek azonosítása, akár az egyed, akár a faj vagy fajta szintjén, azonban számos problémát vet fel. Az állatfajok azonosításra alkalmazott módszerek közül napjainkban leginkább a molekuláris módszerek terjedtek el, amelyek a 12S rRNS vagy DNS alapú azonosításon és mikroszatellit (STR), markereken alapulnak. Egyéb módszerek, így például a miozin könnyű lánc elemzésén alapulók, vagy sertésnél a melanocortin-1 receptor (*MC1R*) génben, baromfi fajoknál pedig ennek analógjaiban a *CMC* génekben kimutatott mutációkat is alkalmasnak tűnnek az azonosításra. A populációk azonosításra új módszerként javasolták a nitrogén ($^{15}N/^{14}N$) és a szén ($^{13}C/^{12}C$) stabil izotópjai arányainak mérését is.
Kulcsszavak: nyomonkövethetőség, hús, hústermékek**,** molekuláris markerek

Introduction

Traceability as applied to live animals and animal products, such as meat, has been used for several thousand years for commercial and breeding purposes. The oldest method for individual identification of animals with body markings was written in the Code of Hammurabi at 1800 B.C. Later, in the 13th century, swans of Kings of England were marked with individual indelible branding. From the 18th century in most of the European countries the contaminated or infected meat or hides which were unfit for trade or consumption covered with lime for identification. Slaughtering of different genotypes of beef (e.g. Hungarian grey), because of their different quality should slaughtered on different days in Germany (*Blancou*, 2001).

During the last decades, from the 1980s in the European Community, later in the European Union, concerns new concepts of quality of meat and meat products increased at consumer level. This new concept based on that the former requirement of quality, which was included only health and hygienic aspects (*McKean*, 2001), extended to sensory traits, animal welfare aspects of production, environmental management, special attention to some feed components (e.g. animal origin feeding stuffs or GM plants.) and also meat traceability (*Tomeš et al*. 2009)**.**

Based on these new requirements the European Union established regulations which are obligatory in all Member States, including identification of food producing animals, both flocks or individuals (*1760/2000/EC, 1825/2000/EC*), and standardised the traceability for food of animal origin (*931/2011/EU*). According to this regulation all food business operators shall ensure that the following information concerning consignments of food of animal origin should be made available documentation on:

(a) An accurate description of the food;
(b) The volume or quantity of the food;
(c) The name and address of the food business operator from which the food has been dispatched – namely identification of the farm;
(d) The name and address of the owner if different from the food business operator from which the food has been dispatched;
(e) The name and address of the food business operator the whom the food is dispatched – identification of the slaughter house / meat processing firm;
(f) The name and address of the owner, if different from the food business operator to whom the food is dispatched;
(g) A reference identify the lot, batch or consignment, as appropriate;
(h) The date of dispatch.

Identification of individual animals

Numerous methods are available for the identification of farm animals at individual or population levels. Until the 1990s, the purposes of farm and animal identification were primarily related to implementation of breeding schemes and health programmes. Recently other aspects have been emphasised, especially in those countries where consumer demand has to led to the need to trace animals and animals products along the food chain (*Madec et al*. 2001). However these methods are usually not standardised, therefore not validated, and this statement can be extended to meat and meat products.

Most of the individual identification methods can be use only up to slaughtering, but those cannot guarantee the identification after is, such as ear tag for rabbits, pigs, sheep or cattle. In poultry species the individual identification is usually not possible (*Fallon,* 2001*)*, even if wing tags were used, therefore for poultry flock identification would be an alternative method, if separate slaughtering is possible.

Beside the traditionally used methods recently introduced the microchip technique for the individual identification of live animals, and also their products after slaughtering. However, wide distribution of this method is questionable because of the cost of microchip and its recover or re-use cannot be guaranteed.

Identification of meat and meat products of different species or genotype

Nowadays, among the methods for the identification of a particular farm animal species, the widely used are the molecular methods. For instance generally acceptable method for the species identification of milk and milk products is based on 12S rRNA, which has high species-specificity (*Zachar et al*. 2011). This method was also proposed to use for the identification of meat and meat products (*Wang et al*. 2010).

The DNA based methods, including tandem repeat sequences or microsatellites, such as short tandem repeats (STR) are suitable and accurate markers (*Butler,* 2001) for the identification of meat and meat products, because of the extreme high rate of polymorphism of STR, therefore high variety of differences can be identified using this method (*Dalvit et al*. 2008).

Another suitable method as biomarker for identification of meat and meat products is based on the identification of individual, species and/or genotype specific proteins with proteomic analysis and peptide mass fingerprinting. Limitation of using this method is that during the muscle to meat transformation process muscle cells undergo rigor mortis, and later, on the time scale of days, muscle fibre degradation occurs due to proteolytic enzyme activity and partly modifies proteins. Among the proteomic analysis method widely use the identification of the peptide sequences of myosin light chain. This method was found as accurate for the detection the presence of chicken meat in a mix with other types of meat, based on chicken specific peptide sequences (*Montowska and Pospiech,* 2013). The inter-species differences in myosin light chain isoforms allow to use this method as suitable for the identification the meat of different farm animal species, such as cattle, pig, chicken, turkey, duck and goose (*Montowksa and Pospiech*, 2012) but less accurate for identification of genotypes in the same species (*Montowska and Pospiech*, 2011).

Identification of myosin light chain isoforms is also typical for species, therefore it was possible to use for differentiation of bovine and river buffalo meat, therefore may be considered as marker to the traceability (*Picariello et al.* 2006):

Analysis of gene mutations of the melanocortin-1 receptor (*MIC1R)* gene, *extension,* with sequence variants and frequency of extension locuses was proposed for the identification of pig species (wild or domesticated) and also pig genotypes in meat and meat products (*Kijas et al. 1998).* Genotypes and alleles frequenciey of the *extension* locus of *MCI1R* gene was determined in eight cattle breeds and marked differences were found (*Rouzaud et al.* 2000). Its analogue gene in poultry (*CMC*), encodes colour of feather, was also suitable for the identification of different poultry genotypes (*Takeuchi et al.* 1997*).*

Based on the high differences in the allele frequencies among species and genotypes this method would be useful for the identification of live animals but also for meat and meat products.

Traceability of poultry and poultry products is possible only on individual flock basis. A perspective method for identification of flocks fed with different diets is to determine the ratio of stable isotopes of nitrogen and carbon ($^{15}N/^{14}N$; $^{13}C/^{12}C$) in feed and also in the animal products from the same flock. Those ratios can be determined accurately, and based on the results the population can be identify, both in the feed and in the animal products, such as meat or keel (*Móri et al*. 2007).

Acknowledgement

The research was supported by the TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 "Improvement of the level of education and research at the Szent István University" and the Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL projects.

References

Blancou, J. (2001): A history of the traceability of animals and animal products. Rev. Sci. Tech., 2. 413-425.

Butler, J.M. (2001) Forensic DNA typing: Biology and technology behind STR markers, Academic Press, London

Dalvit, C., De Marchi, M., Tarhetta, C., Gervaso, M., Cassandro, M. (2008): Genetic traceability of meat using microsatellite markers. Food Res. Internat., 41. 301-307.

Fallon, M. (2001): Traceability of poultry and poultry products. Rev. Sci. Tech., 20. 538-546.

Kijas, J.M.H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L. (1998): Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. Genetics, 150. 1177-1185.

Madec, F., Geers, R., Vesseur, P., Kjeldsen, N., Blaha, T. (2001): Traceability in the pig production chain. Rev. Sci. Tech., 20. 523-537.

McKean, J.D. (2001): The importance of traceability for pblic health and consumer protection. Rev. Sci. Tech., 20. 363-371.

Montowska, M., Pospiech, E. (201): Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. Food Rev. Internat., 27. 84-100.

Myosin light chain isoforms retain their specific species-specific electrophoretic mobility after processing, which enables differentiation between six species: 2DE analysis of minced meat and meat products made from made from beef, pork and poultry. Proteomics, 18. 2879-2889.

Montowska, M., Pospiech, E. (2013): Species-specific expression of various proteins in meat tissue: Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. Food Chem., 136. 1461-1469.

Móri, C. , Garcia, E.A., Ducatti, C., Denadai, J.C., Pelicia, K., Gottman, R., Mituo, A.O.?., Bordinhon, A.M. (2007): Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix janponica*) tissues using carbon ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) stable isotopes. Brasil. J. Poult. Sci., 9. 263-269.

Picariello G, De Martino A, Mamone G, Ferranti P, Addeo F, Faccia M, Spagnamusso S, Di Luccia A. (2006): Proteomic study of muscle sarcoplasmic proteins using AUT-PAGE/SDS-PAGE as two-dimensional gel electrophoresis. J Chromatogr B, 833. 101-108.

Rouzaud, F., Martin, J., Gallet, P.F., Delourme, D., Goulemot-Leger, V., Amigues, Y., Ménissier, F., Levéziel, H., Julien, R., Oulmouden, A. (2000): A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the *extension* gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). Genet. Sel. Evol., 32. 511-520.

Takeuchi, S., Suzuki, H., Yabuuchi, M., Takahashi, S. (1997): A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in he chicken. Biochim. Biophys. Acta, 1308. 164-168.

Tomeš, J., Lukešová, D., Macháč, J. (2009): Meat traceability from farm to slaughter using global standards and RFID. Agric. Trop. Subtrop., 42. 98-100.

*Wang, Q., Zhang, X., Zhang, H.Y., Zhang, J., Chen, G.Q., Zhao, D.H., Ma, H.P., Liao, W.J.(*2010): Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. Meat Sci., 85. 265-269.

Zachar, P., Šoltés, M., Kasarda, R., Novotný,J., Miroslava Novikmecová,M., Marcinčáková, D. (2011): Analytical methods for the species identification of milk and milk products. Mljekarstvo, 61. 199-207.

A CSOPORTOSAN TARTOTT ANYANYULAK AGRESSZÍV VISELKEDÉSE A CSOPORT KIALAKÍTÁSÁT KÖVETŐ HÓNAPBAN

Mikó Annamária[1], Szendrő Zsolt[1], Odermatt Meinrad[2], Gerencsér Zsolt[1], Radnai István[1], Nagy István[1], Matics Zsolt[1]

[1]Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Baromfi- és Kisállattenyésztési Tanszék, 7400 Kaposvár
[2]Olivia Kft, 6050 Lajosmizse
miko.annamaria@ke.hu

Összefoglalás

A csoportosan tartott anyanyulak agresszív viselkedését figyeltük. A nyulak egy állatvédő csoport (Négy Mancs) által javasolt módon voltak tartva. Négy anya- (egy közülük idősebb volt a többinél) és egy baknyúl volt együtt egy 7,7 m2 alapterületű fülkében, melynek egyik fele (2,8 x 1,5 m) mélyalom, a másik fele pedig műanyagrács padozatú volt. Az ablakokon át bejutó természetes fény mesterséges megvilágítással volt kiegészítve, mellyel 16 órás világos időszakot biztosítottunk számukra. Az állatok kereskedelemben is kapható tápot és vizet ad libitum fogyaszthattak. Továbbá szénát is fogyaszthattak, melyet szénazsebben helyeztünk el. Infravörös kamerák segítségével 24 órás videofelvételeket készítettünk. Az agresszív viselkedést (verekedések) a csoport kialakítását követő egy hónapon keresztül figyeltük. A nyulakat különböző alakú foltokkal jelöltük a csoporton belüli felismerhetőségük végett. A legtöbb agresszív viselkedés az első és az ötödik napon (11 és 14 alkalom) történt. A legtöbb támadást a sötétedést megelőző (20 és 21 óra között) és követő órákban (különösen 6 és 7 órát követően; 13 és 14 alkalommal, sorrendben) figyeltük meg. Éjfél és dél körül is volt néhány alkalommal agresszív viselkedés. A legtöbbször a többinél idősebb anyanyúl támadta meg a nála fiatalabb anyákat (59, 30 és 3 alkalommal, a rangsorban a második, harmadik és negyedik pozícióban lévő anyanyulat, sorrendben), 4 alkalommal még a bakot is megtámadta. A többi anyanyúl összesen 16-szor indított támadást. Következtetésképp elmondható, hogy az agresszív viselkedés általános problémát jelent az anyanyulak csoportos tartásában. Az agresszió állandó jelenség volt az egész megfigyelt időszak alatt. A legtöbb esetben az idősebb anyanyúl támadta meg a nála fiatalabb anyákat.

Kulcsszavak: agresszió, állatjólét, csoportos tartás, anyanyúl

Aggressive behaviour of group-housed rabbit does after establishing the group

Abstract

The does were housed according to the recommendation of an animal protection group, called Four Paws. Four does (one of them was older than the others) and one buck were placed to a pen with a basic area of 7.7 m2. Within the pen, one part of the floor (2.8 x 1.5 m) was covered with straw, and the other part was consisted of plastic-mesh. The room was illuminated by natural light through the windows, which was extended artificially to reach 16L. Using infrared camera, 24-hour recordings were performed throughout the experiment. The aggressive behaviour (fights) of four does and a buck was observed during the month after the group was established. The rabbits were marked with different spots to indentify them within the group. Most fights were counted on the first and fifth days (11 and 14 times). Most attacks were observed before (between 20 and 21h) and after the dark periods (especially between 6 and 7h; 13 and 24 times, respectively). A few fights were also observed around noon and midnight. The oldest doe attacked the most times the younger females (59, 30 and 3 times, the does in second, third and fourth position in the ranking, respectively) but 4 times even the buck was attacked. The other rabbit does have initiated attacks 16 times in total. Aggressive behaviour is a general problem in group-housing system.
Keywords: aggressive behaviour, animal welfare, group-housing, rabbit doe

Irodalmi áttekintés

A házinyúl őse, az üregi nyúl, főként vegyes ivarú kolóniákban él, speciális struktúrájú csoportban, melyben külön a bakok és külön az anyanyulak egymás között hierarchikus dominancia rangsort alakítanak ki (*Mykytowycz*, 1958; *Lockely*, 1961). A természetben a kialakított hierarchiát minden napos küzdelmekkel (üldözés, menekülés) tartják fenn (*Mykytowycz*, 1958). Ismeretlen állat megjelenése a csoportban küzdelmeket indukál (*Southern*, 1948; *Mykytowytcz és Hesterman*, 1974).

Az agresszív viselkedés – különösen az anyanyulak között – jelenti az egyik fő problémát a csoportos tartásban, ami még megoldatlan. Több kutató vizsgálta már ezt a jelenséget (*Szendrő és mtsai*, 2013; *Andrist és mtsai*., 2011; *Mugnai és mtsai*, 2009; *Rommers és mtsai*, 2006; *Baumann és mtsai*, 2003; *Stauffacher*, 1992). Számos kísérletet eszközöltek annak érdekében, hogy csökkentsék az anyanyulak csoportos tartásában az agresszív viselkedést, kevés sikerrel. Néhány kutató ennek ellenére hiszi, hogy ez működni fog. Kísérletünkben az agresszív viselkedést vizsgáltuk anyanyulak csoportos tartásában.

Anyag és módszer

Az állatok egy állatvédő csoport (Négy Mancs Alapítvány) által javasolt módon lettek elhelyezve. Négy anyanyulat (három 19 hetes és egy 1 éves) és egy bakot helyeztünk egy 7,7m2 alapterületű fülkébe. A padozat egyik fele (2,8 x 1,5m) mélyalom, a másik pedig műanyag rács volt. A terembe az ablakokon át bejutó természetes fényt kiegészítettük mesterséges világítással napi 16 órára. A nyulak a kereskedelemben is kapható tápot ad libitum fogyaszthattak, továbbá

széna is a rendelkezésükre állt, melyet szénazsebből fogyaszthattak. Vizet csepegtetős önitatókból ad libitum ihattak.

Infravörös kamerák segítségével napi 24 órás videó felvételeket készítettünk. A csoport kialakítását követő egy hónapban megfigyeltük az anyanyulak és a baknyúl agresszív viselkedését. A nyulakat egyedileg jelöltük fekete foltokkal.

Az agresszív viselkedést az irodalomban található adatok alapján (*Albonetti és mtsai*, 1990; *Held és mtsai*, 2001; *Mykytowycz és Hesterman*, 1974; *Rommers és mtsai*, 2011) a következő magatartásformák alapján vizsgáltuk:

A támadó magatartásformák (fenyegető, támadó, küzdő, üldöző) és a védekező magatartásformák (menekülő, visszatámadó, viszontküzdő, visszavonuló).

Eredmények és értékelésük

Az agresszív viselkedés a teljes megfigyelt időszak alatt előfordult (*1. ábra*). Hasonló megfigyeléseket tettek a természetben élő üregi nyulaknál is, miszerint a kolóniában élő állatok a már kialakult rangsort napi küzdelmekkel tartják fenn (*Mykytowycz*, 1958).

A legtöbb küzdelmet az első és az ötödik napon figyeltük meg. *Rommers és mtsai.* (2011) hasonlóképp, az első napon figyelték meg a legtöbb agonisztikus agresszív viselkedést.

A természetben a küzdelmek a legtöbb esetben az egyes ivarokon belül történnek az egyedek között (*Mykytowycz*, 1958). Ennek ellenére mi 10 alkalommal figyeltünk meg agresszív kölcsönhatást a bak és az anyanyulak között (*1. ábra*).

Stauffacher (1992) megfigyelései alapján a baknak moderáló hatása volt az anyanyulak agresszív viselkedésére. Saját megfigyeléseinkben a baknyúl több alkalommal megfékezte az anyanyulak verekedését.

1. ábra: **Agresszív kölcsönhatások száma a csoportosan tartott nyulak között a megfigyelés egyes napjain**

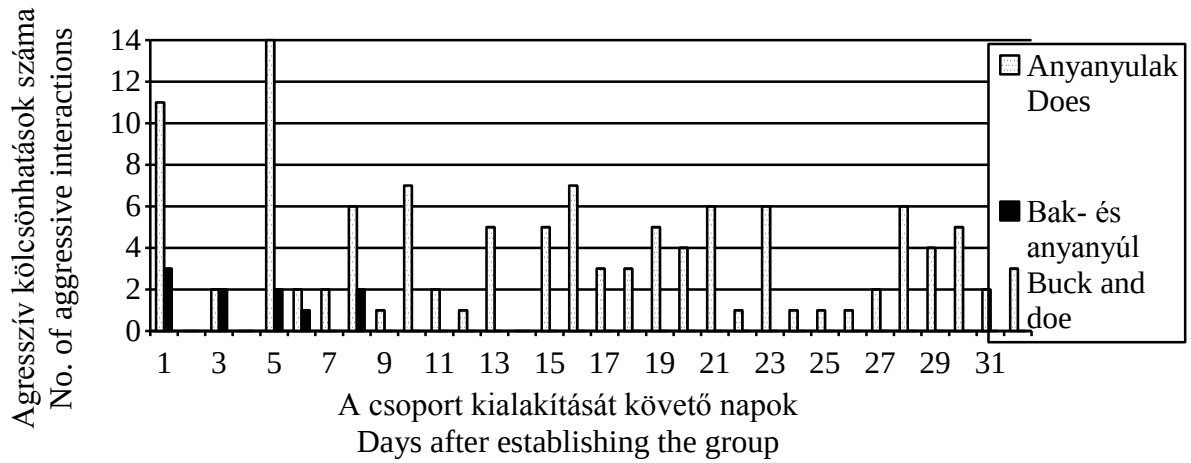


Figure 1: The frequency of aggressive behaviour of rabbit does and the buck at each day of the observed time

A legtöbb agressziót a sötét időszak (22-06 óra) előtti (20 és 21 óra között) és utáni órákban (6 és 7 óra körül, 13 és 24 alkalommal, sorrendben) figyeltünk meg. Továbbá néhány alkalommal megfigyeltünk támadást dél és éjfél körül (*2. ábra*). Megfigyeléseink alapján, hasonlóképp Rommers és mtsai. (2011) eredményeihez, nem minden agresszív kölcsönhatás végződött küzdelemmel, azonban számos támadást követett viszonttámadás.

2. ábra: **Agresszív kölcsönhatások száma a csoportosan tartott anyanyulak között a megfigyelés napjainak egyes óráiban.**

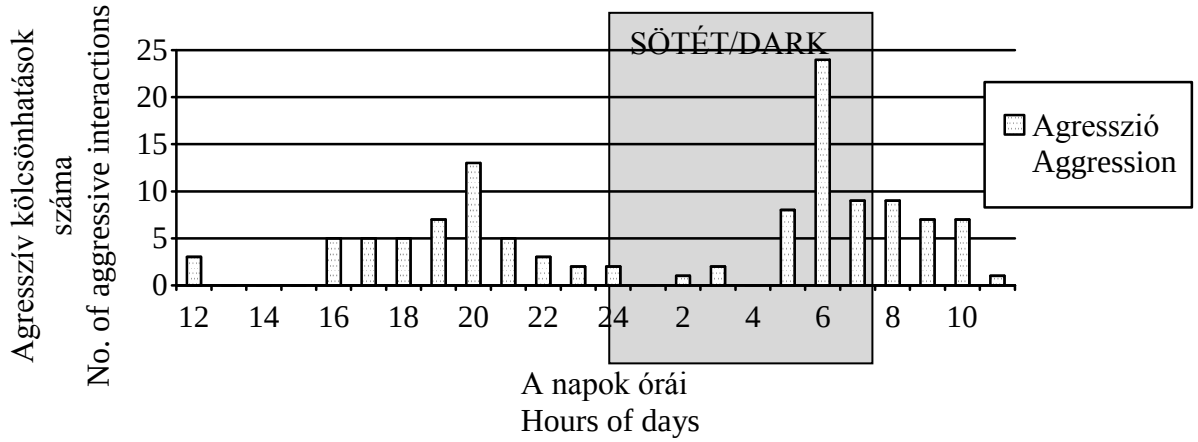


Figure 2: The frequency of the aggressive behaviour of rabbit does at each hour of the observed days

Baumann és mtsai. (2003) a csoportosan tartott nyulak 16,6%-án tapasztaltak súlyos sérüléseket. *Andrist és mtsai*. (2011) szintén vizsgálták a nyulak csoportos tartását, melyben az állatok 33%-a sérült meg és ebből 9%-ban súlyos sérülést találtak. *Rommers és mtsai*. (2006) szintén nagy arányban (17 és 21% között) figyeltek meg sérült nyulakat a csoportos tartás esetében.

Ruis és mtsai. (2006) szerint, ha egy ismeretlen egyed kerül a csoportba, az a legtöbb esetben agressziót generál. Jelen vizsgálatunkban az idősebb anyanyúl (Anya1) támadta meg a legtöbbször a nála fiatalabb társait (59, 30 és 3 alkalommal a rangsorban a második, a harmadik és a negyedik helyen álló anyanyulat), sőt 4 alkalommal még a baknyúllal szemben is indított támadást. A többi anyanyúl összesen 16 alkalommal kezdeményezett támadást (3. ábra).

***3. ábra:* Az agresszív kölcsönhatások mátrixa a csoportosan tartott nyulak között.**

	Bak/Buck	Anya1/Doe1	Anya2/Doe2	Anya3/Doe3	Anya4/Doe4
Bak/Buck		4	2	0	0
Anya1/Doe1	3		3	0	1
Anya2/Doe2	1	59		5	3
Anya3/Doe3	0	3	2		0
Anya4/Doe4	0	30	0	2	

Figure 3: Matrix of aggressive behaviour of does and buck
A vízszintesen felsorolt állatok voltak a támadás kezdeményezői. (Animals listed in the row were the aggressors.)

Az agresszív viselkedés a csoportos tartásban jelentősen rontja az állatok jólétét, mivel magas stresszt okoz és az állatok a harc közben sérüléseket szenvedhetnek. *Szendrő és mtsai*. (2013) által végzett kísérletben a csoportosan tartott anyanyulak stresszhormon-szintje (ürülékben mért kortikoszteron-szint) sokkal magasabb (175 nmol/g) volt, mint egyedileg tartott társaiké (61 és 54 nmol/g). *Mugnai és mtsai*. (2009) szintén magas kortikoszteron-szintről számoltak be a csoportosan tartott nyulak esetében.

Következtetések és javaslatok

Az agresszív viselkedés általános problémát jelent az anyanyulak csoportos tartásában. Kísérletünkben a teljes megfigyelt időszak alatt előfordultak agresszív kölcsönhatások. A legtöbb esetben az idősebb anyanyúl volt a támadást kezdeményező fél.

Köszönetnyilvánítás

Mikó Annamária publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

Albonetti, E.M.; Desi-fulgheri, F.; Farabollini, F. (1990): Intrafemale agonoistic interactions in the domestic rabbit (Oryctolagus cuniculus). Aggressive Behavior 16, 77-86

Andrist, C.A.; Bigler, L.; Buchwalder, T.; Roth, B.A. (2011): The extent of lesions in group housed rabbits and potential risk factors. In: 17th Intern. Symp. Housing and Diseases of Rabbits, Fur Providing Animals and Pet Animals, Celle, Germany, 34-42

Baumann, P.; Bigler, L.; Buchwalder, T.; Huber-Eicher, B. (2003): Recherche pour la bien-etre de la volaille et des lapins. Magazine de l'OVF 1, 13-16

Held, S.D.E.; Turner, R.J.; Wootton, R.J. (2001): The behavioural repertoire of non-breeding group-housed female laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Animal Welfare, 10, 437-443

Lockley, R. (1961): Social structure and stress in the rabbit warren. Journal of Animal Ecology, 30. 385-423

Mykytowycz, R. (1958): Social behaviour of an experimental colony of wild rabbits. CSIRO Wildlife Research, 3. 7-25

Mykytowycz, R.; Hesterman, E.R. (1974): An experimental study of aggression in captive European rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.). International Journal of Behavioural Biology, 52. 1. 104-123

Mugnai, C.; Dal Bosco, A.; Castellini, C. (2009): Effect of different rearing systems and pre-kindling handling on behaviour and performance of rabbit does. Appl. Anim. Behav. Sci., 118. 91-100.

Szendrő, Zs.; Mikó, A.; Odermatt, M.; Gerencsér, Zs.; Radnai, I.; Dezséry, B.; Garai, É.; Nagy, I.; Szendrő, K.; Matics, Zs. (2013): Comparison of performance and welfare of single-caged and group-housed rabbit does. Animal, 7. 3. 463-468.

Rommers, J.M.; Boiti, C.; de Jong, I.; Brecchia, G. (2006): Performance and behaviour of rabbit does in a group-housing system with natural mating or artificial insemination. Reprod. Nutr. Dev., 46. 677-687.

Rommers J.M.; Gunnink H.; Klop A.; De Jong I. (2011): Dynamics in aggressive behaviour of rabbit does in a group housing system: a descriptive study. In: 17th Intern. Symp. Housing and Diseases of Rabbits, Fur Providing Animals and Pet Animals, Celle, Germany, 34-42.

Ruis, M. (2006): Group housing of breeding does. In Maertens, L. and Coudert, P. (Eds.): Recent Advances in Rabbit Science. ILVO, Belgium, 99-105.

Southern, H.N. (1948): Sexual and aggressive behaviour of the wild rabbit. Behaviour 1, 173-194

Stauffacher, M. (1992): Group housing and enrichment cages for breeding, fattening and laboratory rabbits. Animal Welfare, 1. 105-125.

A CSOPORTOSAN TARTOTT NYULAK PÁRZÁSI VISELKEDÉSE A CSOPORT KIALAKÍTÁSÁT KÖVETŐ HÓNAPBAN

Mikó Annamária[1], Szendrő Zsolt[1], Odermatt Meinrad[2], Gerencsér Zsolt[1], Radnai István[1], Nagy István[1], Matics Zsolt[1]

[1]Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Baromfi- és Kisállattenyésztési Tanszék, 7400 Kaposvár
[2]Olivia Kft, 6050 Lajosmizse
miko.annamaria@ke.hu

Összefoglalás

A csoportosan tartott nyulak párzási viselkedését figyeltük. A nyulak egy állatvédő csoport (Négy Mancs) által javasolt módon voltak tartva. Négy anya- (egy közülük idősebb volt a többinél) és egy baknyúl volt együtt egy 7,7 m2 alapterületű fülkében, melynek egyik fele (2,8 x 1,5 m) mélyalom, a másik fele pedig műanyagrács padozatú volt. Az ablakokon át bejutó természetes fény mesterséges megvilágítással volt kiegészítve, mellyel 16 órás világos időszakot biztosítottunk számukra. Az állatok kereskedelemben is kapható tápot és vizet ad libitum fogyaszthattak. Továbbá szénát is fogyaszthattak, melyet szénazsebben helyeztünk el. Infravörös kamerák segítségével 24 órás videofelvételeket készítettünk. A nyulak párzási viselkedését a csoport kialakítását követő egy hónapon keresztül figyeltük. A nyulakat különböző alakú foltokkal jelöltük a csoporton belüli felismerhetőségük végett. A bak összesen 56 párzási próbálkozást tett, azonban ez csak 11 alkalommal látszott sikeresnek a kísérlet első és 19. napján (6 és 5 alkalommal, sorrendben). Az első négy napban nagy számban tapasztaltunk homoszexuális viselkedést az anyanyulak között (60 alkalommal az első és 1, 3, 1 alkalommal a követő napokban). A bak 10 és 11 óra között párzott a legtöbbször az anyákkal. Az anyanyulak homoszexuális viselkedése 10 és 15 óra körül érte el maximumát (11 és 21 alkalom, sorrendben). Tekintve a párzási viselkedést és az anyanyulak termelését, összességében elmondható, hogy a természetes pároztatás ilyen formában a csoportos tartásban nem hatékony.

Kulcsszavak: csoportos tartás, párzási viselkedés, állatjólét, anyanyúl

Mating behaviour of group-housed rabbits after establishing the group

Abstract

The does were housed according to the recommendation of an animal protection group, called Four Paws. Four does (one of them was older than the others) and one buck were placed to a pen with a basic area of 7.7 m2. Within the pen, one part of the floor (2.8 x 1.5 m) was covered with straw, and the other part was consisted of plastic-mesh. The room was illuminated by natural light through the windows, which was extended artificially to reach 16L. The rabbits received commercial pellet and water ad libitum, furthermore rabbits could also consume hay. Using infrared camera, 24-hour recordings were performed throughout the experiment. The mating behaviour of four does (we observed homosexual behaviour between does) and a buck was observed during the month after the group was established. The rabbits were marked with different spots to indentify them within the group. The buck attempted mating with does 56 times in total. It was successful only 11 times at the first and the nineteenth day of the observed time, (6 and 5 times, respectively). During the first four days of the experiment, rabbit does attempted to mate with each other (60 times at the first and 1, 3, 1 times on the following days). The male mated with does most often between 10 and 11 h. Mating behaviour between does has reached its maximum about 10h and 15h (11 and 21 times, respectively). The buck performed the most mating attempts about 11h (10 times in total).
Keywords: group-housing, mating behaviour, animal welfare, rabbit doe

Irodalmi áttekintés

A házinyúl őse, az üregi nyúl, különböző méretű, vegyes ivarú kolóniákban él. Általában 2-3 bak- és 3-9 anyanyúl él együtt szaporulatával (*Surridge és mtsai*, 1999). Jelenleg számos európai országban az anyanyulakat egyedileg tartják.

Az anyanyulak csoportos tartásának fő célja az volna, hogy természetszerű körülményeket biztosítsunk az állatok számára. A nyulak számos szociális viselkedési formával rendelkeznek, mint a párzási viselkedés, az anyai viselkedésformák, melyek ebben a farm rendszerben nincsenek korlátozva (*EFSA*, 2005).

Alternatív tartásban, amikor több anyanyulat tartunk együtt bakkal, gyakran előfordul az álvemhesség, ami jelentősen rontja az anyanyulak termelését. Ez jelentős problémát okoz a termelőknek. *Andrist és mtsai*. (2011) egyedileg tartották az anyanyulakat a vemhesség 30-adik napjától a fiókák 12 napos koráig annak érdekében, hogy elkerüljék az álvemhességet. Kísérletükben a fialási arány alacsony volt (61%). *Rommers és mtsai*. (2006) a csoportosan tartott anyanyulak esetében szintén alacsony fialási arányt (55,6%), és magas álvemhességet (23%) tapasztaltak. *Szendrő és mtsai*. (2013) csoportosan tartott anyanyulakkal végzett kísérletében szintén alacsony fialási arányról (45,6%) számoltak be az egyedileg tartott anyanyulakhoz képest (77,6 és 85,2%). Kísérletünkben megfigyeltük a nyulak párzási viselkedését csoportos tartásban.

Anyag és módszer

Az állatok egy állatvédő csoport (Négy Mancs Alapítvány) által javasolt módon lettek elhelyezve. Négy anyanyulat (három 19 hetes és egy 1 éves) és egy bakot helyeztünk egy 7,7m2

alapterületű fülkébe. A padozat egyik fele (2,8 x 1,5m) mélyalom, a másik pedig műanyag rács volt. A terembe az ablakokon át bejutó természetes fényt kiegészítettük mesterséges világítással napi 16 órára. A nyulak a kereskedelemben is kapható tápot ad libitum fogyaszthattak, továbbá széna is a rendelkezésükre állt, melyet szénazsebből fogyaszthattak. Vizet súlyszelepes önitatókból ad libitum fogyaszthattak.

Infravörös kamerák segítségével 24 órás videó felvételeket készítettünk. A csoport kialakítását követő egy hónapban megfigyeltük a nyulak párzási viselkedését. A nyulakat egyedileg jelöltük fekete foltokkal.

Az alábbi szexuális viselkedésformákat figyeltük meg és rögzítettük: a sikeres párzások számát (a párzási próbálkozás ejakulációban végződött, a bak „lefordult" az anyanyúlról), és az állatok közötti párzási próbálkozások számát (amikor az anya- vagy a baknyúl párzási mozgást végez társán). Megkülönböztettük és rögzítettük, hogy melyik egyed próbálta fedezni a másikat.

Eredmények és értékelésük

A megfigyelt időtartam alatt a bak összesen 56-szor tett párzási próbálkozást, ebből 6 alkalommal volt sikeres az első, és 5 alkalommal a 19. napon (1. ábra).

1. ábra: **A bak szexuális viselkedése a csoport kialakítása utáni napokban**



Figure 1: Sexual activity of buck at days after establishing the group

A kísérlet első napján volt a legintenzívebb az anyanyulak leszbikus szexuális viselkedése (60 alkalom) és az azt követő három napban (1,3 és 1 alkalom, sorrendben) figyeltünk meg ilyen viselkedést.

A bak 10 és 11 óra között tette a legtöbb párzási próbálkozást (10 alkalom; 2. ábra). Az anyanyulak szexuális viselkedése 10 és 15 óra körül érte el maximumát (11 és 21 alkalom, sorrendben).

***2. ábra:* A nyulak szexuális aktivitása a megfigyelt időszak egyes óráiban.**

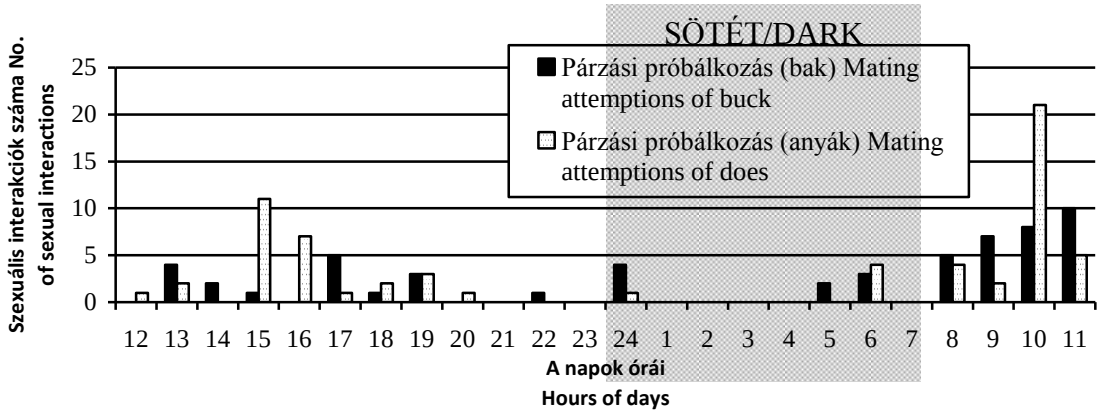


Figure 2: Sexual activity of buck and does at each hour of the observed days.

A bak az összes anyanyulat megpróbálta befedezni (3. ábra). A legtöbb sikeres párzást a 2-es számú anyával figyeltük meg. Ugyanakkor az említett anyanyúllal tette a legtöbb párzási próbálkozást is, összesen 31 alkalommal. A sikeres párzások száma – adott anyanyúllal – arányosan nőtt vagy csökkent a párzási próbálkozások számával.

***3. ábra* A csoportosan tartott nyulak szexuális kölcsönhatásainak mátrixa.**

	Bak/Buck	Anya1/Doe1	Anya2/Doe2	Anya3/Doe3	Anya4/Doe4
Bak/Buck		9	4	0	0
Anya1/Doe1	10/4*		1	0	1
Anya2/Doe2	31/6*	7		4	2
Anya3/Doe3	9/1*	2	14		0
Anya4/Doe4	6/0*	8	11	2	

Figure 3: Matrix of aggressive behaviour of does and buck
A vízszintesen felsorolt állatok próbálták befedezni az oszlopban feltüntetetteket. Animals listed in the row have mounted onto the animals in the column.
** Sikeres párzások száma. Succesful matings.*

A három sikeresen befedezett anyanyúlból csak kettő (Anya2 és Anya3) fialt le az első időszakban. Anyanyulak csoportos tartásánál számos kutató (*Andrist és mtsai.*, 2011; *Rommers és mtsai.*, 2006 és *Szendrő és mtsai*., 2013) kísérletében bebizonyította, hogy rendkívül alacsony a fialási arány. Ezt a stressz mellett okozhatja az anyanyulak álvemhessége is. *Rommers és mtsai.* (2006) a csoportosan tartott anyanyulak 23%-ánál tapasztaltak álvemhességet.

Következtetések és javaslatok

A csoportosan tartott anyanyulak között nagy számban figyeltünk meg homoszexuális viselkedést, amely álvemhességet okozhat. A baknyúl szexuális viselkedését tekintve elmondható, hogy a sikeres párzások száma – adott anyanyúllal – arányosan nőtt vagy csökkent a párzási próbálkozások számával.

A párzási viselkedést és az anyanyulak termelését tekintve, a csoportos tartásnál a természetes párzás nem volt hatékony.

Köszönetnyilvánítás

Mikó Annamária publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

Andrist, C.A.; Bigler, L.; Buchwalder, T.; Roth, B.A. (2011): The extent of lesions in group housed rabbits and potential risk factors. In: 17th Intern. Symp. Housing and Diseases of Rabbits, Fur Providing Animals and Pet Animals, Celle, Germany, 34-42.

EFSA (European Food Safety Authority) (2005): The impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. EFSA Journal, 267. 1-31.

Rommers, J.M.; Boiti, C.; de Jong, I.; Brecchia, G. (2006): Performance and behaviour of rabbit does in a group-housing system with natural mating or artificial insemination. Reprod. Nutr. Dev., 46. 677-687.

Szendrő, Zs.; Mikó, A.; Odermatt, M.; Gerencsér, Zs.; Radnai, I.; Dezséry, B.; Garai, É.; Nagy, I.; Szendrő, K.; Matics, Zs. (2013): Comparison of performance and welfare of single-caged and group-housed rabbit does. Animal, 7. 3. 463-468.

Surridge, A.K.; Bell, D.J.; Hewitt, G.M. (1999): From population structure to individual behaviour: genetic analysis of social structure in the European wild rabbits (Oryctolagus cuniculus). Biol. J. Linnean Society, 68. 57-71.

ELŐZETES EREDMÉNYEK NÉMET HÚSMERINÓ HÍZÓBÁRÁNYOK VÉRMÉRSÉKLETÉNEK ÉS EGYES VÉRPARAMÉTEREINEK ÖSSZEFÜGGÉS-VIZSGÁLATÁBÓL

Morlin Zsófia, Póti Péter, Bokor Beáta, Kerti Annamária, Pajor Ferenc

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
2100 Gödöllő, Páter Károly út 1.

Összefoglalás

A vizsgálat során az volt a célunk, hogy felderítsük, milyen összefüggést mutatnak egyes vérparaméterek a hízóbárányok vérmérsékletének függvényében. Húsz német húsmerinó kosbárányt választottunk Sebők Mihály elismert törteli tenyészetéből (Pest megye). A 38 napig tartó juh sajátteljesítmény-vizsgálatban résztvevő állatokat kifutós boxokban, csoportosan tartották, és teljesértékű bárány nevelő takarmánykeverékkel *tetszés szerint* takarmányozták. A bárányokat választáskor, az egyik hízócsoport vizsgálatát követően választottuk ki, amelyeket később is együtt, azonos körülmények között tartottak az STV alatt. Az állatok vérmérsékletét az ún. mérlegteszttel állapítottuk meg, amely során 1-5 pontozásos skálán értékeltük az állatok viselkedését mérlegelés közben (1:nyugodt; 5:ideges). A bárányok közül a szélsőértékeket egyértelműen mutató, 10 nyugodt és 10 ideges állatot jelöltünk ki. A hízlalás kezdetekor és végén (n=20), valamint a közepén (n=8) vettünk vérmintákat hematokrit, globulin valamint triglicerid meghatározása céljából. Munkánkban a bárányok vérmérséklete és a vérparaméterek közötti összefüggéseket értékeltük.
Kulcsszavak: vérmérséklet, bárány, hizlalás, vérparaméterek

Preliminary results on temeprament-related examination of some blood parameters in a German Mutton Merino flock, during fattening performance test

Summary

Our goal was to investigate on particular blood parameters in connection with general temperament of the animal and its performance in a 38 days' duration of fattening period. The chosen 20 male lambs were of German Mutton Merino breed. The examination took place in an acclaimed sheep pedigree breeding farm of Mihály Sebők, in Törtel, Pest County. The animals were fed *ad libitum* with commercial complete lamb feed and were kept in large groups in boxes with outdoor yard. We examined one group of the fattening lambs, so they were kept together at same conditions for the whole period of the fattening. Their temperament was established at the start with a 30-sec behavioural score-test during weighing (1:calm, 5:nervous). We have chosen 10 nervous and 10 calm lambs for further measurements, which showed definite responds at both end-points. Blood samples were obtained at the start and at the end of the fattening (n=20) and in between (n=8). We examined haematocrite, globuline and trigliceride to evaluate their connection with temperament.
Key words: temperament, lamb, fattening, blood parameters

Bevezetés

Az állati termék- előállítás során meghatározó az anyagcserefolyamatok hatékonysága, irányultsága (anabolikus vagy katabolikus), intenzitása és egyensúlya. Mindezen folyamatok szabályozásában az a neuroendokrin rendszeren alapuló, pszichológiai és fiziológiai konstitúció vesz részt, amelyet vérmérsékletnek nevezünk (*Dodd és mtsai*, 2012; *Boissy és mtsai*, 2005); amely jól öröklődik (*Boissy és mtsai*, 2005) és egyedi változatosságot mutat, tehát szelektálható (*Knott és mtsai* 2007 és 2010).

Valamely, kellő abszolút vagy relatív erősségű inger hatására négy féle alapvető reakcióval válaszol a szervezet: *aktív* (ún "fight or flight*"* típusú) vagy *passzív* ("vereség" típusú), valamint *akut* és *krónikus* stresszreakcióval -illetve átmeneti formáikkal. Mindennek rendkívül összetett hormonális háttere és összefüggésrendszere van. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (a továbbiakban HPA tengely) aktiválódása következtében fokozódnak az anyagcserefolyamatok, túlsúlyba kerülnek a katabolikus folyamatok és ezáltal az energiafelhasználás fokozódik.

Az aktív reakció viszonylag gyors lefolyású; azonban ha nem sikerül megoldania az állat számára kellemetlen helyzetet, a stresszor megmarad és végül ez is passzív (vereség) reakcióvá alakul (*Dodd és mtsai*, 2012). A stresszreakció során az inger hatására a hipofízis elülső lebenyében termelt adrenokortikotróp (ACTH) hormon felszabadul, aktiválva a mellékvesekérget, amely glükokortikoidokat (kortizol) és katekolaminokat termel (adrenalin, noradrenalin), ezáltal beindítva a fiziológiai stresszválaszt. A kortizolszint növekedése a glükagonon keresztül fokozza a lipolízist és a glikoneogenezist, valamint az adrenalin emeli a vérnyomást és fokozza a vérkeringést, így látva el a szervezetet energiával; összességében a szervezet katabolikus folyamatai kerülnek túlsúlyba (*Knott és mtsai*, 2010).

Idegesebb temperamentumú állat HPA tengelye reaktívabb a környezeti ingerekre (*Knott és mtsai*, 2007). Ez az ingerektől függetlenítve, közvetlen (exogén) ACTH adagolásának hatására is bizonyítható. Ilyen módon egy ideges vérmérsékletű állat általánosságban több energiát használ fel, mint egy nyugodt temperamentumú, hiszen a stresszreakció elvonja az energiát és a táplálóanyagokat (pl fehérjebontással is energiát állít elő) a növekedéstől, fejlődéstől.

Egy ideges természetű állat élete felesleges vészreakciók sorozatából áll; nem létező veszélyekhez adaptálódik, hiszen, ideális esetben, minden életfolyamatához biztosítjuk a megfelelő körülményeket. Több vizsgálat is igazolta, hogy a hosszú távú, tehát krónikus stressz, függetlenül attól, hogy az abszolút vagy relatív (vérmérséklet!), forrása állandó vagy mindig más, hormonális áthangolódást, adaptációt eredményez. A hosszú távú passzív adaptáció fontosabb elemei: az akut stresszfolyamatoktól valamelyest eltérő hormonális reakció, a pajzsmirigy, valamint a thymus és ezzel együtt az immunrendszer működésének megváltozása (*Kioukia-Fougia és mtsai*, 2002), a növekedésihormon-szint csökkenése (*Knott és mtsai*, 2007), adrenokortikoid hiperszekréció és a HPA tengely érzékenységégének fokozódása (*Knott és mtsai*, 2010), mindez további problémákat okoz a termelés során.

Anyag és módszer

A vizsgálat leírása

A vizsgálatot 2013 tavaszán, Törtelen végeztük, Német Húsmerinó tenyészkosok telepi sajátteljesítmény-vizsgálata alatt. A választás, csoportosítás és a szoktatás után az STV kezdetén (2013.05.20), közepén (06.07.) és végén (06.18) végeztük el az ún *mérlegtesztet* (*Pajor*, 2011) és vettünk vért. A sajátteljesítmény-vizsgálat során a tenyészkos-jelöltek tetszés szerinti mennyiséget (*ad libitum)* fogyasztottak a kereskedelmi teljes értékű bárány nevelő

takarmánykeverékből (Central Soya Feed Kft.) amelyhez, ahogyan az ivóvízhez és szénához is, folyamatos hozzáférésük volt. A bárányok nagyobb, kb 40-50 fős csoportokba voltak osztva, kifutóval, növekvő almos kötetlen tartásban.

A mérlegteszt: az állatokat egyenként egy klasszikus juh mérlegre helyezve lemértük a súlyukat, majd 30 másodpercen keresztül figyelve őket értékeltük a viselkedésüket (*Pajor,* 2011; *Dodd és mtsai,* 2012). A viselkedésük eközben egyedileg alakult, a pontozás a következő módon történt:

1 pont: nyugodt, nem mozog;
2 pont: nyugodt, néhány esetleges mozgás;
3 pont:nyugodt, kicsit több mozgás, de nem rázza a mérleget;
4 pont: hirtelen, epizodikus mozgások, de nem rázzaa mérleget;
5 pont: folyamatos, hirtelen mozgások, rázza a mérleget.

A pontozás során nem vettük figyelembe a vokalizációt. Ennek oka, hogy juhoknál a hanggal történő kapcsolatteremtés kisebb mértékű és nagy egyedi változatosságot mutat például a kecskékhez képest, így a stresszreakcióra vagy temperamentumra nézve kevésbé reprezentatív (*Siebert és mtsai,* 2011; *Vanderheede és mtsai,* 1998).

Az egyik német húsmerinó csoportból a mérlegteszt alapján szélsőséges reakciókat mutató egyedeket választottunk ki további vizsgálatra: 10 nyugodt (1-2 pont) és 10 ideges (4-5 pont) viselkedést mutató állatot. Ezek a bárányok a továbbiakban is azonos csoportban és körülmények közt, együtt maradtak a vizsgálat során. A mérlegről való levétel után közvetlenül 10-10 ml vért vettem heparinnal alvadásban gátolt és normál vérvételi csövekbe, majd a mintákat azonnal 4°C ra hűtöttük és szállítottuk, 3 órán belül megkezdtem a feldolgozásukat.

A vérmintákból azonnal vizsgáltam hematokrit értékeket, valamint a plazma ill szérum szeparálása és -20°C-on történő fagyasztása, tárolása után több más paramétert. Jelen munkámban utóbbiakból kiemelném a globulin, kreatinin és triglicerid értékelését.

A méréseket a Szent István Egyetem Állattudományi Alapok Intézetének Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszékén végeztem egy Metertech UV/VIS SP 8001 spetktrofotométeren, makro módszerrel, kromatográfiás kitekkel (Diagnosticum).

Értékelés

Kétféle szempont szerint értékeltük a kapott eredményeket, jellegüktől függően. Az egyik: az adott stresszhelyzet hatása (stresszreakció) a vérparaméterekre. A másik, fő szempont: a temperamentum hatása a vérparaméterekre. Az egyedek közül néhány a vizsgálat második, harmadik szakaszában más viselkedési reakciót mutatott az elbírálás során, ekkor a későbbi eredmények alapján határoztuk meg a vérmérsékletet. Ennek oka, hogy a bizonyos helyzetben adott stresszreakciót befolyásolja a kor (*Bórnez és mtsai*, 2009; *Pajor,* 2011). A temperamentumvizsgálatok alapját olyan paraméterek képezték, amelyek hosszú távú következményekkel vannak az egyed anyagcseréjére.

Vizsgálatunk során két fő vérmérsékleti csoporta osztottuk az eredményeket aszerint, hogy főleg ideges (mérleg teszten 4 vagy 5 pontot értek el gyakrabban) vagy főleg nyugodt (mérleg teszten 1 vagy 2 pontot értek el gyakrabban) viselkedést mutatott az adott egyed.

Eredmények és értékelésük

A mérések során kapott adatokat adatbáziskezelő táblázatokban kiértékeltük; összefoglalva az *1. táblázatban* láthatóak a csoportok átlagos paraméterei (n=13).

1. táblázat: **Súly (kg), hízlalás alatti napi súlygarapodás (g/nap) alakulása**

Vérmérséklet (1)	1.mérés (4)	2.mérés (5)	3.mérés (6)	gyarapodás g/nap (7)
nyugodt (2) (1-2p, n=6)	19,5 ±0,71	29,5±0,71	38,1±4,07	643,68 ±154,13
ideges (3) (4-5p, n=7)	19,3 ±0,81	28,3±5,19	33,2±3,82	476,35 ±134,99

Table 1.: Some parameters of the lambs
temperament (1), calm group, (2), nervous group (3), first measure (3), second measure (4), third measure (5), weight gain per day (6);

2. táblázat: **A három mérés során megállapított hematokrit-értékek L/L**

Vérmérséklet (1)	1.mérés (4)	2.mérés (5)	3.mérés (6)
nyugodt (2) (1-2p, n=6)	0,317±0,033	0,319±0,051	0,309±0,038
ideges (3) (4-5p, n=7)	0,330±0,021	0,310±0,056	0,308±0,052
eltérés a csop. közt (7)	0,013	0,219	0,001

Table 2.: Average hematocrite measured at the three ampling time
difference between two groups (7)

3. táblázat: **A három mérés során megállapított globulinszint, g/L**

Vérmérséklet (1)	1.mérés (4)	2.mérés (5)	3.mérés (6)
nyugodt (2) (1-2p, n=6)	43,574±3,923	44,907±3,702	43,340±5,44
ideges (3) (4-5p, n=7)	40,638±5,417	41,957±4,314	48,982±10,92
eltérés a csop. közt (7)	2,936	2,950	-5,642

Table 3.: Average blood globuline amounts measured at the three sampling time.

4. táblázat: **A három mérés során megállapított átlagos trigliceridszint mmol/L**

Vérmérséklet (1)	1.mérés (4)	2.mérés (5)	3.mérés (6)
nyugodt (2) (1-2p, n=6)	0,259±0,153	0,172±0,019	0,262±0,120
ideges (3) (4-5p, n=7)	0,342±0,090	0,225±0,055	0,211±0,074
eltérés a csop. közt (7)	0,083	0,053	-0,051

Table 4.: Average blood trigliceride amounts measured at the three sampling time.

Súlygyarapodás

Vizsgálatunk során mérlegeléssel követtük az állatok gyarapodását, ami egy összetett hátterű tulajdonság. A választásig a bárányok súlygyarapodását elsősorban az anyák nevelőképessége, tejtermelése határozza meg, ezen időszak súlygyarapodásának öröklődhetősége alacsony. Esetünkben a két csoport (nyugodt és ideges) bárányai közel azonos kezdősúllyal (átlagosan 19,3 és 19,5kg) rendelkeztek *(1. táblázat)*. A hízlalás alatt a súlygyarapodás - megfelelő körülmények közt- már elsősorban az egyed saját termelőképességén múlik, öröklődhetőségi értéke közepes, tehát jól szelektálható (*Pajor*, 2011). Krónikus stressz esetén a szervezet felkészül az ismétlődő vészreakciókra és igyekszik raktározni: a glikogénraktárak kapacitásán túl nagy mennyiségű lipidet halmoz fel a zsírszövetben (főleg abdominális zsírként),

ráadásul mindezt a növekedés rovására (*Knott és mtsai*, 2007; 2010). Ez tovább rontja a takarmányértékesítést (a zsír energiatartalma duplája a fehérje vagy glikogén energiatartalmának) valamint a végtermék minőségét, mert a kisebb hízlalási végsúly mellett romlik a vágási kihozatal és zsírosabb lesz a hús (megváltozik a testösszetétel), továbbá a test össz mérete is csökken és ezzel a hús összmennyisége (*Knott és mtsai*, 2010). Így közvetetten komoly gazdasági károkat is okozhat.

A vérmérsékletnek komoly hatása lehet erre a tulajdonságra, a mi eredményeink is azt mutatják, hogy a nyugodt vérmérsékletű csoport átlagos teljesítménye *15,01%*-kal haladta meg az ideges vérmérsékletűekét: a nyugodt csoport átlagos súlya a harmadik méréskor *38,1kg*, míg az ideges csoporté *33,2kg* volt; az eltérés átlagosan több, mint 5 kg.

A hízlalás alatti napi súlygyarapodás = (3.mérés[kg]-1.mérés[kg]/hízlalás napok száma) x1000. Esetünkben a nyugodt bárányok átlagosan 167,32 g-mal többet gyarapodtak naponta, mint az ideges vérmérsékletű bárányok (*1. táblázat*).

Hematokrit

A stresszreakciók közül az azonnali, rövid távú változások közé tartozik a vérnyomás emelkedése és a vérben a sejtes alakok arányának növekedése. A lép a stresszreakció következtében összehúzódik, a benne tárolt vörösvértestek a keringésbe kerülnek, ezzel növelve a vér hemoglobin-tartalmát és így javítva a szervezet oxigén-ellátottság esélyét. (*Bórnez és mtsai*, 2009; *Hargreaves és mtsai*, 1990; *van Adrichem és mtsai*, 1992). Látható, hogy az idegesebb temperamentumú állatok véréből átlagosan *7,67%* -kal (+0,024 L/L) magasabb hematokritérték volt mérhető *(1. táblázat)*.

Globulin

A vér globulinszintjét az összfehérje és az albumin szintből származtatjuk, ezek meghatározása után a különbségük adja meg a vér globulintartalmát. A stresszreakciók közül a hosszú távú hatások közé tartozik, hogy az ideges vérmérsékletű állatok globulinszintje (*Kioukia-Fougia és mtsai*, 2002) csökken a nyugodtakéhoz képest. Ennek oka a stressz okozta immunszuppresszió, aminek akár komoly állategészségügyi, így gazdasági vonzata is lehet. A globulin frakcióba tartoznak ugyanis az immunglobulinok, amelyek a szervezet humorális immunválaszát képviselik; csökkenésük jelzi az immunrendszer renyhébb működését. A krónikus stressz a hormonális rendszer megváltoztatásával, az akut stressz pedig a táplálóanyagok elvonásával járul hozzá az immunrendszer működésének gyengítéséhez.

A vizsgált mintákban az ideges csoport átlagos globulinszintje *1,75 g/L*-el, vagyis *4,16%* -kal alacsonyabb volt a nyugodt csoportéhoz képest *(1. táblázat)*

Triglicerid

A vér triglicerid szintjének emelkedése (*Cockram és mtsai*, 2000) a stresszreakció során abból származik, hogy a szervezet igyekszik mozgósítani az energiaraktárait, katabolikus túlsúly érvényesül. A vérminták egyértelműen mutatják, hogy az ideges temperamentumú állatok ilyen jellegű stresszreakciója erősebb volt nyugodtabb társaikénál, azonos mértékű stresszorra reagálva. Az ideges csoport triglicerid-szintje *0,028 mmol/L*-rel vagyis *12,93%*-kal haladta meg a nyugodt csoport átlagos triglicerid-szintjét. (*1. táblázat*)

Következtetések és javaslatok

Vizsgálataink alapján megállapíthattuk, hogy azonos környezeti stresszor eltérő hatással volt az azonos fajtába tartozó, azonos korú bárányokra. A temperamentum függvényében eltérő stresszreakciót tapasztaltunk mind viselkedési, mind az anyagcsere válaszreakciójában. Ennek alapján jól el lehetett különíteni az ideges és a nyugodt vérmérsékletű csoportot, a vizsgált teljesítmény, a vér haematokrit, globulin és triglicerid szintje a vártnak megfelelően alakult: a nyugodt vérmérsékletű állatok minden paraméterben jobban teljesítettek.

Összességében elmondható, hogy a vérmérsékletre érdemes szelektálni, mert könnyen megállapítható, közvetlenül és közvetve javítja a termelést, az állatok egészségesebbek, valamint az állati welfare szempontjából is fontos lehet. Ha egy fajt háziasítunk és kiszakítjuk eredeti környezetéből, ne okozzunk felesleges szenvedést az olyan egyedek szaporításával, amelyek nehezebben viselik a megváltozott környezetet.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” és a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

Boissy A., Fisher A.D., Bouix J., Hinch G.N., Le Neindre, P. (2005): Genetics of fear in ruminant livestock. Livestock Production Science, 93. 23-32.

Bórnez R., Linares M.B., Vergara H. (2009): Haematological, hormonal and biochemical blood parameters in lamb: Effect of age and blood sampling time. Livestock Science, 121. 200-206.

M.S. Cockram, J.E. Kent, P.J. Goddard, N.K. Waran, R.E. Jackson, I.M. McGilp, E.L. Southall, J.R. Amory, T.I. McConnell, T. O'Riordan, B.S. Wilkins (2000): Behavioural and physiological responses of sheep to 16h transport anda novel environment post-transport. The Veterinary Journal, 159. 139-146

Dodd C.L., Pitchford W.S., Hocking-Edwards J.E., Hazel S.J. (2012): Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A Review. Applied Animal Behaviour Science, 140. 1-15.

Gougoulis D.A., Kyriazakis I., Fthenakis C.G. (2010): Diagnostic significance of behaviour changes of sheep: A selected review. Small Ruminant Research, 92. 52-56.

Hargreaves A.L., Hutson G.D. (1990): The Stress Response in Sheep during Routine Handling Procedures. Applied Animal Behaviour Science, 26. 83-90.

Kioukia-Fougia N.- Antoniou K.- Bekris S.- Liapi C.- Christofidis I.- Papadopoulou-Daifoti Z. (2002): The effects of stress exposure on the hipotalamo-pituitary-adrenal axia, thymus, thyroid hormones and glucose levels. Progress in Neuro-Psychopharmacology and biological Psychiatry, 26. 823-830.

Knott S.A., Cummins L.J., Dunshea F.R., Leury B.J. (2007): Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. Domestic Animal Endocrinology, 34. 261-268.

Knott S.A., Cummins L.J., Dunshea F.R., Leury B.J. (2010): Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotrpin hormone and insulin-induced hypoglycaemia in rams. Domestic Animal Endocrinology, 39. 137-146.

Pajor F. (2011): A vérmérséklet értékmérő tulajdonságként való alkalmazhatósága a juhtenyésztésben. PhD értekezés, Gödöllő, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.

Siebert K., Langbein J., Schön P., Tuscherer A., Puppe B.(2011): Degree of social isolation affects behavioural and vocal response patterns in dwarf goats (Capra hircus)

van Adrichem P.W.M., Vogt J.E. (1992): The effect of isolation and separation on the metabolism of sheep. Livestock Production Science, 33. 151-159.

Vanderheede M., Bouissou M.F., Picard M. (1998): Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. Applied Animal Behaviour Science, 58. 293-310.

JUHOK SZABADTARTÁSA NAGYÜZEMBEN

Intenzív bárányhústermelés technológiája

Munkácsi László

1138 Budapest, Népfürdő u. 19/D
mun1297@ella.hu

Összefoglalás

A szerző, a szarvasmarha technológiai váltás tapasztalatának birtokában, 1979 óta folytat kísérlet sorozatot és üzemi megfigyeléseket a pecsenyebárány termelés technológiájának korszerűsítése érdekében. Megoldásnak, hosszabb távon, az állatok szabadtartását választotta. Először tisztáznia kellett a hazai merinó fajta technológiai tűrőképességét a feltételezett körülmények között. A kísérletetek, megfigyelések eredményeként az Új-Zélandon kialakult, legelőn tartásos technológia hazai adaptációját javasolja a nagyüzemek számára. A lehetséges változatok közül 3 szabadtartásos teleptípust mutat be.
"A" 2000 anyás árútermelő teleprendszer (tulajdonosok Kovács Mihály és dr. Fekete József). Az épületnélkül tartott 700 merinó anya Aszódon részben a saját, részben a Dömsödön lévő, és végterméket előállító 1200 anya évenkénti utánpótlását látja el. A szabadtartásos teleprendszer működtetése előképe egy hibridbárány előállítási rendszernek
"B" 300 anyás törzstenyésztő telep (tulajdonos Dietrich János, Kisfüzes).A 110 ha gyepen törzskönyvezett, texel anyákat tartanak. A bárányok eladásig a bárányiskolában abrakot kapnak. A köponti kezelőrendszer, elvileg, lehetővé teszi a számítógépes termelésirányítást, és megkönnyíti az állatok egyedi kezelését. A központi szálláshely éjszakánként zárható.
"C" 1200 anyás törzstenyésztő telep (tulajdonos Ing. Jan Švéda. Zlin, Csehország). 2200 ha. gyepen a törzskönyvezett 1200 romney juh együtt legel a 220 angus fajtájú, húshasznú tehénnel. Téli időszakban a juhokat és a húsmarhákat elkülönítve, pihenődombos szálláshelyen tartják. A bárányokat vágóhídnak biobáránykénti értékesítik, a nyersgyapjút Angliába exportálják.

Open-air Keeping of Sheep in Large–scale Farms

Abstract

The author, having experience after the technology change in cattle breeding, has been doing research and making farm observations since 1979 to improve the technology of frying lamb production. He thinks that open-air keeping of sheep can be a long term solution. First he had to clarify the technological tolerance of the Hungarian Merino sheep breed under the alleged circumstances. As a result of this research and the observations he suggests the adaptation of the New Zealand pasture technology for Hungarian large scale farms. Out of the possible variations three types of farms are presented:
"A" Production Farm system with 2000 ewes (owners Kovács Mihály and dr. Fekete József,)). The 700 Merino ewes are kept in open-air circumstances to supply and replace mothers for production partly in Aszód and partly the 1200 ewes in Dömsöd producing end products. Operating the open-air farms system is a preview of a hybrid sheep production system.

"B" Breeding Farm with 300 ewes (owner Dietrich János, Kisfüzes). Registered Texel ewes are kept on 110 ha-s of grassland. The lambs stay in a separate place and they get concentrate until they are sold. A central control system provides possibility to follow production on computer and it also facilitates individual animal treatment. The central animal house can be locked at nights.
"C" Breeding Farm with 1200 ewes (owner Ing. Jan Švéda. Zlin, Csehország). On a grassland of 2200 ha-s 1200 registered Romney ewes graze toghether with 400 Angus beef cattle. In the winter period the sheep and beef cattle are kept separately on a hilly resting place. Lambs are sold as organic to slaughterhouses and the raw wool is exported to England.

Bevezetés

Az elmúlt század második felében a világ iparosodott térségeiben zajló állati eredetű termékek technológiáinak reformjából Magyarországon a juhászat lényegét tekintve kimaradt. A baromfi-, a sertés- és a szarvasmarha-tenyésztési ágazatok modernizálását, a döntéshozók, a világ akkor élenjáró technológiájának behozatalával és annak adaptálásával oldották meg. Mindhárom esetben komplex telepek formájában, sikeresen. Az akkori ágazati irányítás 1975-ben meghirdette a hazai juhászatok számára a tej- és húsirányú szakosítás lehetőségét is. Sajnos ez az intézkedés a vágóbárány termelésben eddig szerény eredményt hozott. Általános ma is a hagyományos, pásztoroló legeltetés, a hodálytartás valamint a merinó fajta használata. Ma már ez a technológia elavult, munkaigényes és drága. E miatt a nagyüzemek a juhászatok többségét felszámolta.
A szerző, 1979-ben kezdte el kísérleteit a hazai merinó állomány szabadtartásával, mint azok természetszerű tartásmódjával. Majd egy szerencsés külkereskedelmi körülmény lehetővé tette, hogy 1984-ben az állami gazdaságok vezetői, juhhústermelésben a világ piacvezető országából, Új-Zélandból két komplex kísérleti telepet importáltak, az akkori Mezőfalvi és a Lajta-Hansági Állami Gazdaságba. A két telep üzemeltetése jelentősen gazdagította az útkeresés lehetőségeit.

Anyag és módszer

A kutatás célja volt a közepes és nagyméretű gazdaságok számára, olyan húshasznú juh teleptípus kialakítása, amely meggyőző minta lehet azoknak a gazdasági vezetőknek, akik új, versenyképes juhhústermelést terveznek vagy ilyenné kívánják átalakítani meglévő juhászatukat.

A kutatás módszere

Az új, versenyképes tartástechnológia csak **komplex teleprendszerben** valósítható meg. A komplexitásba tartozik a választott fajta és annak tartásmódja, az állatok elhelyezése, ellátásának építési és gépesítési megoldása, a takarmányozás rendszere, esetünkben a gyepgazdálkodás, a legeltetés módszere, az állategészségügyi technológia, valamint a telepi munkák szervezése. A fajtaváltás önmagában zsákutca, mert nem elégíti ki a környezet és a genotípus kölcsönös megfelelésének követelményét.

Technológiai rendszer alapegysége a telep, mely magában foglalja a gyepgazdálkodástól kezdve az adott fajta tenyésztéstechnikáját, az állategészségügyi ellátást, a telepi munkaszervezést, az értékesítést, továbbá a vágóhídi feldolgozást, amely garantálja a mindenkori fogyasztói igény kielégítését.
- A választott import termeléstechnológiát minden esetben adaptálni kell a hazai sajátos éghajlati, állategészségügyi, takarmányozási és tartási körülményekhez.

- Az állatjóllét megvalósítása gazdasági érdek, amely, az állatok megfelelő ellátása esetén, növeli a hozamot és a hasznos élettartamot.

A kutatás és megfigyelések eredményeiből levont fontosabb következtetések

- A szabadtartásban azok a fajták érték el a legjobb eredményt, melyeknek csülökszaruja pigmentált és minél hosszabb, durvább volt a gyapjuk.
- A merinó fajta szilárd szervezetű, azonban szaporulati eredménye évről évre változó, bizonytalan. A fajta jelentős értéke, hogy az év bármely időszakában termékenyíthető. Tejtermelése közepes, és nem elégíti ki, a szükségletnek megfelelően, az ikerbárányok igényeit. Gondozása munkaigényes. Vágóértéke közepes.Gyapjának színvonalát az alacsony értékesítési ára minősíti. Csülökszaruja a különböző lábvég megbetegedésekre érzékeny. Összefoglalva megállapítható, hogy a merinó mint fajta bár elviseli a szabadtartás körülményeit, de nem versenyképes az intenzív, szabadtartásos rendszerekben használt fájtákhoz képest.

- Mindkét új-zélandi fajta, a romney és a corriedale, önellátó. Szezonálisan ivarzanak, meghatározottan a romney. Évente egyszer elletve, a szaporulatuk 140-180% között váltakozik. Elletésük emberi közbeavatkozást nem igényel. Jellemző rájuk az anya és báránya szoros kötődése. Nagy tejtermelésük révén a bárányok fejlődése intenzív. Rendszeres csülökápolást nem igényelnek, mivel a körmeik pigmentáltak, feketék. A szabadtartásra alkalmas fajták. A romneyt fajtatisztán, a corriedált fajtatisztán és kiemelkedő anyai tulajdonsága miatt keresztezéseknél is hasznosítható.
- Az állatjóllét gazdasági érdek is, mivel növeli a hozamot és a hasznos élettaratamot, ezért is érdemes az állandó csoportok kialakítására törekedni.
- A korábbi hazai félelem, hogy az új-zélandi juhfajták nem képesek elviselni a nálunk gyakori téli hidegeket. Ellenkezője igaz. A nyári meleg káros hatását kell ellensúlyozni árnyékolók létesítésével. A hőségnapok okozta legelőfű hiányát pótolni kell.
- A szabadon tartott juhok, ha választási lehetőségük van a szabadban vagy a hodályban tartózkodni, akkor csak a nyári melegben és a szeles esőben keresnek menedéket. A legnagyobb hidegben sem mennek épületbe. Nyáron a legelés fő időszaka a hajnal és a kora este.
- A jó minőségű villanypásztor, kellő karbantartással, alkalmas az állandó kerítés helyettesítésére.
- Állandó szálláshely esetén az ott lévő szénatárolók nyáron árnyékolók is. Ide tartozik a burkolt takarmányos tér, a fagymentes itató, a bárányiskola. A szálláshoz csatlakozó legelőszakaszok, kiegészítve a sajátosan kialakított válogató rendszerrel, nemcsak a folyamatos állománynyilvántartást teszik lehetővé, hanem a kerítésrendszer zárhatósága védelmet nyújt a kártevők, a lopások ellen.
- A bárányok anyák alól való értékesítése, nemcsak a választást és az elkülönített hízlalást teszi feleslegessé, hanem az ott felvehető szemestermény fogyasztásával, a bárányiskola állandó jelenléte hatékonyabbá teszi a bárányok fejlődését.
- A nyári aszályos időszakban, különösen a hőségnapokon (évente 20-25 nap), a legelő füve nem elegendő, mivel a vegetáció átmenetileg szünetel. Ilyenkor a szoptatós anyák számára természetes takarmánypótlás a széna és szükség szerinti abrakkiegészítés. Jó megoldás még a különféle kiegészítő legelők (szudáni fű, évelő rozs stb.) igénybe vétele.
- Az ikerbárányok napi ellátásához, az intenzív húshasznú anyák napi takarmányigénye megközelítőleg 25 kg legelő fű. Ezt a mennyiséget már a “feltétlen juhlegelők” nem képesek kielégíteni. Ezért a vetett vagy felújított legelők irányított legeltetése nélkülözhetetlen.

- A hazai klimatikus viszonyok között, az évenkénti egyszeri, tavaszi elletésnél és a nyár végi értékesítésnél ajánlott termelési ciklust az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: **Termelési ciklus a tavaszi elletés esetén**

A ciklus szakaszai (1)	Időpont (2)
Termékenyítés kossal	november 10-től december 31-ig
Ellés	április 10-től május 31-ig
Tenyésztésre jelöltek leválasztása	szeptember vége
Vágóbárányok értékesítési időpontja	augusztus 15-től

Table 1: The production cycle on spring lambing
section of the cycle (1), time (2)

- A szabadtartásos telep vezetése a technológia komplexitása, irányításának bonyolultsága miatt, felsőfokú szakmai képzettséget igényel.
- A telep tulajdonosának, illetve döntésre jogosult képviselőjének helyben lakása kívánatos. A lakóhely sokoldalú, kiegészítő funkciója (iroda, raktár, műhely stb.) rendkívül előnyös. Az állatállomány állandó felügyelete, a kritikus helyzetek időben való felismerése és azok korrekciója felbecsülhetetlen előny.
- A munkakutyák a technológia részei. Például a komondor, mint a nyáj védője, border-collie pedig mint terelő kutya, a vizsgálatok során nélkülözhetetlennek bizonyultak.

Terjesztésre javasolt teleprendszerek

“A” 2000 merinó anyás árutermelő teleprendszer
A megfigyelés időtartama:2000.01.24. – 2004.03.21.
Tulajdonosok: Kovács Mihály és dr. Fekete József

A 2000 anyás árutermelő, épületnélküli, szabadtartásos teleprendszert 1987-ben kezdték kialakítani, majd folyamtosan fejlesztették. Az anyák a legelőn ellenek, majd reggelenként, a nyáron üres szénatároló szín alatt, egyedi fogadtatókban minősítik és kezelik az állatokat. Aszódon a 700 merinó törzsanya nőivarú szaporulatát egyik évben a Dömsödön lévő és végterméket előállító 1300 anya kiegészítésére hasznosítják, a másik évben a saját utánpótlását fedezi. Aszódon a hímivarú utódok 50-60%-a közvetlenül az anyjuk alól exportra kerül. A gyengébb minőségű bárányokat pedig a Dömsöd-i bárányhízlaldába telepítik át, ahol az 1300 anya valamennyi szaporulatával együtt, hagyományos technológiával eladásig hízlalják. Aszódon évente egyszer vemhesítenek, november 15-től december végéig. Dömsödön folyamatosan termékenyítenek, végtermék előállításra alkalmas kosokkal. Aszódon 300 ha ősgyep elsődlegesen legelőként hasznosul. A hiányzó takarmányt, augusztustól a tél beálltáig, a környék gabona és kukorica tarlója pótolja. Dömsödön meghatározóan bérelt terület elégíti ki az állomány takarmányszükségletét. A legeltetés részben hagyományos, pásztoroló.

A teleprendszer értékelése: A telep több, mint 25 éves működése után megállapítható, hogy a merinó elviseli a szabadtatási körülményeket. Az állomány termelési eredménye, megegyezik, sőt

egyes mutatókban jobb is, mint a hazai merinót hagyományosan tartó gazdaságokban. A teleprendszer fő értéke, hogy előképe a hibridbárány előállításnak. (*Munkácsi L*. és *Patkós I*., 2006).

(„B") 300 anyás törzstenyésztő teleprendszer
(A megfigyelés időtartama:2006. 06.26. – 2010.02.25.).
Tulajdonos: Dietrich János, Kisfüzes

A 300 anyás törzstenyésztő telep Kisfüzesen terül el, ahol 200 húshasznú, törzskönyvezett texel anya és szaporulata termel, szabadtartásban. Évente egyszer, tavasszal elletnek. A rendelkezésre álló 110 ha takarmánytermő terület, amelyből a gyep területe 90 ha, villanypásztorral 8 szakaszra osztott. Az anyajuhok egész éven át, a nap 24 órájában bármikor, a központi szálláshelyről szabadon közelíthetik, a sajátosan kialakított úthálózaton, a számukra kijelölt legelőszakaszt. A szálláshelyen pihenő szín, egy burkolt etetőtér és szénatároló található. A telephely árammal és vezetékes vízzel ellátott. Nyári időszakban a juhok, az árnyékot adó, egyik szénatároló szín alatt pihenhetnek. A téli réti- és lucernaszénát körbálás önetetőkből, korlátozás nélkül, fogyaszthatják az állatok. A termékenyítés természetes és háremes. Az anyák a legelőn évente egyszer, tavasszal ellenek, és ellés után, az újszülötteikkel együtt, a nyáron üres szénatárolóban kialakított, csoportos 15-20 férőhelyes, gépesített fogadtatóba kerülnek A bárányok a bárányiskolában jutnak kiegészítő takarmányhoz. A vágóbárányokat anyjuk alól értékesítik. A szálláshely zárható.

A teleprendszer értékelése: A texel, Európa legintenzívebb húsjuha is, jól alkalmazkodott a szabadtartáshoz. Itt az állatok ellátását könnyítő önitatók, körbálás szénaetetők, a karámrendszer méretének változtathatósága, könnyű szerelhetősége lényegesen megkönnyíti a gondozást, a takarmányozást és a trágyaeltávolítást. A telepen kialakított 15-20 anya férőhelyes, mobil rendszerű, csoportos fogadtató újszerű megoldás. Az újonnan kialakított bárányiskola ellátásának gépesítése és alkalmazásának módja könnyebbé teszi e rendkívül fontos funkció ellátását. A központi szállásrendszerhez kapcsolódó szakaszos legeltetés műszaki megoldása újszerű. Ehhez a rendszerhez könnyen csatlakoztatható a kezelő-válogató rendszer és az on-line, számítógépes állomány-nyilvántartás. Azokon a telephelyeken, ahol fokozott szerepet játszik a vagyonvédelem, a szálláshely bekeríthető. Így azonos védelmet nyújt, mint az épület, anélkül, hogy korlátozná a juhok mozgásának lehetőségét.
(Munkácsi L., Patkós I., 2007.)

"C" 1200 anyás, szabadtartásos törzstenyésztő telep
A megfigyelés időtartama:2010.03.12. – 2013.05.14.
A tulajdonos egyúttal a Romney klub (egysesület) elnöke Ing. Jan Švéda. Zlin, Csehország.

A gazdaság romney állománya, az 1995-ben Mezőfalváról származó, 25 anya és egy kos vásárlásával kezdődött. Jelenleg a 2200 ha hegyvidéki gyepen 1200 törzskönyvezett romney anyajuh, az ugyancsak törzskönyvezett 220 angus fajtájú húsmarha tehenekkel, a 30-50 hektáros szakaszokon, együtt legelnek. Az állatok abrakot nem kapnak. Téli időszakban a fajokat elkülönítve, a legelőn kialakított, almozott pihenőhelyen tartják. Itt a szénát körbálás önetetőkből fogyasztják az állatok. A szálláshely közvetlen közelében vezetékes vizhálózat látja el az állatokat ivóvízzel. Midkét fajt természetesen termékenyítik. Évente egyszer, tavasszal elletik úgy a juhokat, mint a teheneket. A bárányokat születés után az ellőhelyen krotáliázzák, majd május közepén, a nyírással egybekötve, egyedileg lekezelik, oltják, és részletes nyilvántartásba veszik. Jelenleg Csehországban a közel 5000 romney anyából, a Romney Klub szervezetének keretében,

4000 romney anyát törzskönyvi ellenőrzés alatt tartanak. A bárányokat az eladás előtt egy hónappal egy közös hizlalótelepen tartják, ahonnan "biobáránykénť" értékesítik, nagyobbrészt Ausztriába. A nyersgyapjút válogatva bálázzák és Angliába exportálják. A gyep szakaszait stabil kerítésrendszerrel kombinált villanypásztorral határolják.
A 100 kg-os anyákkal és a 130 kg-os kosokkal jellemzett nyáj termelési és értékesítési adatai:
- A 100 anyára jutó szaporulata 170-180%
- A bárányok átlagos napi súlygyarapodása eléri a 300grammot,
- Az augusztus végén eladott bárányok átlagsúlya megközelíti a 40 kg-ot,
- Egy anyáról, átlag, 4,2 kg fehér színű, fényes, crossbred minőségű gyapjút nyírnak.

A juhokkal együtt tartott abedeen-angus húsmarha kiváló minőségű. A tehenek átlagsúlya meghaladja a 650 kg-ot. A juhokkal való együtt tartásának állategészségügyi akadálya nincs. Gazdasági előnye viszont jelentős, mert a vállalkozás folyamatos fizetőképességét javítja. Ugyanakkor a gyepen nem konkurensei egymásnak, más fűfajokat legelnek. Takarmányozási, szaporodásbiológiai, gondozási igénye a romney juhokéhoz hasonló. Mivel a két ágazat árbevétele kiegészíti egymást, ez az adottság lehetővé teszi, hogy a gazdaság önálló vállalatként működjön. Egy hektár legelő, műtrágyázás nélkül, a gazdaságban 1 angus tehenet vagy 6 anyajuhot tart el. A 100 anyára jutó borjúszaporult 90%. A borjak átlagos napi súlygyarapodása, abrak nélkül, eléri a 1300 grammot. A közel 300 kg-os borjakat késő ősszel választják, majd értékesítik.

A teleprendszer értékelése:
A romney húsjuh kiválóan alkalmas fajta a szabadtartás épületnélküli, nagyüzemi módszeréhez. Önellátó. Szaporodási funkciói ellátásához nem kell emberi közreműködés. Anyai tulajdonságai kiválóak. Ikerbárányai intenzív fejlődéséhez elegendő tejet termel. Az 500 anyás nyáj kezelési rendszere az irányított legeltetés, a válogatás, a bárányok egyedi ellátásának, az állategészségügyi kezelések nyíráshoz való szervezése is követendő példa. A romney juh és az angus húsmarha együtt tartása a hazai nagyüzemek számára javasolható.

A folyamatban lévő kutató munka

Bezenyén (Mosonmagyaróvár közelében) a volt katonai létesítmény 40 hektáros, bekerített legelőjén Udvardy Péter munkatársam, 160 új-zélandi eredetű, corriedale fajta anya húsjuhot tart. Ezek az állatok az év minden időszakában, természetes módon, korlátozás nélkül legelhetnek, és egy mesterséges tóból ihatnak. Ebben a tenyészetben 2006-óta folytatjuk a technológiai kísérleteket.

Munkánk során meggyőződtünk arról, hogy ez a fajta, a romneyhoz hasonlóan, kiválóan viseli az itteni takarmányozási és éghajlati körülményeket. Kiemelkedő anyai tulajdonságokkal rendelkezik, és hosszú élettartamú. Alkalmas arra, hogy a nagyméretű gazdaságokban is versenyképes bárányhúst állítson elő, részben fajtatisztán, részben egy keresztezési programban, mint anyai vonal. Kísérletünkben apai vonalként, a texel és a suffolk fajtát választottuk. A keresztezett bárányok, mint végtermékek, vágóhídi minősítéskor kiváló eredményt értek el. A zsidó egyházi munkacsoport 72 állatból, véletlen sorrendben, 32 bárány vágott testét, kivétel nélkül kóserként, alkalmasnak fogadta el, ami nyilatkozatuk szerint, nálunk még nem fordult elő. Ez az eredmény jogosít fel bennünket a kísérlet folytatására.

Távolabbi kutatási tervünk, a folyamatos fogyasztói ellátás érdekében, olyan vágóbárány-termelés technológia kidolgozása, amellyel az év minden szakában friss bárányhússal lehessen ellátni a fogyasztókat. A kezdeti lépések biztatóak. Rajtunk kívül ígéretes lépésként tekintjük az

Orosházi Tangazdaságban Jankó Béla kollégánk és a Karcagi Kutatóintézet szabadtartásos „karácsonyi bárány” előállítási kísérleteit.

Szolgáltatások a termelés biztonsága érekében

A hazai állattenyésztés fejlődésének tapasztalatai igazolják, hogy amilyen mértékben nőttek évről-évre az állatok fajlagos hozamai és az állományok mérete, olyan mértékben szélesedett a szolgáltatások köre, és bővült azok szakmai tartalma. Kimondható, hogy magas színvonalú szolgáltatások nélkül ma már nincs magas színvonalú termelés.

A leírtakat összegezve megállapítható, hogy az ismételt kísérletek, valamint az üzemi megfigyelések alapján a szabadtartásos, integrált bárányhús termelési technológia kielégíti az Európai Közösség 889/2008/EK számú rendeletében foglalt ökológiai, nevezetesen a környezetvédelmi, állatjóléti és állategészségügyi kívánalmakat. Ezért alkalmas márka-védjegy viselésére, és magyarországi terjesztésre.

Javaslatok:

Mintatelepek építése. A szabadtartásos vágóbárány előállítás technológiája az ismételt kísérletek eredményeként, széleskörű elterjesztésre alkalmas. A technológia mielőbbi elterjesztése érdekében, időszakonként, indokolt esetben egy-egy tájegységben, célirányos pályázat kiírásával és emelt szintű központi támogatással mintatelepek építésével, azok üzemeltetésének bemutatásával a folyamat jelentősen meggyorsítható. Ezzel egy időben nélkülözhetetlen, a fejőiskola mintájára „juhász iskola” szervezése. Ily módon, belátható időn belül elérhető, hogy egy új élelmiszer iparág alakuljon ki Magyarországon, akár 2 milliós juhállománnyal.

Végül köszönetet mondok a közreműködő juhászatok vezetőinek, továbbá Lengyel Zoltánnak a Kistermelők Lapja főszerkesztőjének és munkatársainak a bizalomért és szakmai segítségért, mellyel, kockázatot is jelentő, munkámat támogatták.

Felhasznált irodalom

Munkácsi L., Török Gy., Vas L., Toldi Gy. (1980): Anyajuhok téli szabadtartása félüzemi kísérletben. Állattenyésztés Tom. No. 6.

Munkácsi L., Czakó J., Mucsi I. (1984): Épületnélküli juh tartástechnológia kidolgozása és modellüzem megvalósítása. Kutatási jelentés, MÉM-MŰFA. Budapest.

Kukovics S., Gyúrós T., Thuróczy Z. (1989): Import és itt született corriedale juhok termelési tulajdonságai. Állattenyésztés és Takarmányozás, 38. 5.

Munkácsi L. (1993): Anyajuhok épületnélküli szabadtartása. Tudományos Közlemények 3. szám, DATE Állattenyésztési Főiskolai Kar, Hódmezővásárhely.

Munkácsi L. (1997): A tehenek és anyajuhok természetszerű tartásának tapasztalatai. Debreceni Agrártudományi Egyetem Tudományos Közleményei, Tom. XXXIII. Debrecen.

Munkácsi L. et al. (1997): Juhtenyésztés és –tartás, 206-236 p. Mezőgazda Kiadó.

Horak, F. (2005): Romney celosvětově významné plemeno ovcí s kombinovanou užitkovostí. Klub: ovcí plemene Romney (Romney juhok Csehországban). Brno 2005.

Munkácsi L.(2002): Open air breeding of merino ewes. Poster. Proceedings of the 6 th. World Merino Conference, Budapest.69 p.

Jávor A., Kukovics S., Molnár Gy.(2006): Juhtenyésztés A-tól Z-ig. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 99-137.

Szórádi T. (2006): A juh fajtája, ásványianyag-ellátása és a csülökszaru minősége közötti összefüggések vizsgálata. Doktori értekezés tézisei. Debreceni Egyetem AC.

Rawahi Romneys (2006): Stud History and Backround, http://www.nzrms.co.nz/background.htm

Munkácsi L., Patkós I. (2007): www.animalwelfare.szie.hu - Füzes-Farm Kft. 300 anyaférőhelyes, szabadtartásos juhtelepének tartástechnológiája

Nábrádi A. (2007): MTA Fenntartható fejlődés az állattenyésztésben. Állattenyésztés és Takarmányozás, Különkiadás. 56.5. 500-501.

Munkácsi L. (szerk.)(2009-2013): A juhok szabadtartása. Kistermelők Lapja könyvtára. Budapest. (1- 22 fejezet)

MC4R ÉS RYR1 GÉNEK POLIORFIZMUSÁNAK ÉS NAGY GENETIKAI KAPACITÁSÚ SERTÉSHIBRID TERMELÉSI PARMATÉREIENEK ÖSSZEFÜGGÉSVIZSGÁLATA

Nyisalovits Andrea[1], Posta János[2], Czeglédi Levente[2], Juhász Diána[1], Babinszky László[1]

[1]Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszék
[2]Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Állattenyésztéstani Tanszék
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
nyisalovits@agr.unideb.hu

Összefoglalás

Napjaink mezőgazdaságának egyik legnagyobb kihívása a fenntarthatóság. Ennek megfelelően a piaci igényeket kielégítő jó minőségű állati termékeket rövid idő alatt és gazdaságosan kell előállítani. Annak érdekében, hogy jó minőségű állati eredetű terméket tudjunk előállítani az állatok takarmányozását és táplálóanyag ellátását az állomány genetikai profiljára kell alapozni. Az MC4R (melanocortin 4 receptor) fontos szerepet játszik az emlősök energiaforgalmának szabályozásában. A receptor hetedik transzmembrán doménjában aminosavcserét (Asp298Asn) okozó pontmutáció az eddigi vizsgálatok alapján befolyásolja a tömeggyarapodást, a zsírdepozíciót és a takarmányfelvételt. A RYR1 (ryanodin receptor) T1843C mutációja a malignus hipertermia vagy PSS (porcine stress syndrome) okozója. Jelenléte homozigóta formában kedvezőtlenül hat az állatok stressztűrő képességére, ami jelentős elhullást okoz az állományokban. Jelen vizsgálat célja az MC4R és RYR1 génekben már korábban közölt polimorfizmusoknak és egy nagy genetikai kapacitású sertéshibrid termelési paramétereinek összefüggésvizsgálata restrikciós fragment hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) segítségével.
Kulcsszavak: MC4R, RYR1, SNP, sertés, termelési paraméterek

Association analysis of polymorphism in MC4R and RYR genes with carcass traits of geneticali imroved hybrid pigs

Abstract

Nowadays, one of the biggest challenge in agriculture is the sustainability. Animal food products in high quality to meet market needs must be produced rapidly and economically accordingly. In order to be able to produce such high quality products the feeding and nutrient supply of the animals need to be based on the genetic profile of the herd. The MC4R (melanocortin 4 receptor) play an important role in regulation of energy balance in mammals. The previously described non-synonymous polymorphism (Asp298Asn) within the seventh transmembrane domain of the receptor seems to have some effect on weight gain, fat deposition and feed intake. The T1843C

substitution in RYR1 (ryanodine receptor) cause the porcine stress syndrome (PSS; malignant hyperthermia). The homozygous form of the mutation has negative impact on stress tolerance in animals causing significant mortality in herds. The aim of this study is to define the connection between the previously described polymorphisms in MC4R and RYR genes and their potential association with production traits in an improved pigs using restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).
Keywords: MC4R, RYR1, SNP, pig, production traits

Irodalmi áttekintés

A genetikai markerek alkalmazása az állattenyésztésben lehetőséget adhat olyan tulajdonságok szelekciójára, melyek fenotípusosan nehezen mérhetőek. Alkalmazásukkal gyorsabb szelekciós előrehaladás érhető el *(Tenke és Babinszky, 2012).* A mennyiségi tulajdonságok genetikai háttere összetett, a genetikai és a fenotípusos tulajdonságok összefüggésének megértése még sok lehetőségeket tartogathat az ideális fehérje- és testzsírarányokkal rendelkező vonalak kialakítására.

A sertéstenyésztésben jelenleg alkalmazott markerek *(Dekkers, 2004)* közül az MC4R és a RYR1 gének pontmutációját választottuk vizsgálatunkhoz. A melanocortin rendszer elemei a proopiomelanocortin (POMC) neuronok által termelt peptidek, a peptidek G-protein kapcsolt receptorai és az endogén melanocortin antagonisták. A POMC gének hipotalamikus régióban történő expresszióját a tápláltsági szint szabályozza, melyről az elsődleges információt a leptin hormon mennyisége jelzi *(Millington, 2007).* A MC4R a központi idegrendszerben mindenhol megtalálható. A *Kim és mtsai (2000)* álatal leírt, a receptor hetedik transzmembrán doménjában található G1426A mutáció a gén kódoló szekvenciájában Asp298Asn aminosavcserét okoz. *Kim és mtsai (2004)* szerint a G allél (Asp) szükséges a jelátvitel receptor-G-protein-adenilát-cikláz útvonalon történő normál működéséhez. Az aminosav csere számos eddigi kutatási eredmény alapján összefüggésbe hozható a hátszalonna vastagsággal, a takamányfelvétellel, a testösszetétellel és a növekedéssel (*Chen és mtsai, 2004; Dvořáková és mtsai, 2011, Hernández-Sánchez és mtsai, 2003; Jokubka és mtsai, 2006; Kim és mtsai, 2000; Munoz és mtsai, 2011; Ovilo és mtsai, 2006; Piorkowska és mtsai, 2010, Stachowiak és mtsai, 2005; Tempfli és mtsai, 2013, Van den Maagdenberg és mtsai, 2007).*

Ismert és legpontosabban leírt, a húsminőséget befolyásoló gén sertésnél a HAL/RYR1 gén. A RYR1 gén az izom szövet Ca2+ szintjének szabályzásáért felelős gének egyike. Ez a gén a vázizom szarkoplazmatikus retikulumában lévő Ca2+ release csatorna egyik alegységét kódolja. A gén a 6. kromoszómán található, T1843C csere hozza létre a mutáns fenotípust *(Fujii és mtsai, 1991).* Az mutáns allélt homozigóta formában hordozó állatokra jellemző a PSS (Porcine Stress Syndrome), stressz hatására elhullanak. Az ilyen genotípusú állatok húsa a PSE (Pale, Soft, Exudative – szürke, puha, száraz) minőségi kategóriába tartozik.

Jelen vizsgálat célja az MC4R és RYR1 génekben már korábban közölt polimorfizmusoknak és egy nagy genetikai kapacitású sertéshibrid termelési paramétereinek összefüggésvizsgálata restrikciós fragment hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) segítségével.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok

A kísérletbe 500 db, 273 ártány és 227 fiatal nőivarú (emse) nagy genetikai kapacitású *(Close, 1994)* hibrid sertés került beállításra 2 istállóban. A kísérletbe vont állatok 3 vonalas (nagy fehér, lapály és duroc) anyák és szintetikus stresszmentes pietrain apaállatok keresztezéséből származtak. A kísérleti állatokat átlagosan a 73. életnapjukon telepítették be kettő, 650 férőhelyes hízó istállóba. Minden istállóban kutricánként 25-30 vegyes ivarú egyed került elhelyezésre. A mélyalmos istállókban a nedves takarmány etetése önetetőkből történt, az ivóvíz szopókás önitatókból ad libitum állt az állatok rendelkezésére. Az etetett takarmány táplálóanyag tartalma megfelelt az idevonatkozó ajánlásoknak *(Magyar Takarmány Kódex, 2004).*

Az állatok átlagos betelepítési súlya a két istállóba 29,3 illetve 30,7 kg volt. A kísérlet zárásakor (111 ill. 118 napi hízlalás után) az állatok átlagos élősúlya 112±9,4 kg (1. istálló) illetve 120,6±9,2 kg (2. istálló) volt. A kísérlet ideje alatt a napi gyarapodás 745,9±84,7 g (1.istálló) illetve 761,8±77,6 g (2. istálló) volt.

A vágott testek minősítése méréssel és szúrószondás műszerrel történt. A minősítés során a mindkét istálló állatainál meghatároztuk a hátszalonna-vastagságot, a karaj keresztmetszetet, a hideg súlyt és a színhús százalékot.

Genotipizálás

A genetikai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karának Állattudományi Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézetének Állatgenetikai Laboratóriumában végeztük. A vérminta istállónként összesen 250 ártányból és emséből steril tűvel (0,9x38 mm) a vena cava cranialisból S-monovett (4,9 ml) vérvételi csövekbe (Sarstedt AG&Co) került levételre. A vérminták tárolása a vizsgálatokig -20 ^{o}C-on mélyhűtőben történt.

A vérminták feldolgozása során a genomi DNS-t *Zsolnai és Orbán (1999)* leírása alapján izoláltuk. Az előkészített DNS mintákat -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatig.

A G1426A (GenBank: AB021664.1) és a T1843C (GenBank: M91452.1) mutációt tartalmazó génszekvencia az NCBI (Internet 1) adatbázisban található. Ez alapján terveztük meg a PCR konstrukciót. A primereket a BatchPrimer3 v.1.0 nevű interneten elérhető szoftver segítségével terveztük (Internet 2).

MC4R forward primer: 5'ATTGGGGTCTTTGTGGTCTG3',
MC4R reverse primer: 5'CCAGGGGATAGCAACAGATG3', (feltapadási hőfok: 64 °C)
RYR1 forward primer: 5’AGACCTTTCTCTTTGACCTTGAT3’,
RYR1 reverse primer: 5’CCAGACCTGGTGACATAGTTGA3’ (feltapadási hőfok: 58 °C)

A PCR elegy 10 µl végtérfogatban tartalmazott kb. 100 ng genomiális DNS-t, 0,2 mM dNTP-t (Fermentas), 1µl 10x DreamTaq™ Green Buffer-t, 1 pmolt mindkét primerből (Sigma-Aldrich Kft) továbbá 2U DreamTaq™ Green polimeráz enzimet (Fermentas). A puffer magnézium tartalmának (20 mM) kiegészítésére további magnézium-klorid oldatot (25 mM) használtunk, így a végkoncentrácó a reakcióelegyben 3,75 mM volt.

A PCR reakció hőmérséklet-kondíciói a következők szerint váltakoztak: denaturáció 10 percig 95 °C-on, majd 35x ismétlődtek a denaturáció (30 sec 95 °C) – feltapadás (30 sec) – lánchosszabítás (30 sec 72 °C) lépések, ezt követte még 5 perc 72 °C-on zárta le a folymatot. A vizsgálatokat MJ PTC-200 PCR (ESCO) készülékkel végeztük.

A restrikciós analízist TaqI (MC4R) és HhaI (RYR1) (Fermentas) enzimmekkel végeztük. A G1426A mutáció G allélja a TaqI enzim felismerő helyét (5' T'CGA 3') hozta létre, így az A allélt tartalmazó szakaszok 217 bázispár hosszúak maradtak, míg a G allélt hordozó szakaszok 142 és 75 bázis hosszúságúra hidrolizálódtak szét, a restrikciós analízishez 13 µl végtérfogatban 10 µl PCR terméket, 3 U enzimet és 10x BufferR-t használtunk. Az enzimatikus hidrolízist 3 órán keresztül 65 °C-os hőmérsékleten vízfürdőben végeztük.

A T1843C mutáció C allélja a HhaI enzim felismerő helyét (5' GCG'C 3') hozta létre, így az T allélt tartalmazó szakaszok 329 bázispár hosszúak maradtak, míg a C allélt hordozó szakaszok 239 és 90 bázis hosszúságúra hidrolizálódtak szét, a restrikciós analízishez 13 µl végtérfogatban 10 µl PCR terméket, 2 U enzimet és 10x BufferR-t használtunk. Az enzimatikus hidrolízist 3 órán keresztül 37 °C-os hőmérsékleten vízfürdőben végeztük.

Az allélok elkülönítését 1,5%-os agaróz (Lonza) gélen végeztük, a gélhez GelRed (Biotium Inc.) gél-festéket adtunk, a futtatás 1x-os TAE pufferben (Lonza) 100 V feszültségen 30 percen keresztül történt.

Statisztikai vizsgálat

Annak megállapítására, hogy az egyes genotípusok eloszlása azonosnak tekinthető-e a két istállóban Chi^2 próbát alkalmaztunk

Annak meghatározására, hogy vizsgált allélok hatással vannak-e valamelyik termelési tulajdonságra SAS 9.1 szoftverrel variancia analízist végeztünk, azon belül a GLM eljárást – Tukey-Kremer korrekcióval – használtuk *(SAS, 2007).* A variancia analízis modellje a következő volt:

$$y_{ijk}=\mu+MC4R_i+I_j+e_{ijk}$$

y_{ijk}=függőváltozó
μ=főátlag
$MC4R_i$=genotípus okozta eltérés (i=AA, AG, GG)
I_j=ivar okozta eltérés (j=ártány, fiatal nőivarú)
e_{ijk}=maradék hiba

Fix hatásként figyelembe vettük az ivart. A vizsgált genotípus csoportokban az eltérő n szám miatt, az adatok LS mean (a legkisebb négyzetek átlaga) értékkel kerültek megadásra.

Eredmények és értékelés

Az egyedek genotípusvizsgálatát mind az 500 egyeden sikerült elvégezni. A RYR1 mutációra nézve (*1. ábra*) az állomány egységesen homozigóta TT (vad) genotípust mutatott, vagyis stresszmentesnek bizonyult. Az MC4R gén (*2. ábra*) esetében elvégeztük az allélgyakoriság vizsgálatot 500 egyeden. Az allélok előfordulása az 1. istállóban A=0,43; G=0,57 illetve a 2. istállóban A=0,47; G=0,53 volt. Az állomány Hardy-Weinberg egyensúlyban volt, illetve a két minta sem tért el egymástól. Az allél és genotípus gyakoriságokra vonatkozó szakirodalom állományonként nagy változatosságot mutat *(Kim és mtsai, 2000). Jokubka és mtsai (2006)* által litván nagyfehér állományban illetve *Dvořáková és mtsai (2011)* által cseh hibrid állományokban leírt allélgyakoriságok (A=0,41, G=0,59) megegyeznek az általunk vizsgált állományban számított adatokkal. A vágóhídon 494 állat adatait rögzítettük. 405 állat esetében tudtuk egyértelműen beazonosítani a genotípust és az állatokhoz tartozó vágóhídi minősítési

adatokat. Az állatokat a vágás időpontja alapján két csoportba soroltuk. A variancia analízist 210 illetve 195 egyed adatai alapján végeztük el *(1.táblázat).*

***1. ábra*: A HhaI enzimmel emésztett PCR termék elektroforetikus képe.**
(M: 50 bp-os molekula marker (Invitrogen); 1: emésztetlen PCR termék, 2-8: TT genotípus)

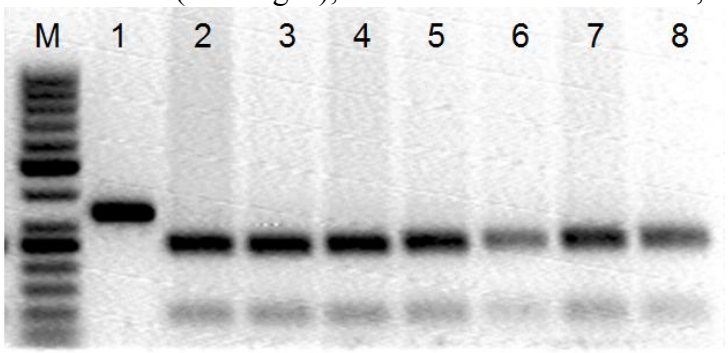


Figure 1: Electroforetic picture of PCR product resctricted by HhaI enzyme
(M: 50-bp ladder of molecular weight markers (Invitrogen); lane 1: undigested PCR product, lane 2-8: TT genotype pattern)

***2. ábra*: A TaqI enzimmel emésztett PCR termék elektroforetikus képe.**
M: 50 bp-os molekula marker (Invitrogen); 1-3: AA genotípus, 4: AG genotípus, 5: GG genotípus

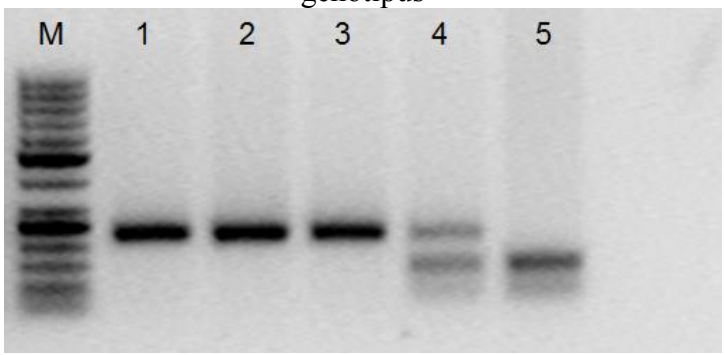


Figure 2: Electroforetic picture of PCR product resctricted by TaqI enzyme
M: 50-bp ladder of molecular weight markers (Invitrogen); lane 1-3: AA genotype pattern, lane 4: AG genotype pattern, lane 5: GG genotype pattern

Az *1.táblázat* adatai alapján megálapíthatjuk, hogy sem az ivar, sem a genotípus szignifikáns hatását nem tudtuk igazolni a termelési paraméterekre, annak ellenére, hogy az aminosav csere intramuszkuláris zsírtartalomra, színhúskihozatalra, hátszalonnavastagságra és növekedésre gyakorolt hatásáról számos szerző számolt már be.

Az intramuszkulásris zsírtartalom *Stachowiak és mtsai (2005)* illetve *Piorkowska és mtsai (2010)* szerint a G allél hordozóinál magasabb, *Van den Maagdenberg és mtsai (2007)* ezzel ellentmondásban lévő eredményre jutottak, míg *Ovilo és mtsai (2006)* nem tudtak szignifikáns összefüggést igazolni. A színhúskihozatalra és az egyes húsrészek méretére vonatkozóan is ellentmondásosak az adatok. Egyes szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az A allél

jelenléte rontja a színhús arányát illetve az egyes húsrészek méretét a vágott féltestben (*Dvořáková és mtsai, 2010, Ovilio és mtsai 2006, Piorkowska és mtai, 2010; Van den Maagdenberg és mtsai, 2007)*, de *Jokubka és mtsai 2006*, *Chen és mtsai 2004* illetve *Stachowiak és mtsai (2005)* ennek az ellenkezőjét írták le. A G allélt a legtöbb szerző (*Kim és mtsai, 2000; Hernández-Sánchez és mtsai, 2003, Ovilio és mtsai 2006; Tempfli és mtsai, 2013; Van den Maagdenberg és mtsai, 2007*) kisebb hátszalonnavastagsággal és kisebb napi gyarapodással hozta összefüggésbe. Ezzel ellentétes eredményre csak két szerző jutott (*Jokubka és mtsai*, *2006* és *Chen és mtsai, 2005*).

***1. táblázat*: Az ivar és az MC4R gén Asp298Asn polimorfizmusának hatása a vizsgált paraméterek átlagára**

	Ivar (8)			Leptin				
	Ártány* (9)	Nőivarú (10)	P	AA	AG	GG	P	RMSE
1. istálló (1)								
n	119	91		41	104	65		
Hátszalonna vastagság (mm) (2)	16,4	17,4	0,055	16,8	17,1	16,9	0,906	4,0
Karaj k.metszet (mm) (3)	60,8	61,5	0,475	60,9	61,0	61,6	0,790	6,3
Színhús (%) (4)	57,5	56,8	0,090	57,2	57,0	57,2	0,906	3,2
Élősúly (kg) (5)	111,20	113,42	0,093	113,01	111,39	112,54	0,579	9,4
Hízlalás alatti átlagos ttgy. (g/nap) (6)	738,2	758,2	0,093	754,5	739,9	750,3	0,579	84,6
2. istálló (7)								
n	102	93		34	113	48		
Hátszalonna vastagság (mm) (2)	16,8	17,1	0,556	16,8	16,9	17,1	0,946	3,6
Karaj k.metszet (mm) (3)	63,3	64,4	0,157	64,6	64,4	62,5	0,081	5,2
Színhús (%) (4)	57,5	57,4	0,763	57,6	57,5	57,2	0,769	2,9
Élősúly (kg) (5)	119,18	120,74	0,229	118,81	121,99	119,08	0,073	9,0
Hízlalás alatti átlagos ttgy. (g/nap) (6)	749,5	762,7	0,229	746,3	773,3	748,7	0,073	76,4

*Legkisebb négyzetek átlaga (11)

The effect of gender and Asp298Asn polymorphism of MC4R gene on average of examined traits
Stable1(1), Backfat thickness measured between the 2nd and 3rd ribs(2), Diameter of loin measured between the 2nd and 3rd ribs(3), Lean meat%(4), Live weight at slaughter(5), Average daily gain during weaning(6), Stable 2(7), Gender(8), Barrow(9), Gilt(10), Least square means(11)

A mennyiségi tulajdonságok vizsgálata nehézkes az összetett genetikai háttér miatt. Az egyes fajtáknál meglévő genetikai különbség módosíthatja a gének kifejeződésének mértékét, így egy-egy pontmutáció hatása adott állatban nem feltétlen jelenik meg markánsan. Ez lehet az egyik oka annak, hogy az irodalmi adatok nem egységesek, illetve nem tudtuk a pontmutáció szignifikáns hatását kimutatni a vizsgált termelési paraméterekre. A biológiai funkciója alapján a gén potenciális marker szerepet tölthet be, mivel leptin hormonon keresztül érkező „jóllakottság" jelet juttatja el a központi idegrendszerbe. A receptor normális működéséhez szükséges a G allél megléte. Az MC4R gén biológiai funkciója és az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a G allél jelenléte csökkenti a zsírdepozíciót, hiszen az A alléllal rendelkező egyedek nagyobb tömeggyarapodását elsősorban a vastagabb hátszalonna okozhatta, mintsem a húsrészek növekedése.

Következtetések és javaslatok

A fenti adatok fényében megállapíthatjuk, hogy az állomány nem hordozza a stresszérzékenységre hajlamosító RYR1 mutációt. Az MC4R mutáció termelési paraméterekre gyakorolt hatása ellentmondásos, akár egy szakrodalmon belül is *(Kim és mtsai, 2000*), aminek oka lehet az egyes fajták között meglévő genetikai különbség, hiszen minden gén működését, kifejeződésének mértékét befolyásolja a "genetikai környezet", azaz a többi gén hatása. A termelési paraméterek mind sok génes tulajdonságok, ezért pontosabb eredmény érhető el, ha több gén hatását egyszerre vizsgáljuk az adott populációban.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalomjegyzék

Chen M., Wang A., Fu J., Li N. (2004): Different allele frequencies of MC4R gene variants in Chinese pig Breeds. Arch. Tierz., 47. 5. 463-468

Close, W. H. (1994): Feeding new genotypes: establishing amino acid/energy requirements. Principles Pig Sci., 9. 123-140.

Dekkers, J. C. M. (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. J Anim Sci, 82. E313-E328.

Dvořáková V., Stupka R., Šprysl M., Čítek J., Okrouhlá M., Kluzáková E., Kratochvílová H. (2011): Effect of the missense mutation Asp298Asn in MC4R on growth and fatness traits in commercial pig crosses in the Czech Republic. Czech J. Anim. Sci., 56. 4. 176–180

Hernández-Sánchez J., Visscher P., Plastow G., Haley C. (2003): Candidate gene analysis for quantitative traits using the transmission disequilibrium test: the example of the melanocortin-4 receptor in pigs. Genetics, 164. 637–644.

Jokubka R., Maak S., Kerziene S., Swalve H. H. (2006): Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs Anim. Breed. Genet. 123. 17–22

Kim K. S., Larsen N., Short T., Plastow G., Rothschild M. F. (2000): A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. Mamm Genome, 11. 2. 131–135.

Kim K. S., Reecy J. M., Hsu W. H., Anderson L. L., Rothschild M.F. (2004): Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin four receptor in domestic pigs. Domestic Animal Endocrinology, 26. 75–86.

Magyar Takarmány Kódex. 2004. Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet,Budapest

Millington, G. W. M. (2007): The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. Nutrition & Metabolism, 4. 18.

Muńoz G., Alcázar E., Fernández A., Barragán C., Carrasco A., de Pedro E., Silió L., Sánchez J. L., Rodríguez M.C. (2011): Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc×Iberian crossbred pigs. Meat Science, 88. 169–173.

Óvilo C., Fernández A., Rodríguez M. C., Nieto M., Silió L. (2006): Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. Meat Science, 73. 42–47.

Piórkowska K., Tyra M., Rogoz M., Ropka-Molik K., Oczkowicz M., Rózycki M. (2010): Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. Meat Science, 85. 297–301.

SAS Institute Inc (2007) SAS OnlineDoc® 9. 2. Cary NC: SAS Institute Inc

Stachowiak M., Szydlowski M., Obarzanek-Fojt M., Switonski M. (2005): An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. Animal Genetics, 37. 55–57.

Tempfli K., Simon Zs., Simon Z., Bali Papp Á. (2013): A melanokortin-4 receptor és a leptin polimorfizmusának vizsgálata mangalicaxduroc és mangalica sertésekben. Magyar Állatorvosok Lapja, 135. 339-344.

Tenke J., Babinszky L. (2012): A molekuláris genetika alkalmazásának lehetőségei a hízósertések takarmányozásában. Magyar Állatorvosok Lapja. 134.: 179-188.

Van *den Maagdenberg K., Stinckens A., Claeys E., Seynaeve M., Clinquart A., Georges M., Buys N., De Smet* S. (2007): The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. Animal, 1. 8. 1089–1098.

Zsolnai A., Orbán L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. Electrophoresis, 7. 1462-1468.

Internetes hivatkozások:

Internet 1 : http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Internet 2: http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/overview.html

A PULYKA FERTŐZŐ VAKBÉL- ÉS MÁJGYULLADÁS (HISZTOMONADÓZIS) MEGELŐZÉSÉNEK ÚJ, GYÓGYSZERMENTES VÉDEKEZÉSI FORMÁJA

Oláh János[1]; Győri Zsolt[1]; Hutás István[2]; Treuer Ákos[2]; Csépányi Balázs[2]; Páli Jenő[2]; Janan, Janbaz[2, 3]

[1]Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, 4032 Debrecen, Böszörményi út 138; [2]Pharmatéka Bt, 1141 Budapest, Cinkotai út 93/C; [3] Szent István Egyetem, Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.
olahja@agr.unideb.hu

Összefoglalás

A fertőző vakbél- és májgyulladás (hisztomonadózis) főként növendék pulykákban (ritkán tyúk, gyöngytyúk) előforduló betegség. Ezt egy egysejtű parazita, a Histomonas meleagridis okozza, amivel egy féreg (Heterakis gallinarum) felcsipegetése során fertőződnek az állatok. A féreg a tyúk vakbelében élősködik, és ennek petéivel jut a histomonas a pulyka belébe. A betegség a májban gócos elhalásos gyulladás kialakulásával jár és az állományokban tömeges elhullást okozhat. Pulykaállományunkban a tavalyi esztendőben észrevettük, hogy csökken az állatok takarmány-értékesülése, így az állatok nem a megfelelő ütemben növekedtek, a kifutókban pedig híg bélsárra lettünk figyelmesek. Az ilyen bélsarat ürítő egyedek folyamatosan gyengültek, vérszegények lettek és el is pusztultak. A tünetek a fertőző vakbél- és májgyulladás, közismert néven a black head disease nevű betegségre volt jellemző. Ez a betegség vakbél- és májgyulladást okozott, amely nagyfokú mortalitást eredményezett. Felboncolás során térképszerű elhalásokat találtunk a májban. A gyógykezelések különböző antibiotikumokkal nem voltak eredményesek, ezért később egy Black-Stop nevű, növényi illóolajokat tartalmazó takarmány-előkeveréket etettünk.

A gyógykezelést 2012. augusztus hónapban kezdtük alkalmazni 818 állaton, amelyből 491 db bronz- és 327 db rézpulyka volt. A gyógykezelés 2013 áprilisáig tartott. A Black Stop takarmány-előkeverék adagolását október közepétől, az előírtak szerint végeztük, amely 5kg/tonna volt. A különböző antibiotikumos kezelések hatására nem történt javulás az állatok egészségi állapotában, sőt az elhullások számának növekedését tapasztaltuk. A Black-Stop hatására az elhullások száma visszaesett.

A 9 hónapon át tartó kezelés folyamán 200 darab állat pusztult el. Az első három hónapban az antibiotikumos kezelés során 130 darab állat pusztult el, amely az elhullások 65%-át jelentette. A kezelés fennmaradó hat hónapjában a Black-Stop készítmény alkalmazásával az elhullást 70 darabra sikerült csökkenteni, amely az összes elhullás 35%-át jelentette.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy léteznek olyan alternatív betegség-megelőzési technológiák, amelyek az állatok ellenálló-képességének növelésére, valamint a jobb és magasabb termelési mutatók kiaknázására felhasználhatók anélkül, hogy bármilyen kárt okozzunk az élő környezet más résztvevőire, és így lehetőség nyílik az egészséges emberi táplálkozásra is.

Kulcsszavak: Black-head betegség; Histomonas meleagridis; pulyka

Ez a munka a GOP 1.1.1-11-2011-0058-s pályázat támogatásával készült.

A new medicine-free method to prevent the development of histomonosis (infectious appendicitis and hepatitis) in turkey

Summary

Histomonosis (blackhead disease) appears mainly in upgrowing turkeys, but rarely in chickens and guinea fowls, too. It is caused by a protozoan parasite *Histomonas meleagridis*, hosted by a nematode *Heterakis gallinarum*. Through picking up the said nematode, turkeys get infected. Basically, the nematode is located in the chicken cecum as a parasite, and its eggs deliver Histomonas to the turkey intestines. Blackhead resulted in focal necrotic inflammation in the liver and concomitantly, high level of mortality in the livestock.

Last year we recognized in our turkey livestock that the feed conversion ratio had reduced, the growth of the animals had not approached the required level and soft faecal appeared in the stables. Those animals which defecated this type of faeces weakened continuously, then became anaemic and died. These symptoms were induced by the disease called blackhead. In the course of dissection, large, pale, circularly depressed areas (lesions) were found in the liver. Since treatment on blackhead with different kind of antibiotics did not prove to be successful, later we started to feed animals with the Black-Stop premixture that contains plant volatile oils.

We started treatment on 818 animals involving 491 bronze and 327 copper turkeys in August 2012. Treatment was continued until April 2013. We dosed Black-Stop feed-additive premixture according to the recommended dosage (5 kg / 1 metric ton of feed) from the middle of October. There were no improvement in the health state of the animals treated by different kind of antibiotics, instead, mortality increased. On the contrary, the administration of Black-Stop resulted in a significant decrease in the number of perished (died) animals.

During the 9-month-long treatment, entirely 200 animals died. 65% of them (i.e. 130 animals) died in the first 3 months during the antibiotic treatment, while the rest of the animals (35%) died during the next 6 months, when the application of the Black-Stop premixture successfully reduced the rate of mortality.

In summary, we can state that there are alternative technologies to prevent diseases which are based on the improvment of the immune system and the capability of biological resistance, as well as enable to achieve higher production indices, without causing any damages on other participants of the living environment. Thus healthy human diet becomes possible to be provided as well.

Keywords: Blackhead disease; Histomonas meleagridis; turkey

This work was supported by GOP 1.1.1-11-2011-0058 grant.

Irodalmi áttekintés

A *hisztomonadózis*-t (*blackhead betegség*) egy protozoon parazita, a *Histomonas meleagridis* okozza, ami egy újabb fenyegetést jelenthet a baromfi ágazatra; azon belül is a pulykára a legveszélyesebb. A Histomonas meleagridis 8-19 µm nagyságú gömbölyded, nagyfokú változékonysággal bíró véglény. Amíg a vakbélben egy-kettő ostorral figyelhető meg, addig a szövetekben ostor nélküli alakjában jelenik meg (*Radnai,* 2008). A betegségre való fogékonyság eltérő a különböző madár fajokban. Pulyka esetében fertőződéskor a mortalitás elérheti akár a 100%-ot is, ezzel szemben a csirkék nagyrésze fertőződés esetén sem mutatja a tüneteket, de hordozza a betegséget (*McDougald*, 2005). A hisztomonaszok szervezetbe történő bejutását a *Heterakis gallinarum* – egy, a vakbélben élősködő fonálféreg – petéinek szájon át történő felvétele segíti elő. Ezekben a petékben a heterakis lárvák második stádiumban vannak jelen, amelyek magukba zárva tartalmazzák a hisztomonasz lárvákat. A hisztomonaszok kitörése a fonálféreg lárváknak a vakbél nyálkahártyájába történő beágyazódása idején zajlik le (*Radnai*, 2008).

A gyógyszerek alkalmazásának, illetve felhasználásának szabályozásával, egyes gyógyszerek visszavonásával, újabb alternatívákat kell keresni a kórokozó elleni védekezésben. Az immunrendszer hisztomonaszok elleni védekező mechanizmusának ismerete megkönnyítené a gyógyszerek, gyógyhatású készítmények közötti választást, illetve azok fejlesztését. Az immunkutatások során aktív- és passzív immunizálásokat is alkalmaznak. A közelmúltban, inaktivált és klónozott Histomonas meleagridis-t injektáltak intramuszkulárisan az állatokba, amely képes volt védelmet nyújtani (*Hess et al*., 2008). Bleyen és munkatársai (2009) szintén elhalt *H. meleagridis*-t injekcióztak pulykába, de a bejuttatott kórokozóra adott immunválasz nem idézett elő védelmet.

Ugyanakkor egyre nagyobb számban terjednek el az alternatív preventív- és gyógykezelések. Ezek általában növényi kivonatokat, illóolajokat tartalmazó készítmények, takarmány előkeverékek. *Duffy* és munkatársai (2005) végeztek egy in vivo vizsgálatot, melynek során élesztő eredetű mannonoligoszacharidot együttesen alkalmaztak ásványi tápanyagokkal, valamint növényi kivonatokkal. A kísérlet során a vakbélben és a májban sérülések alakultak ki, de ezek nem voltak halálosak. Egy néhány évvel ezelőtti kutatásban (*Hafez* és *Hauck*, 2006) ivóvíz-adalékot és fahéj, fokhagyma, citrom és rozmaring kivonatot tartalmazó takarmány adalékanyagokat vizsgáltak. Etetés, itatás után H. meleagridis-sel oltották az állatokat. A kezeletlen csoportban 50%-os volt az elhullás, ezzel szemben az adalékokat kapott csoportban csak 20%-os volt a mortalitás aránya. Van der *Heijden* és *Landman* (2008) antihisztamon hatásait vizsgálták két készítmény formájában, melyet pulyka pipéken próbáltak ki. Az egyik termék fokhagymát, fahéjat, allicint és cinnemaldehidet tartalmazott. A másik produktumot fokhagyma, fahéj, rozmaring és citrom illóolajokra alapozták. A kísérlet során három eltérő dózisú hisztomonasz injekciót kaptak az állatok. A kísérlet végén ezek a készítmények a beadott dózisra vonatkozóan nem bizonyultak megfelelőnek.

Anyag és módszer

A takarmányozási kísérlet a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Debreceni Tangazdaság és Tájkutató Intézetének Állattenyésztési Telepén történt. A telep őshonos réz-, bronz és feketepulyka állománnyal végez génmegőrző tevékenységet. Pulykaállományunkban a tavalyi esztendőben észrevettük, hogy csökken a takarmány értékesülés, az állatok nem a megfelelő ütemben növekedtek, a kifutókban pedig híg bélsárra

lettünk figyelmesek. Az ilyen bélsarat ürítő egyedek folyamatosan gyengültek, vérszegények lettek és el is pusztultak. A gyógykezelést különböző hatóanyagú antibiotikumokkal kezdtük, majd később a *Pharmatéka Bt.* Black-Stop nevű, fahéj, oreganó, kakukkfűolajat, valamint takarmány lisztet tartalmazó takarmány előkeverékét etettük.

Eredmények és értékelés

A gyógykezelést 2012. augusztus hónapban kezdtük alkalmazni 818 állaton, amelyből 491 db bronz és 327 db rézpulyka volt. A gyógykezelés 2013. április hónapjáig tartott. Az állatok a kezelés kezdetén kb. 12 hetesek voltak. A Black-Stop takarmány előkeverék adagolását október közepétől, az előírtak szerint végeztük, amely 5 kg/tonna volt. Az antibiotikumos kezelések hatására nem történt javulás az állatok egészségi állapotában, sőt az elhullások számának növekedését tapasztaltuk. A Black-Stop hatására az elhullások száma hirtelen visszaesett, melyet az *1. és 2. ábra* szemléltet.

***1. ábra*: Bronzpulykák elhullásának alakulása**

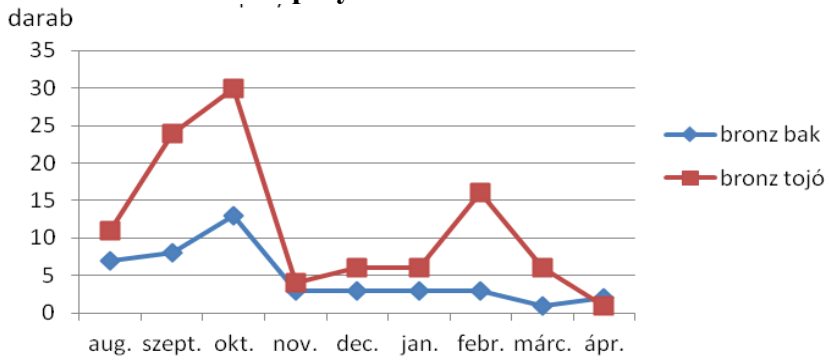


Figure 1: Mortality of the Bronze turkey
blue line: male; red line: female

***2. ábra*: Réz pulykák elhullásának alakulása**

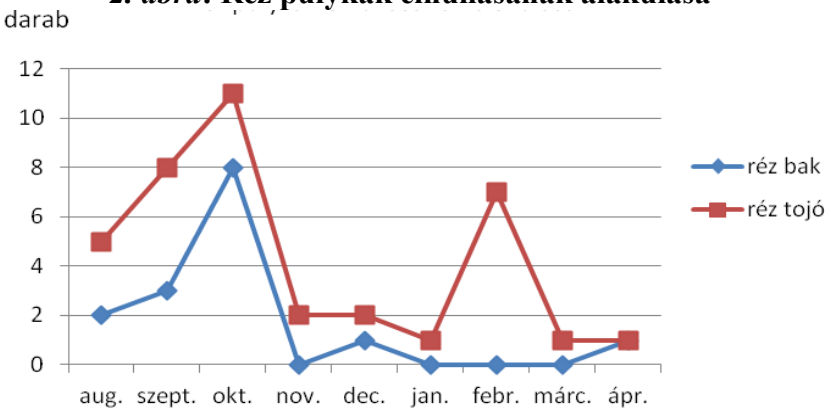


Figure 1: Mortality of the Copper turkey
blue line: male; red line: female

Jól látható, hogy mindkét fajta esetén a tojók voltak érzékenyebbek a betegségre. Láthatjuk, hogy a készítmény stabilizálta az állatok egészségi állapotát, az elhullások számát minimálisra csökkentette.

A 9 hónapon át tartó kezelés folyamán 200 darab állat pusztult el, aminek fajtánkénti és ivar szerinti megoszlását a *3. ábra* szemlélteti. Az első három hónapban a dimetridazolos kezelés során 130 darab állat pusztult el, amely az elhullások 65%-át jelentette. A kezelés fennmaradó hat hónapjában a Black-Stop készítmény alkalmazásával az elhullást 70 darabra sikerült lecsökkenteni, amely az összes elhullás 35%-át jelentette.

***3. ábra*: Elhullások fajta és ivar szerinti megoszlása**

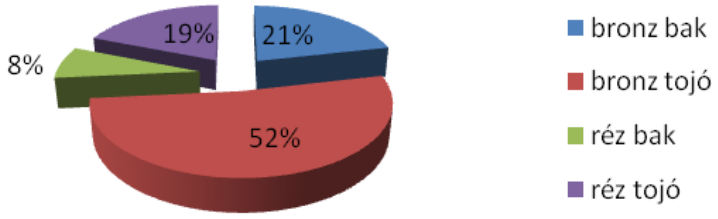


Figure 3: Type of mortality according to breed and gender
blue line: Bronze male; red line: Bronze female; green line: Copper male, lilac line: Copper female

Következtetés és javaslat

A gyógyszeres kezelések korlátozása, betiltása ösztönzi a kutatókat újabb alternatív gyógymódok kifejlesztése. A növényi gyógymódok használata változó sikert hoz a H. meleagridis elleni küzdelemben. Kísérletünk folyamán azt tapasztaltuk, hogy a Black_Stop előkeverék etetésével egyidejűleg hirtelen csökkent, majd viszonylag stabil maradt az elhullások száma. A tapasztalatok számunkra megnyerőek voltak, így másoknak is ajánljuk ezt a készítményt a Black Head elleni védekezés, illetve prevenció céljából.

Irodalomjegyzék

Bleyen, N., Ons, E., De Gussem, M., Goddeeris, B.M. (2009): Passive immunization against Histomonas meleagridis does not protect turkeys from an experimental infection. Avian Pathol., 38. 71-76.

Duffy, C.F., Sims, M.D., Power, R.F. (2005): Evaluation of dietary NatustatTM for control of Histomonas meleagridis in male turkeys on infected litter. Avian Diseases, 49. 423-425.

Hafez, M.H., Hauck, R. (2006): Efficacy of an herbal product against Histomonas meleagridis after experimental infection of turkey poults. Archives of Animal Nutrition, 60. 436-442.

Harold M. J .F. van der Heijden, Wil, Landman. J.M. (2008): In vivo effect of herbal products against Histomonas meleagridis in turkeys. Avian Pathology, 37. 1. 45-50.

Hess, M., Liebhart, D., Grabensteiner, E., Singh, A. (2008): Cloned Histomonas meleagridis passaged in vitro resulted in reduced pathogenicity and is capable of protecting turkeys from histomonosis. Vaccine, 26. 4187-4193.

McDougald, L. (2005): Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. Avian Dis., 49. 462-476.

Radnai István (2008): A pulyka fertőző vakbél- és májgyulladása. Kistermelők lapja, 1. 25.

TŐGYBIMBÓ TÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSE A KECSKETEJ HIGIÉNIAI TULAJDONSÁGAIVAL EGY HAZAI KECSKE TENYÉSZETBEN

Pajor Ferenc[1], *Egerer Anna*[1], *Weidel Walter*[1,2], *Polgár J. Péter*[2], *Póti Péter*[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, H-2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
[2]Pannon Egyetem, Georgikon Kar, H-8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.

Összefoglalás

A szerzők célja a hengeres és tölcséres tőgybimbó alakulás, valamint a kecsketej higiéniai tulajdonságai közötti összefüggések megállapítása volt. Vizsgálataikat 24 alpesi fajtájú kecskével végezték egy árutermelő telepen, a mintákat a laktáció elején, közepén és végén vették. A vizsgálatok eredményeképpen megállapították, hogy a tőgybimbó típusának (hengeres vagy tölcséres) mérsékelt hatása volt a kecsketej higiéniai tulajdonságainak alakulására, így a hengeres tőgybimbóval rendelkező kecskék szomatikus sejtszám és baktériumszám értéke kedvezőbben alakult (622.000 vs. 822.000; P>0,1). Csak a tölcséres kecskétől származó mintákból lehetett kimutatni a tőgygyulladást okozó *Staphylococcus aureus* és *Streptococcus dysgalactiae* fajokat. Emellett a tölcséres tőgybimbójú kecskéktől vett minták 5%-a tartalmazott 500.000 CFU feletti baktériumszámot, illetve kétmillió feletti szomatikus sejtszámot. Mindezek alapján a tölcséres tőgybimbóval rendelkező kecskék tejének bakteriális minősége kedvezőtlenebb, valamint ilyen állatokban nagyobb eséllyel fognak tőgyegészségügyi problémák kialakulni.

Kulcsszavak: kecske, tejminőség, tőgybimbó alakulás

Relation between udder and teat morphology traits and somatic cell count in a Hungarian Goat herd

Abstract

The aim of this research was to evaluate the relationship between teat form (cylinder and funnel) and goat milk hygienically traits. The trials were carried out with 24 Alpine goats on a commercial dairy farm. The milk samples were taken 1st, 2nd and 3rd thirds of lactation period. Based on our results, the teat type was medium effect on the goat milk hygienically quality. The cylinder teat type of goats had more favourable somatic cell count (622,000 vs. 822,000; P<0.1). Moreover, only in funnel goats' samples indentified major pathogen bacteria species (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus dysgalactiae*). Besides, the 5% of samples of funnel goats had more 500,000 CFU bacterial counts and more than two million somatic cell counts. To sum up, the bacterial quality was worse the goats have funnel teat type, and this results suggested these animals are more susceptible to udder health problems.

Key words: milk ability, milk quality, udder morphology

Irodalmi áttekintés

Napjainkban a kecsketenyésztés, ezen belül pedig a kecsketejtermelés az állattenyésztési ágazat egyik legdinamikusabban fejlődő iparága. A kecsketej és az abból készült termékek versenyképességének megtartása, illetve javítása érdekében a minőségi szempontból kifogástalan alapanyag előállítása elengedhetetlen. Ez megfelelő tartási és takarmányozási körülmények mellett, a higiénia betartásával, a tőgytulajdonságokra is irányuló tudatos szelekcióval érhető el, melynek érdekében ismerni kell a tőgymorfológiai tulajdonságok és a termelt tej minőségének összefüggéseit, a tőgy és tőgybimbók alakulása, valamint a nyert tej beltartalmi összetevőinek, minőségi paramétereinek kapcsolatát.

A tej minőségének és beltartalmi értékeinek romlását elsősorban a tőgygyulladással hozták összefüggésbe, amely a nem megfelelő tőgymorfológiából, valamint a rosszul alkalmazott fejési technológiából, illetve a higiénia hiányából adódóan következhet be. Szubklinikai, illetve klinikai tőgygyulladás fennállása esetén, az ilyen tőgyből nyert tej szomatikus sejtszáma megemelkedik, amely együtt jár a tej beltartalmának, valamint fizikai jellemzőinek kedvezőtlen irányú megváltozásával. Ennek hatására a termelt tejmennyiség csökkenése mellett csökken annak alvadóképessége, megnő az alvadási ideje, csökken az alvadék szilárdsága és az ilyen tejből készült sajtok mennyisége és minősége (*Merényi és Lengyel* 1996; *Sung és mtsai,* 1999; *Haenlein* 2002; *Rajcevic és mtsai,* 2003; *Leitner és mtsai,* 2004).

A szomatikus sejtszámra, így a tőgy egészségi állapotára, ezen keresztül pedig a tejminőségre ható tényezők közül a tőgymorfológia fejti ki hatását a legnagyobb mértékben. A tőgymélység, a hátulsó tőgyillesztés, a tőgybimbó formája jelentősen befolyásolják a kecsketej szomatikus sejtszámának alakulását (*Pajor et al.* 2012b). Szintén *Pajor és mtsai* (2009) vizsgálták a tőgy- és tőgybimbó tulajdonságok, illetve a tej szomatikus sejtszáma közötti összefüggéseket. Vizsgálatuk során megállapították, hogy a három vizsgált tőgybimbó tulajdonság – tőgybimbó hossz, tőgybimbó vég szélessége, tőgybimbó alap szélessége – pozitív korrelációban áll a szomatikus sejtszámmal. A tőgybimbó típusa is meghatározó jelentőségű a tej minőségének szempontjából: a hengeres tőgybimbó szomatikus sejtszáma a legkedvezőbb az egyéb tőgybimbó típusokkal (tölcséres, átmeneti) szemben (*Pajor et al.* 2009).

Rupp és mtsai (2011) is végeztek vizsgálatot a szomatikus sejtszám, valamint a tejtermelés és a tőgytulajdonságok összefüggésének megismerésére, melynek során megállapították, hogy a hengeres tőgybimbó típus szomatikus sejtszám értéke a tölcséres típushoz viszonyítva alacsonyabb.

A fenti kutatások eredményei rámutatnak a megfelelő tőgy és tőgybimbó tulajdonságokra történő tudatos szelekció fontosságára. A kutatási eredmények gyakorlati alkalmazásával, a gépi fejés szempontjából megfelelő tőgy és tőgybimbó tulajdonságokkal rendelkező egyedek tenyésztésbe vonásával, illetve a nem megfelelő egyedek kizárásával jelentős javulás érhető el a tejminőség terén.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat egy Valkó melletti árutermelő kecsketenyészetben végeztük. A 2013. januárban ellett, február közepétől fejt alpesi fajtájú anyakecskéből álló vegyes laktációszámú, de azonos laktációszakaszú állományból a tőgybimbó alakulás alapján – hengeres vagy tölcséres – 12-12 egyedet válogattunk ki (n=24), az első vizsgálat során a laktáció első harmadában. Az állomány fejése naponta kétszer, reggel és este, 2x12 állásos SAC típusú fejőházban történt.

A tőgybimbók morfológiai elbírálása és a tejminták gyűjtése a laktáció első, középső és utolsó szakaszában (1. mérés: 56 nap, 2. mérés: 118 nap, 3. mérés: 196 nap), vagyis a laktáció során három alkalommal történt az esti fejések során. A tőgybimbókat alakjuk szerint két csoportba osztottuk: tölcséres, illetve hengeres típusú tőgybimbók. Ez alapján 12 egyed hengeres, valamint 12 egyed tölcséres alakú tőgybimbóval rendelkező anyakecskétől gyűjtöttünk tejmintát. A tőgybimbók fertőtlenítése és az első tejsugarak kifejése után anyánként egy 50 ml-es és egy 10 ml-es tégelybe mintákat gyűjtöttünk, az 50 ml (bronopolt és natamycint tartalmazó) tejmintát tartalmazó tégelyből beltartalom, szomatikus sejtszám és baktériumszám meghatározása, a 10 ml-es mintából baktériumfajok azonosítása történt. A tejminták gyűjtése mindkét tőgyfélből, kézzel történt, majd a gyűjtött mintákat a vizsgálatok elvégzéséig +4°C fokon tároltuk. A minták beltartalmának (tejfehérje, tejzsír, tejcukor), szomatikus sejtszámának és bakteriális tulajdonságainak kimutatása a gödöllői Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. laboratóriumában történt.

A vizsgálat során 3 szomatikus sejtszám-kategóriát alakítottunk ki: 1. csoport: < 400 ezer (n=28); 2. csoport: 400 ezer – 1000 ezer (n=25) és 3. csoport: 1000 ezer < (n=19).

A kapott adatok rendszerezését Microsoft Office Excel programmal végeztük, a statisztikai elemzéshez IBM SPSS Statistics 21.0 programot használtunk.

Eredmények és értékelés

A tejminták higiéniai tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy a hengeres tőgybimbóval rendelkező egyedektől származó tejminták csupán kevesebb, mint 20 százaléka került az 1 millió sejt/ml-t meghaladó csoportba, míg a tölcséres tőgybimbójú egyedektől származó minták majdnem 31 százaléka sorolható ide (*1. táblázat*).

1. táblázat: **Az egyes tőgybimbó típusokból származó tejminták szomatikus sejtszám kategóriánkénti százalékos megoszlása**

SCC kategória(1)	Szomatikus sejtszám szerinti megoszlás (%)(2)			
	Hengeres(3)		Tölcséres(4)	
-400	n= 15	41,67[a]	n= 13	36,11
400-1000	n= 14	38,89	n= 11	30,56
1000-	n= 7	19,44[b]	n= 12	33,33

ab= (P<0,05)

Table 1: Milk samples distribution according to somatic cell categories and teat types
Somatic cell category(1), distribution of samples by somatic cell categories(2), cylinder form(3), funnel form(4)

A szomatikus sejtszámok által meghatározott kategóriák közötti százalékos megoszlásban csak a hengeres tőgybimbóval rendelkező kecskéknél volt kimutatható eltérés, a legkedvezőbb (400.000 alatti sejtszám kategória) csoportba a minták 42 % került, míg a tölcséres tőgybimbó típussal rendelkezők egymáshoz hasonló arányban kerültek a három kategóriába. Vagyis nagyobb arányban várható higiéniai szempontból kedvező tej a hengeres tőgybimbóval rendelkező kecskéktől. Emellett, a tölcséres tőgybimbójú kecskéktől vett tejminták kb. 5%-a rendelkezett 2 millió sejt feletti szomatikus sejtszám értékkel, míg a hengeres tőgybimbó esetében ilyen minta nem volt. Eltekintve a tőgybimbó típustól az összes minta kb. 75 százaléka tartozott az 1 millió sejtszám alatti kategóriába, mely igen kedvezőnek mondható a tejminőség szempontjából. A

szomatikus sejtszám kategóriákat vizsgálva megállapítható, hogy az 1 millió sejt/ml-t meghaladó csoport felé haladva, a két tőgybimbó típus közötti különbség egyre növekedik, az egymillió feletti kategóriában a különbség jelentőssé válik (P<0,05). Az egymillió feletti kategóriában kisebb a hengeres (39 %) és nagyobb a tölcséres tőgybimbóból gyűjtött tejminták aránya (61 %, P<0,05) (*1. ábra*), vagyis a hengeres tőgybimbóból alacsonyabb szomatikus sejtszámú, a feldolgozás szempontjából kedvezőbb minőségű tej fejhető. Hasonló eredményeket kapott *Pajor et al.* (2009) magyar parlagi kecskéken végzett vizsgálataiban.

***1. ábra:* A tölcséres és hengeres tőgybimbóból származó tejminták megoszlása szomatikus sejtszám kategóriák szerint**

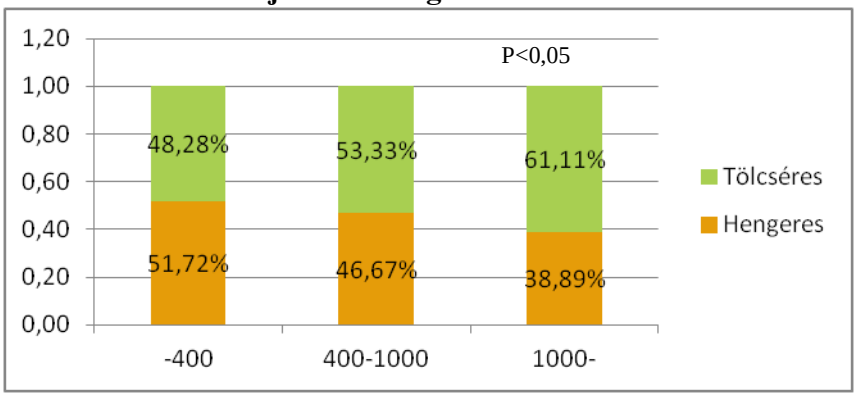


Figure 1: Milk samples distribution according to somatic cell categories and teat types cylinder form (green), funnel form (orange)

A hengeres tőgybimbójú kecskék tejének szomatikus sejtszáma a három mérés átlagában 622 ezer sejtet tartalmazott ml-enként, a tölcséres tőgybimbó esetében ez az érték átlagosan 822 ezer sejt/ml körül alakult, a különbség nem volt szignifikáns. Az említett eredmények alapján megállapítható, hogy a hengeres tőgybimbóból fejt tej kedvezőbb szomatikus sejtszám értékkel rendelkezik a tölcséres típushoz viszonyítva.

A vizsgálat során gyűjtött tejmintákban Corynebacterium fajok, koaguláz- negatív Staphylococcusok (CNS), *Staphylococcus aureus*, és *Streptococcus dysgalactiae* fajok voltak jelen. A tölcséres típusú tőgybimbó kedvezőtlenebb értékeket mutatott, mivel itt jóval több volt a fertőzött és kevesebb a negatív minták aránya, valamint az 1 millió szomatikus sejtet meghaladó kategóriában megjelent a *S. aureus*, illetve a *Str. dysgalactae* faj is, mely a hengeres tőgybimbóból származó tejben egy esetben sem volt kimutatható. Azonban a 400 ezer sejtnél alacsonyabb szomatikus sejtszámmal rendelkező minták esetében is kimutatható volt mindkét tőgybimbó típusból származó tejben különböző baktériumfajok jelenléte, 24%-ban, vagyis az alacsony szomatikus sejtszám nem járt együtt minden esetben a baktériumfajok hiányával.

A tejminták baktériumszám vizsgálatának eredménye szerint mindkét tőgybimbó típus esetében az 1 millió alatti szomatikus sejtszámmal rendelkező minták baktériumszáma alacsonynak bizonyult, átlagosan 12 ezer CFU/cm^3 értéket mértünk. Ez a tej bakteriális minősége szempontjából kiváló eredménynek mondható. A tölcséres tőgybimbójú kecskéktől vett minták 5%-a tartalmazott 500.000 CFU feletti baktériumszámot, illetve kétmillió feletti szomatikus sejtszámot. A szomatikus sejtszám és a baktériumszám összefüggését vizsgálva nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy az alacsony szomatikus sejtszámmal az alacsony baktériumszám is együtt járna, mivel a fent közölt adatokból kitűnik, hogy a 400 ezer és 1 millió szomatikus

sejtet tartalmazó minták átlagosan 15 000 CFU-t tartalmaztak cm^3-enként, míg az 1 millió sejtet tartalmazó minták baktériumszám átlaga alacsonyabb, 10 000 CFU/cm^3 körüli volt a hengeres tőgybimbójú kecskék esetében. Viszont az mindenképpen kijelenthető, hogy a tölcséres tőgybimbójú kecskék tejmintái esetében a két legtöbb szomatikus sejtszámmal rendelkező minta (2,6 millió sejt/cm^3, illetve 3,9 millió sejt/cm^3) mutatta a két legmagasabb baktériumszám értéket, vagyis ebben az esetben a magas szomatikus sejtszám kedvezőtlenül befolyásolta a baktériumszám alakulását is.

Vizsgálatunkban a szomatikus sejtszám és a baktériumszám szignifikáns összefüggést mutatott. Közepesen szoros, pozitív összefüggést állapítottunk meg a szomatikus sejtszám és a baktériumszám (r=0,39; P<0,001) között. Tejelő kecskéken végzett vizsgálataik során, hasonlóan pozitív összefüggésről számoltak be *Pajor és mtsai* (r=0,65) (2012a), *Koop és mtsai* (r=0,35) (2010), valamint *Zeng és mtsai* (r=0,44) (2008) is.

Következtetések és javaslatok

A vizsgálat eredményeiből megállapítható, hogy a hengeres tőgybimbóval rendelkező kecskék szomatikus sejtszám és baktériumszám értéke kedvezőbb a tölcséres tőgybimbóval rendelkező társaikkal szemben. Ennek alapján javasoljuk a hengeres tőgybimbó típusra történő szelekció alkalmazását, a szomatikus sejtszám felső határértékének meghatározását, valamint egyes európai országokhoz hasonlóan a tejminőségen alapuló tejátvételi rendszerek kialakítását és bevezetését, mellyel higiéniai szempontból kedvezőbb, magasabb minőségű nyerstej termelés válna lehetővé, ezáltal lehetőség nyílna az abból készült tejtermékek (sajtok, joghurtok) minőségi színvonalának, és így versenyképességének növelésére a tej és tejtermék piacon belül.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a KTIA_AIK_12-1-2012-0012 és a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

Gulyás L., Iváncsics J. (2000): A szomatikus sejtszám és néhány tőgymorfológiai tulajdonság kapcsolata. Állattenyésztés és Takarmányozás, 49. 4. 331-339.

Haenlein G.F.W. (2002): Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. Small Ruminant Research, 45. 163-178.

Koop, G., Dik, N., Nielen, M., Lipman, L. J. A. (2010): Repeatability of differential goat bulk milk culture and associations with somatic cell count, total bacterial count, and standard plate count. J. Dairy Sci., 93. 2569–2573.

Leitner, G., Merin U., Silanikove, N. (2004): Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. journal of Dairy Science, 87. 1719–1726.

Merényi I., Lengyel Z. (1996): A tej állományhibái. In: Merényi I., Lenygel Z. (szerk.): Tejgazdasági kézikönyv. Gazda Kiadó, Budapest, 380., 148-150.

Pajor F., Mátyus B., Láczó E., Póti P. (2008): Magyar nemesített kecskék tőgybimbó alakulásának értékelése digitális videotechnika alkalmazásával. Tejgazdaság, 68. 1-2. 71-75.

Pajor F., Németh Sz., Barcza F., Gulyás L., Póti P. (2009): Néhány tőgy és tőgybimbó tulajdonság kapcsolata a szomatikus sejtszámmal magyar parlagi kecske fajtában. Állattenyésztés és Takarmányozás, 58. 4. 369-378.

Pajor F., Weidel W., Németh Sz., Gulyás L., Bárdos L., Polgár J. P., Póti P. (2012a): A szomatikus sejtszám és a tejtermelés, a beltartalmi összetétel, valamint egyes fizikai tulajdonságok közötti összefüggések vizsgálata magyar parlagi kecskefajtában. Magyar Állatorvosok Lapja, 134. 265-270.

Pajor F., Weidel, W., Bárány T., Németh Sz., Gulyás L., Polgár J. P., Póti P. (2012b): Tőgy- és tőgybimbó-tulajdonságok összefüggése a szomatikus sejtszámmal egy magyar parlagi kecske tenyészetben. Acta Agronomica Óváriensis, 54. 2. 45-52.

Rajcevic, M., Potocnik, K., Levstek, J. (2003): Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. Agriculturae Cobspectus Scientificus, 68. 221-226.

Rupp, R., Clément, V., Piacere, A., Robert-Granié, C., Manfredi, E. (2011): Genetic parameters for milk somatic cell score and relationship with production and udder type traits in dairy Alpine and Saanen primiparous goats. Journal of Dairy Science, 94. 3629-3634.

Sung, Y.Y., Wu, T.I., Wang, P.H. (1999): Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. Small Ruminant Research, 33. 17-23.

Zeng, S.S., Zhang, L., Wiggans, G.R., Clay, J., LaCroix, R., Wang, J.Z., Gipson, T. (2008): Current status of composition and somatic cell count in milk of goats enrolled in Dairy Herd Improvement Program in the United States. In: Di Alberto, P. & Costa, C.: New Research on Livestock Science and Dairy Farming. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, New York, USA, 129–144.

Panker / AWETH Vol 9.3. (2013)

A VÖRÖSFÜLŰ ÉKSZERTEKNŐS MEGÍTÉLÉSE, MINT POTENCIÁLISAN INVAZÍV HÜLLŐFAJ

Panker Máté

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóság
panker.mate@gmail.com

Összefoglalás

A szerző közleményében a vörösfülű ékszerteknős (*Trachemys scripta elegans*) bemutatását célozza, mint ökológiai szempontból veszélyes hüllőfaj, melyben előbb az európai, majd saját vizsgálati eredményeit ismerteti. A vizsgálat célja a hazai körülmények között történő hibernáció sikerességének mérése volt három egymást követő évben.
Kulcsszavak: vörösfülű ékszerteknős (*Trachemys scripta elegans*), hüllőfaj, hibernáció

About the red eared slider as potentially invasive reptile species

Abstract

In this article the author represent the red eared slider (*Trachemys scripta elegans*) as ecological dangerous reptile species and inform about the European status of it, after demonstrate a hibernation investigation. This targeted the hibernation capability of red eared sliders in three consecutive hibernation period.
Keywords: red eared slider (*Trachemys scripta elegans*), reptile, hibernation

Irodalmi áttekintés

A vörösfülű ékszerteknős (*Trachemys scripta elegans*) az Amerikai Egyesült Államok délkeleti részén őshonos. Nyugodt vizek lakója, így elsősorban tavakban, mocsarakban és kisebb folyókban található meg (*Köhler, 2003; Farkas, 1999*). Az ékszerteknősök, különösen fiatal korban kedvelik a vízi növényekkel gazdagon benőtt élőhelyeket. Itt az úszó és a mederben rögzült növények egyaránt preferáltak. Az élőhelyen belül egyesek eltérést jegyeztek le az ékszerteknősöknél ivar és életkor megoszlás tekintetében. Fröhlich munkájában (1999) beszámol arról, hogy a fiatal teknősök és a hímek inkább a sekély, buja növényzetű részeit lakják a vizes élőhelyeknek, míg a nagytermetű, kifejlett nőstények a mélyebb részeket is belakják.

A hüllőfaj az 1980-as évektől Európában igen népszerű hobbiállattá vált (*Pénzes, 1989; Gál, 2006a*). Az USA-ban teknősfarmokon tenyésztik a teknőst, ahol kelés után rövid idővel már értékesítik is a szaporulatokat. Az exportált fiatal állatok száma 1989-1997 között meghaladta az 52 milliót (*Molli, 1995; Telecky, 2001; Warwick, 1991*). A 2000-es évek környékén már szinte minden importáló országban megfigyelték a korábbi házikedvencek szabadvízi előfordulását. Dél-Franciaországban kutatók bebizonyították, hogy a faj képes náluk természetes körülmények között szaporodni is (*CADI et al., 2004*).

A vörösfülű ékszerteknős a világ 100 leginvazívabb fajának listáján foglal helyet, mint például a parlagfű. Invazívnak nevezzük azokat a tájidegen fajokat, amelyek agresszíven és nagy tömegben terjednek, magas tűrő- szaporodó- és terjedő képességüknek köszönhetően. Az invazív fajok elfoglalják a természetes és mesterséges élőhelyeket, miközben komoly ökológiai, gazdasági és egészségügyi károkat okozhatnak.

Hazánkban egyetlen őshonos teknősfaj él, a mocsári teknős (*Emys orbicularis*). A két teknős nagyban hasonló életmódot folytat, minden szempontból konkurensei egymásnak. A vörösfülű ékszerteknős Cadi és Joly (2004) szerint széles körben elterjedhet és a mediterrán régióban és akár szaporodhat is. A szerzők a vizsgálatukban három éven keresztül nyomon tudták követni a mocsári teknős növekedési ütemét és a populáció mortalitásának az alakulását egy olyan élőhelyen, ahol a vörösfülű ékszerteknős is jelen volt. Azt találták, hogy a tömeggyarapodás elmaradt azokban a populációkban, ahol a vörösfülű ékszerteknős előfordult. Sőt az ilyen élőhelyeken a mocsári teknősök nagyobb mortalitási rátát mutattak, mint a kontroll populációk.

Magyarország az Európai Uniós csatlakozással egyidőben (2004. május 1.) megszüntette a vörösfülű ékszerteknős importot. Továbbá 2010-ben napvilágot látott a vörösfülű ékszerteknős kereskedelmét és tartását is jelentősen korlátozó, a kedvtelésből tartott állatok tartásáról és forgalmazásáról szóló 41/2010. (II. 26.) Korm. rendelet (továbbiakban: Rendelet), melynek I. számú melléklete az ország őshonos növény-, illetve állatvilágára ökológiai szempontból veszélyes fajokat sorolja fel. Az I. sz. melléklet C.(hüllők) pontjában az alligátorteknős (*Chelydra serpentina*), díszes ékszerteknős (*Chrysemys picta*), keselyűteknős (*Macroclemmys temminckii*) és a vörösfülű ékszerteknős (*Trachemys scripta elegans*) - a 15 cm-nél kisebb páncélhosszúságú példányok – foglalnak helyet. Az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. Törvény 24/F. §-a értelmében „Az ország őshonos növény-, illetve állatvilágára ökológiai szempontból veszélyes, külön jogszabályban meghatározott állatok kedvtelésből való tartása, szaporítása és forgalomba hozatala tilos. A tilalom megszegésével tartott állatot az állatvédelmi hatóság elkobozza, majd gondoskodik az állat tulajdonjogának átruházásáról. Ha ezt jogszabály kizárja vagy az eredménytelen, az állat végleges elhelyezéséről. Ha az állat végleges elhelyezése csak rendszeres költségráfordítással biztosítható, a korábbi tulajdonos a jogsértés súlyától, ismétlődésétől függően legfeljebb 12 hónapra jutó költség fizetésére kötelezhető. Az elhelyezés eredménytelensége esetén az állat életét megengedett módon ki lehet oltani.”

Anyag és módszer

Egészen mostanáig nem állt rendelkezésre egyetlen hiteles vizsgálat sem a vörösfülű ékszerteknős hazai viszonyok közötti áttelelésével kapcsolatban. Vizsgálataimat 2009-2012 között, az őszi, téli időszakban végeztem, melynek során a telelés alatt ható tényezőket értékeltem. Az egyes években a teleltetési kísérleteimet ásott árkokban (50 cm és 1 m mélyen, száraz/nedves) és mesterséges tavi környezetben végeztem különböző számú és korú állatokkal.

Eredmények és értékelés

Az általam vizsgált három telelési periódusban a teknősök mortalitása eltérően alakult, és alapvetően a telelési hőmérséklettől függően változott.

A 2010/2011-es telelési periódusban a teleltetett teknősök, akár tóban, akár száraz vagy nedves gödörben, akár 50 cm mélyen akár 1 m mélyen teleltek, 100%-ban túléltek. Ez a kedvező környezeti hőmérsékletnek tudható be, ugyanis a leghidegebb három téli hónapban (december,

január, február) az átlagos minimum értékek nem csökkentek fagypont alá, sőt az a vörösfülű ékszerteknős számára optimális zónában maradt.

A 2009/2010-es és 2011/2012-es telelési periódusban viszont a mortalitás eltérő volt a telelőhelyeken és a korosztályokban is. Az első telelési periódusban a leghidegebb hónapokban az 50 cm mély telelőgödörben januárban a minimum hőmérséklet -10,2 ^{o}C is volt, ami irodalmi adatok szerint egyértelműen letális a vörösfülű ékszerteknősökre. Ilyen körülmények között az 50 cm mély telelőgödörben az állatok 100%-a elhullott. Ebben az évben az 1 m mély telelőgödörben is mértem fagypont alatti hőmérsékletet, ami azonban -0,5 ^{o}C volt csak. Az ilyen körülmények között telelt teknősöknél 25%-os mortalitást tapasztaltam.

A 2011/2012-es telelési periódusban, amikor az 50 cm mély telelőgödörben fagypont alatti hőmérsékleti minimumot is mértem, a nelson ékszerteknősök 100%-os mortalitást mutattak. Ugyanilyen mortalitási értékeket lehetett kimutatni a fiatal vörösfülű ékszerteknősökben is ezen a hőmérsékleten. Az 1 m mélyen, fagymentes körülmények között telelő nelson és vörösfülű teknősök 100%-a túlélte a hibernációt.

Ezek alapján a vörösfülű ékszerteknősök és nelson ékszerteknősök téli túlélését is úgy tűnik, hogy a megfelelő hőmérsékletű hely megválasztása befolyásolja. A szélsőséges klímaviszonyok is hatással lehetnek a telelőhely minimum hőmérsékletének a kialakulására, különösen a sekély telelési mélységet választó állatoknál.

A telelés alatti mortalitási okok között az egyik leggyakoribb a csillós-ostoros véglények túlszaporodása és az általuk kiváltott heveny, hurutos-kruppos gastritis vagy enteritis szerepelt. Ezekben az állatokban feltehetően a normális viszonyok között kis számban jelen levő, de szuboptimális, általában a magasabb hőmérsékleten túlszaporodó véglények az emésztőcső nyálkahártyájának gyulladását okozták. Ezzel kapcsolatosan már több szerző is felhívta a figyelmet az ún. fakultatív patogén véglények betegség okozó szerepére hüllőkben.

Az általam vizsgált teknősökben második leggyakoribb elhullási ok a teknős korától, nemétől függetlenül a fakultatív patogén baktériumok okozta vérfertőzés volt. Itt *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas sp.* voltak a leggyakrabban izolált baktériumok, melyek normális körülmények között is a teknősök környezetében jelen lehetnek. A hüllőkben a szuboptimális környezeti tényezők, így a telelés alatt az optimálisnál magasabb környezeti hőmérséklet az általános ellenállóképességet csökkenti, ezzel lehetőséget teremtve a kórokozók elszaporodására. A baktériumok által termelt toxinok vérérfal károsító hatása miatt alakul ki a testszerte megfigyelhető vérzés vagy a vörhenyes testüregi savó felhalmozódás.

Olyan eset is előfordult, ahol a direkt hideghatás okozta a teknősök elhullását, ami lényegében a szervezetet érintő fagyási sérülésnek tudható be. Az irodalmi adatok szerint a vörösfülű ékszereknősök elhullása fagypont alatti hőmérsékleten lép fel, alacsonyabb értékeknél, így -4 ^{o}C alatt már jelentős lehet az elhullás.

Következtetések

Fentieket figyelembe véve azt vélelmezem, hogy a nem őshonos teknősök téli túlélése nagyban függ a telelőhelyeken kialakuló kritikus hőmérsékleti értékektől, amit beláthatóan az időjárás befolyásol. A vizsgálatban kiderült, hogy a teknősök téli túlélését a megfelelő, optimális telelési hőmérséklet befolyásolja, ami 2-4 ^{o}C közötti. Ezen a hőmérsékleten a teknősök telelés alatti testtömeg csökkenése is az élettani határon belül marad és csaknem 100%-os a túlélés.

Összességében megállapítható, hogy a hazai viszonyok között is képesek áttelelni a szabadban a vörösfülű ékszerteknősök és a nelson ékszerteknősök, ha a teleléshez megfelelő védett helyet, illetve a szélsőséges időjárási viszonyok, elsősorban a fagyhatás elől védelmet találnak. Ellenkező esetben jelentős lehet a teknősök mortalitása a téli időszakban hazai viszonyok között, ami a populáció sérülékenységét okozza. Az invazívnak minősített teknősfaj így véleményem szerint nem egyértelműen jelent kifejezett veszélyt az őshonos populációkra.

Irodalomjegyzék

1. *Cadi, A.. Delmas, V., Julliard, A. C. P., Joly, P., Pieau, C., Girondot, M*. (2004): Successful reproduction of the imported slider turtle (Trachemys scripta elegans) in the South of France. Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst. 2004. 14. 237-246.
2. *Cadi, A., Joly, P*.: Impact of the introduction of the red-eared slider (Trachemys scripta elegans) on survival raes of the European pond turtle (Emys orbicularis). Biodiv. Conserv. 2004. 13. 2511-2518.
3. *Farkas B*.: Kedvencünk az ékszerteknős. Terrárium. 1999. I. 1. 12-14.
4. *Frölich, F*.: Csodaszép ékszerteknősök. Holló és Társa Kiadó. Budapest. 1999. 9-33.
5. *Gál J.:* Egzotikus állatok egészségtana I.: Hüllők tartása, takarmányozása és egészségvédelme. Bollók és Tsa. Bt. Budapest. 2006a. 62.
6. *Köhler, G*.: Reptiles of Central America. Herpeton. Verlag Elke Köhler. Germany. 2003. 39-40.
7. *Molli, E. O*.: The turtle Trachemys scripta and the pet trade. Aliens. 1995. 2. 3.
8. *Pénzes B*.: Terrárium. Natura. Budapest. 1989. 110-111.
9. *Telecky, T. M*.: United States import and expor of live turtles and tortoises. Turtle Tort. Newsl. 2001. 4. 8-13.
10. *Warwick, C.:* Conservation of red-eared terrapins Trachemys scripta elegans: threats from international pet and culinary markets. Testudo. 1991. 3. 34-44.

A DÍJUGRATÓ SPORTBAN KÜLÖNBÖZŐ NEHÉZSÉGI SZINTEKEN NYÚJTOTT SPORTTELJESÍTMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Posta János, Rudiné Mezei Anita, Mihók Sándor

Debreceni Egyetem, Állattenyésztéstudományi Intézet
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
postaj@agr.unideb.hu

Összefoglaló

A tanulmány célja a sportlovak ugrósportban, különböző nehézségi szinteken nyújtott teljesítményeinek örökölhetőségi értéke, valamint a teljesítmények közötti genetika és fenotípusos korrelációk számítása volt. A vizsgálat anyagát az 1996 és 2011 közötti díjugratás szakági eredmények képezték. Az adatbázis 10199 ló 358342 startját tartalmazta, amiben megtalálható volt a ló azonosítója, neve, ivara, lovasának neve, verseny ideje, szintje, helyszíne és a helyezés. A különböző vizsgálatokban a teljesítmény értékeléséhez az elért helyezést, az indulók számát, és a verseny nehézségét használtuk fel. A versenyeket nehézségi szintjük szerint öt nehézségi kategóriába soroltuk. A sportteljesítmény mérésére az elért helyezések logaritmus-, illetve gyök-alapú átalakításait végeztük el. Az értékeléshez alkalmazott ismételhetőségi egyedmodellben fix hatásként vettük figyelembe a ló életkorát, ivarát, verseny évét, helyszínét. Véletlen hatásként szerepelt a lovas, a ló és az állandó környezeti hatás a modellben. A variancia komponenseket a VCE-6 szoftver alkalmazásával becsültük. A különböző nehézségi szinteken nyújtott teljesítmények örökölhetőségi értéke minden esetben alacsony volt. A fenotípusos korrelációk minden nehézségi szintre képzett párokban alacsonyak, de szignifikánsak voltak. Az első négy nehézségi kategóriában a genetikai korrelációk közepesek és szorosak voltak, a nehézségi szintek közötti távolság növekedésével a korrelációs értékek csökkentek. A versenyrendszer legnehezebb szintjén és a többi kategóriában teljesítő lovak eredményeinek összevetése az elegendő elemszám hiánya miatt nem volt lehetséges.
Kulcsszavak: díjugratás, sportló, sportteljesítmény

Evaluation of show-jumping performance in various difficulty categories

Abstract

The aim of the study was the calculation of heritability values of performances on different difficulty categories and the estimation of the phenotypic and genetic correlations among these performances. Show-jumping competition results collected between 1996 and 2011 were analysed. The database contained 358342 starts of 10199 horses. Identity number, name and gender of the horse, rider, competition year, the level and location of the competition and placing were recorded in the database. To measure performance of horses, placing, number of starters and competition level were used. Competitions were categorized into five groups based on their difficulty level. The sport competition performance were analysed based on logarithmic and root-based functions of ranking. The used repeatability animal model included fixed effects for age, gender, place and year of competition and random effects for rider, animal and permanent environment effect. Variance components were estimated with VCE-6 software package. The

heritability of the performances on each difficulty categories was low. The phenotypic correlations were low, but significant between the difficulty level pairs for each case. The genetic correlations were moderate and high for the first four difficulty levels, as the distance between difficulty levels was higher, the correlation values were lower. Because of the low amount of performance data from category five, its correlation with other difficulty categories was not possible.
Keywords: show-jumping, sport horse, sport performance

Irodalmi áttekintés

A sportlovak saját-teljesítmény alapú genetikai értékelését több országban is évtizedek óta sikeresen alkalmazzák (*Koenen et.al*, 2004). Az elemzéseket a legjobb lineáris torzítatlan becslés (BLUP) használatával végzik. A módszer legfontosabb eredménye, hogy az egyedmodell alkalmazásával a genetikai becslés meghatározása lehetővé vált a nyereménnyel rendelkező lovak oldalági rokonaira is. Több kutatásban is kimutatták a rokonsági mátrix fontosságát a genetikai becslésekben (*Henderson*, 1975ab). A teljesítmény értékelésére rendszerint a nyereményösszeget, vagy a helyezéseket alkalmazzák. Mindkettő eloszlása aszimmetrikus, becslésekre csak matematikai átalakítások után használhatóak. *Tavernier* (1988) a sporteredmények értékelésére a nyereményösszeg logaritmusát javasolta. Más matematikai módszerek is alkalmazhatóak, ugyanis *Minkema* (1975) vizsgálata alapján a négyzetgyök, harmadik és negyedik gyök alkalmazása is sikeres lehet. *Foran* és munkatársai (1995) írországi vizsgálati eredményeikben a helyezéseket a Blom módszer alkalmazásával normalizálták. Az átalakítás után a győztesek pozitív, az átlagos teljesítményű egyedek nullához közeli, míg az átlagosnál gyengébb teljesítményű lovak negatív pontokat kaptak. *Janssens* és munkatársai (1997) a belga sportlóra megalkotott rendszerükben díjugratásban és díjlovaglásban elért helyezéseket szintén a Blom pontozás használatával transzformálták normál eloszlású változóvá.

A lovak faji sajátossága a hosszú generációs intervallum, a képességét megmutató, képzett lovak életkora 10-15 év közötti (*Mihók*, 2005). Ez a tény is megerősíti a lehető legkorábban rendelkezésre álló objektív adatok értékelésének fontosságát. A sajátteljesítmény-vizsgák és a későbbi sportteljesítmény között több kutatómunkában is pozitív összefüggést állapítottak meg (*Huizinga et. al.*, 1991ab; *Kalm*, 2003; *Wallin et. al*, 2003). *Hassenstein* és munkatársai (1998) munkájukban a különböző nehézségi szinteken nyújtott sportteljesítmények közötti összefüggéseket vizsgálták. A helyezéseket négyzetgyök transzformációval alakították át, majd az eltérő nehézségi szinteken nyújtott teljesítmények között pozitív fenotípusos korrelációkat számítottak.

A kutatómunka célja a sportlovak ugrósportban, különböző nehézségi szinteken nyújtott teljesítményeinek örökölhetőségi értéke, valamint a teljesítmények közötti genetika és fenotípusos korrelációk számítása volt.

Anyag és módszer

Vizsgálatunkban a Magyar Lovassport Szövetség Díjugratás Szakága által rendelkezésünkre bocsátott, 1996. és 2011. közötti díjugratás szakágban nyilvántartott sporteredményeket dolgoztuk fel. Az adatbázisban megtalálható volt a ló azonosítója, neve, ivara, lovasának neve, a verseny éve, szintje, helyszíne, a hibapont és a helyezés. Az adatbázis, a hibás adatok javítása, illetve a hiányos adatok pótlása után 10199 ló 358342 indulásának eredményét

tartalmazta. Az elemzéshez felhasznált pedigrében négy generációra visszamenően 39878 ló szerepelt. A lovak teljesítményének összehasonlításához a versenyeket nehézségi szintjük szerint korábbi kutatási eredményeink alapján öt kategóriába soroltuk, figyelembe véve a versenyszám típusát és az akadályok magasságát (*Rudiné et. al.*, 2013).

A sportteljesítmény mérésére az elért helyezéseket vettük alapul. A további értékeléshez logaritmikus, négyzetgyök alapú és normalizálással átalakított mérőszámokat képeztünk, amelyeket az *1. táblázat* mutat be.

1. táblázat: **A teljesítményt értékelő, matematikai átalakításokkal képzett mérőszámok**

Mérőszám (1)	**Alkalmazott matematikai átalakítás (2)**
I. mérőszám (3)	(10-$\log_2$(helyezés))
II. mérőszám (4)	15-négyzetgyök(helyezés)
III. mérőszám (5)	Blom(helyezés)

Table 1: Measurement variables evaluating the sport performance (made with different mathematical transformations)
(1) Measurement (2) Used mathematical transformation (3) Measurement I. (4) Measurement II. (5) Measurement III.

Az értékeléshez alkalmazott ismételhetőségi egyedmodellben fix hatásként vettük figyelembe a ló életkorát, ivarát, verseny évét, helyszínét. Véletlen hatásként szerepelt a lovas, a ló és az állandó környezeti hatás a modellben. A fix tényezők szignifikáns befolyását a legkisebb négyzetek módszerével, a SAS GLM (*Sas Institute*, 1999) eljárást alkalmazva vizsgáltuk.

A varianciakomponensek becslését a fentebb ismertetett modell alapján, REML módszerrel a VCE-6 szoftver alkalmazásával (*Kovac és Groeneveld*, 2003) végeztük. A teljesítmény értékelésekor additív genetikai varianciát, állandó környezeti varianciát, lovas varianciáját és hibavarianciát becsültünk. Az így becsült variancia komponensekből határoztuk meg az örökölhetőségi és ismételhetőségi értékeket.

Eredmények és értékelés

A különböző matematikai átalakításokkal képzett mérőszámokra becsült genetikai és fenotípusos korrelációkat a *2-4. táblázatok* szemléltetik. Az eltérő átalakítások ellenére, a kapott korrelációs értékek tendenciája hasonlóan alakult. Erre magyarázat (lehet), hogy a számítások során minden esetben az elért helyezésekből indultunk ki. Az egyes kategóriákban nyújtott teljesítmények között jelentős eltérések vannak, ami a becslések pontosságát, értékelhetőségét rontja.

Az első négy nehézségi kategóriában nyújtott teljesítmények közötti genetikai korrelációk a logaritmikus és a négyzetgyök transzformációval kapott mérőszámok esetében közepesek és szorosak voltak (r_g=0,48-0,90). A Blom normalizálással képzett mérőszámra szoros genetikai korrelációs értékeket számítottunk. A kapott értékek minden esetben szignifikánsak (P<0,05), a nehézségi szintek közötti távolság növekedésével a korrelációs értékek minden mérőszám esetében csökkentek. Ez összhangban van korábbi, a magyar sportló fajta sporteredményeinek random regressziós értékeléssel végzett vizsgálatának eredményeivel (*Posta és mtsai*, 2010). A

kapott eredmények lényegesen magasabbak *Hassenstein* és munkatársai (1998) német díjugratási sporteredményekre becsült értékeinél.

A fenotípusos korrelációk mindhárom mérőszám esetében szignifikáns és laza összefüggést mutattak az egyes nehézségi szinteken nyújtott teljesítmények között. A nehézségi szintek közötti távolság növekedésével a genetikai korrelációkhoz hasonlóan a fenotípusos korrelációk értékei is csökkentek. A kapott eredmények alatta maradnak *Hassenstein* és munkatársai (1998) német díjugratási sporteredményekből becsült értékeinek.

A versenyrendszer legnehezebb szintjén és a többi kategóriában teljesítő lovak eredményeinek összevetése az elegendő elemszám hiánya miatt nem adott értelmezhető eredményeket, így azok bemutatása csak tájékoztató jellegű.

2. táblázat: **Az I. mérőszám esetében számított genetikai (az átló fölött) és fenotípusos korrelációk (az átló alatt).**

Nehézségi szintek (1)	N	1	2	3	4	5
1	209.866		0,86	0,71	0,48	0,99
2	104.210	0,13		0,89	0,61	1,00
3	30.332	0,08	0,13		1,00	-1,00
4	12.084	0,07	0,12	0,13		*
5	1.850	0,03	0,09	0,11	*	

A *-gal jelölt kapcsolatok esetében az optimalizálás nem volt elvégezhető

Table 2: Genetic (above diagonal) and phenotypic correlations (below diagonal) for measurement I.
** means that optimization could not be finished*
1: Difficulty levels

3. táblázat: **A II. mérőszám esetében számított genetikai (az átló fölött) és fenotípusos korrelációk (az átló alatt).**

Nehézségi szintek (1)	N	1	2	3	4	5
1	209.866		0,83	0,63	0,48	1,00
2	104.210	0,13		0,90	0,67	1,00
3	30.332	0,08	0,13		0,59	-1,00
4	12.084	0,07	0,11	0,13		-1,00
5	1.850	0,03	0,09	0,12	0,10	

Table 3: Genetic (above diagonal) and phenotypic correlations (below diagonal) for measurement II.
1: Difficulty levels

4. táblázat: **A III. mérőszám esetében számított genetikai (az átló fölött) és fenotípusos korrelációk (az átló alatt).**

Nehézségi szintek (1)	N	1	2	3	4	5
1	209.866		1,00	0,99	0,86	1,00
2	104.210	0,16		0,97	0,74	1,00
3	30.332	0,13	0,21		0,86	1,00
4	12.084	0,12	0,19	0,22		1,00
5	1.850	0,08	0,14	0,22	0,23	

Table 4: Genetic (above diagonal) and phenotypic correlations (below diagonal) for measurement III.
1: Difficulty levels

Következtetések és javaslatok

Az első négy nehézségi kategóriában a genetikai korrelációk közepesek és szorosak voltak, a nehézségi szintek közötti távolság növekedésével a korrelációs értékek csökkentek. A versenyrendszer legnehezebb szintjén nyújtott teljesítmény értékelése a kevés adat miatt nem volt lehetséges, így a hasonló értékelésekben annak összevonása a negyedik nehézségi szinten nyújtott teljesítménnyel indokolt lehet.

Köszönetnyilvánítás

A tanulmány az „OTKA-PD83885” kutatási projekt támogatásával, szoros együttműködésben a Magyar Lótenyésztők Országos Szövetségével, és a Magyar Lovassport Szövetség Díjugrató Szakágával valósulhatott meg.

Irodalomjegyzék

1. *Foran, M.K., Reilly, M.P., Kelleher, D.L.,Langan, K.W.,Brophy, P.O.* (1995): Genetic evaluation of show jumping horses in Ireland using Ranks in competition. Proc. of the 46th Ann. Meeting of the EAAP.Praag, Czech Republic.
2. *Hassenstein, C.,Roehe, R.,Kalm, E.* (1998): Estimation of genetic parameters of German Sport Horses accounting for competition in the statistical model. Proc. of the 6th World Congr.Genet.Appl. Livest. Prod. 11-16. Jan. Armidale, Australia. 24. 436-439.p.
3. *Henderson, C.R.* (1975a): Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. Biometrics. 31. 423– 449.p.
4. *Henderson, C.R.* (1975b): Use of relationships among sires to increase accuracy of sire evaluation. J. Dairy Sci. 58. 1731-1738.p.
5. *Huizinga, H.A., Korver, S.,vanderMeij, G.J.W.* (1991a): Stationary performance testing of stallions from the Dutch Warmblood riding horse population. 2. Estimated heritabilities of and correlations between successive judgements of performance traits. Livest. Prod. Sci. 27.245-254.p.

6. *Huizinga, H.A.,vanderWerf, J.H.J.,Korver, S.,vanderMeij, G.J.W.* (1991b): Stationary performance testing of stallions from the Dutch Warmblood riding horse population. 1. Estimated genetic parameters of scored traits and the genetic relation with dressage and jumping competition from offspring of breeding stallions. Livest. Prod. Sci. 27.231-244.p.
7. *Janssens, S.,Geysen, D.,Vandepitte, W.* (1997): Genetic parameters for show jumping in Belgian sporthorses. Proc. of the 48th Annual Meeting of the EAAP.25-28. August. Vienna, Austria.
8. *Kalm, E.* (2003): Tenyészértékbecslés a sportlótenyésztésbenNémetországban. LótenyésztésiKonferencia. November 26-28. Debrecen.
9. *Koenen, E.P.C., Aldridge, L.I.,Philipsson, J.* (2004): An overview of breeding objectives for warmblood sport horses. Livest. Prod. Sci. 88.77-84.p.
10. *Kovac, M., Groeneveld, E.* (2003):VCE-5 User's guide and reference manual version 5.1. Institute of Animal Science Federal Agricultural Research Center (FAL).Neustadt, Germany.
11. *Mihók S.* (2005): A sportló tenyészértékbecslésének sajátosságai, Lovasfutár, 2005. november, 22.
12. *Minkema, D.* (1975): Studies on the genetics of trotting performance of Dutch trotters. I. The heritability of trotting performance. Ann. Genet. Sel. Anim. 8. 511-526.p.
13. *Posta, J., Malovhr, S., Mihók, S., Komlósi, I.* (2010): Random regression model estimation of genetic parameters for show-jumping results of Hungarian Sporthorses. J. Anim. Breed. Genet. 127. 280-288.
14. *Rudiné Mezei A., Posta J., Mihók S.* (2013): Hazai és külföldi tenyésztésű lovak teljesítményének összehasonlítása a díjugrató sportban elért eredmények alapján. Állattenyésztés és Takarmányozás, 62. 57-69.
15. *SAS Institute Inc*. (1999): SAS/STAT Software Release 8.2 Cary NC, USA.
16. *Tavernier, A.* (1988): Advantages of BLUP Animal Model for Breeding Value Estimation in Horses. Livest. Prod. Sci. 20.149-160.p.
17. *Wallin, L., Strandberg, E., Philipsson, J.* (2003): Genetic correlations between field test results of Swedish Warmblood Riding Horses as 4-year-olds and lifetime performance results in dressage and show jumping. Livest. Prod. Sci. 82.61-71.p.

TŐGY- ÉS TŐGYBIMBÓ-TULAJDONSÁGOK ÖSSZEFÜGGÉSE A SZOMATIKUS SEJTSZÁMMAL EGY HAZAI HOLSTEIN FRÍZ TENYÉSZETBEN

Póti Péter[1], Varga Gábor[2], Pajor Ferenc[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
H-2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
[2]Hegykői Mezőgazdasági Zrt,
H-9437 Hegykő, Petőfi u. 10.
Poti.Peter@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A szerzők célja a tőgy-, ill. tőgybimbó-tulajdonságok és a szomatikus sejtszám közötti összefüggések vizsgálata volt. Vizsgálataikat 150 holstein fríz tehénnel végezték egy Hegykő közelében lévő árutermelő tehenészetben. A tőgy főbb morfológiai jellemzőinek (tőgymélység, tőgyfüggesztés, elülső tőgyillesztés, hátulsó tőgymagasság) és a tőgybimbó-tulajdonságoknak (tőgybimbó hossz, elülső és hátulsó tőgybimbó helyeződés) számszerűsítésére 9 pontos bírálati rendszert használtak az esti fejés előtt. A tehéntej szomatikus sejtszámának meghatározása céljából a tejminták gyűjtése a morfológiai vizsgálatokkal egy időben történt. A szerzők többtényezős regresszió analízissel értékelték a vizsgált tőgytulajdonságok hatását a tehéntej szomatikus sejtszámra. A szomatikus sejtszám nagyságának 20-22 %-a volt magyarázható a vizsgált tőgy-tulajdonságok kölcsönhatásával. A vizsgálataink alapján megfogalmazható, hogy a tőgymélység és a tőgyfüggesztés szignifikáns mértékben befolyásolták a tehéntej szomatikus sejtszámát. Eredményeink arra utalnak, hogy a megfelelő tőgy- és tőgybimbó-formára történő szelekció lehetőséget adhat a tehéntej minőségének javítására.
Kulcsszavak: fejhetőség, tejminőség, többtényezős regresszió analízis, tőgybírálat

Relation between udder and teat morphology traits and somatic cell count in a Hungarian Holstein-Friesian herd

Summary

The aim of this research was to evaluate the relationship between major udder and teat morphology traits and milk somatic cell count. The trials were carried out with 150 Holstein-Friesian cows on a commercial dairy farm in the neighbourhood of Hegykő. Udder and teat morphology traits were scored before evening milking. Udder (depth, cleft, fore udder attachment and udder height) and teat (length, fore and rear teat placed) parameters were evaluated using a 9-point rating scale. Milk samples were collected for somatic cell count determinations on the day of udder and teat scoring. Multiple regression analysis was used to investigate the effect of udder traits on goat milk somatic cell count. 20-22 % per cent of the somatic cell count could be explained by interaction of the investigated traits. Based on the results somatic cell count is significantly influenced by the udder depth and cleft. The formation of these anatomical traits has positive effects on the somatic cell count. The results of this study call attention to the possibility

that milk quality could be improved through genetic selection programs aimed at improving udder and teat morphology of dairy cows.
Keywords: milk ability, milk quality, multiple regression analysis, udder morphology

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Számos hazai és külföldi szakember keresett összefüggéseket a tőgy és a tőgybimbó morfológiai tulajdonságai, valamint a szomatikus sejtszám között. A legtöbb szerző a szarvasmarha tőgy- és tőgybimbó-alakulását értékelte (*Holló és Babodi*, 1979; *Rogers és Hargrove*, 1993; *Süpek*, 1994; *Gulyás és Iváncsics*, 2000; *Juozaitiene és mtsai*, 2006; *Sipos és mtsai*, 2009). A tőgy és a tőgybimbó morfológiai jellemzői közepesen, ill. jól öröklődnek (h^2: 0,3-0,7). Így a megfelelő tőgy- és tőgybimbó-formára történő szelekcióval már egy-két nemzedék alatt jelentős változást lehet elérni szarvasmarha fajban (*McDaniel*, 1986). Ez az oka annak, hogy a tejelő fajták küllemi bírálati rendszereiben fontos tulajdonságcsoportot jelentenek a tőgy- és tőgybimbó-tulajdonságok.

A többtényezős módszerek alkalmazásával lehetőség adódik sok tulajdonság közül kiválasztani a változó értékét legnagyobb mértékben befolyásoló tényezőket. Jelen vizsgálatunk célja a holstein fríz tehenek tőgy-, ill. tőgybimbó-tulajdonságainak és a szomatikus sejtszámnak többtényezős regresszió-analízissel történő összefüggés-vizsgálata volt.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat a Hegykői Mezőgazdasági Zrt. tehenészetében 150, azonos laktáció számú és szakaszú holstein fríz tehénnel végeztük. Az állományt mélyalmos istállózott körülmények között tartották. Az állatokat naponta háromszor fejték, a fejés 2×12 állásos SAC fejőházban történt (vákuumnagyság: 48 kPa, ütemarány: 60:40, ütemszám: 90 min^{-1}). Az állományt jellemző laktációs hossz szélsőértékei 280-300 nap, a laktációs termelése pedig 400-450 l voltak.

A morfológiai vizsgálatokat a laktáció első harmadában (átlagosan a 80. napon), az esti fejés előtt végeztük. A vizsgálatok során 1-9 közötti skálán pontoztuk a tőgymélységet, a tőgyfüggesztést, az elülső és hátulsó tőgyillesztést, valamint a tőgybimbó hosszt, vastagságot és a tőgybimbó állást (*Németh*, 2011). A tőgybimbókat alakjuk szerint három csoportba osztottuk: hengeres (1. pont), tölcséres (3. pont), valamint a kettő közötti átmeneti (2. pont).

A tej szomatikus sejtszámának meghatározása céljából a tejminták gyűjtése a morfológiai vizsgálatokkal azonos napon történt. A tejvizsgálatok a reggeli és az esti fejésből származó mintákból történtek. A tejminták gyűjtése a fejőgéphez csatlakoztatott egyedi tejminta-gyűjtő készülékkel történt, a tőgy teljes kifejése mellett. A reggeli és az esti fejésből származó tejmintákat elegyítettük, így tehenenként 40 cm3 mintát gyűjtöttünk tartósító szerrel (bronopol és natamycin) ellátott tégelyekbe. A minták szomatikus sejtszámának, átlagos beltartalmának (tejfehérje, tejzsír, tejcukor) és az összes baktérium számának meghatározása fluoreszcenciás optoelektronika felhasználásával történt (Fossomatic 5000, FT6000 és BactoScan FC; Foss Electric, Hillerød, Dánia).

Az adatok statisztikai értékeléséhez az SPSS 14.0 programot használtunk. Az alkalmazott statisztikai próbák az alábbiak voltak: Shapiro-Wilk teszt, egymintás t-próba, Chi2 teszt, többtényezős regresszió analízis (backward elimination módszer). A módszer alkalmazása során az első modell az összes tulajdonság kölcsönhatásait értékeli, majd a legkisebb hatással

rendelkező tulajdonságot elhagyva új modellt alakít ki, egészen addig, amíg a legjobban illeszkedő modellt meg nem adja.

Eredmények és értékelésük

A tőgy és tőgybimbó tulajdonságok és a tej szomatikus sejtszáma között végzett többtényezős regresszió-analízis eredményeit az *1. táblázat* mutatja be.

***1. táblázat:* A többtényezős regresszió-analízis eredménye**

Tulajdonságok(1)	**1. modell**	**2. modell**	**3. modell**	**4. modell**	**5. modell**	**6. modell**
R^2	0,22	0,22	0,21	0,21	0,20	0,20
Becslés hibája(2)	284,1	283,6	283,1	282,7	282,8	283,3
F érték(3)	5,71	6,60	7,85	9,66	12,51	17,96
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Table :1 Results of multiple regression analysis
(1): traits (2) estimation error (3) F value

A többváltozós elemzés eredményeképp 6 modell alakult ki. Mind a hat modellben szereplő tőgy-tulajdonságok interakciói szignifikánsan befolyásolták a tehéntej szomatikus sejtszámát. A tehéntej szomatikus sejtszám nagyságának 20, ill. 22 %-a magyarázható 7, ill. 2 tulajdonság kölcsönhatásával. Az alkalmazott modellek megbízhatóságát és becslési hibáját értékelve, a 4. és az 5. modellek mutatják a legkedvezőbb értékeket (magas megbízhatóság és alacsony becslési hiba), ezért a 4. és az 5. modellekben található tulajdonságok vizsgálatára fordítottunk nagyobb hangsúlyt. Ezek a tulajdonságok a következők voltak: tőgymélység, tőgyfüggesztés, elülső tőgyillesztés és a hátulsó tőgybimbó helyeződés.

A többtényezős regresszió-analízis együtthatóinak eredményeit a *2. táblázat* mutatja be.

***2. táblázat:* A többtényezős regresszió-analízis vizsgált tényezőinek együtthatói**

Tulajdonságok(1)	**1. modell**	**2. modell**	**3. modell**	**4. modell**	**5. modell**	**6. modell**
Konstans(2)	1454,2	1399,6	1295,4	1331,6	1298,2	1159,6
Tőgymélység(3)	-44,7*	-46,3*	-45,7*	-46,8*	-58,5*	-62,1*
Tőgyfüggesztés(4)	-71,7*	-73,4*	-75,0*	-73,5*	-74,5*	-82,0*
Elülső tőgyillesztés(5)	-22,2	-26,5	-24,6	-23,4	-	-
Hátulsó tőgymagasság(6)	-22,5	-	-	-	-	-
Elülső tőgybimbó helyeződés(7)	24,7	21,4	22,7	-	-	-
Hátulsó tőgybimbó helyeződés(8)	-33,3	-34,6	-35,6	-26,2	-29,8	-
Tőgybimbó hossz(9)	-23,7	-20,4	-	-	-	-

*=szignifikáns különbség, P≤0,05

Table 2: Coefficients of investigated variables of multiple regression analysis

(1) traits (2) constant (3) udder depth (4) udder cleft (5) fore udder attachment (6) rear udder height (7) fore teat placed (8) rear teat placed (9) teat length

A következő tulajdonságok, mint a tőgymélység, valamint a tőgyfüggesztés szignifikánsan befolyásolták a tehéntej szomatikus sejtszámát. A vizsgálatban a sekély tőgymélység és a kedvező tőgyfüggesztés esetén mértük a legkisebb szomatikus sejtszámot. *Rogers és Hargrove* (1993), ill. *Gulyás és Iváncsics* (2000) vizsgálataihoz hasonlóan, a kedvezőbb tőgymélység esetén volt várható kisebb szomatikus sejtszám. A tőgy mélysége és a tőgy függesztése, valamint a tej szomatikus sejtszáma között negatív irányú összefüggést kaptunk, melynek hátterében az állhat, hogy az erősebb függesztő szalaggal rendelkező teheneknek jobb a tőgyszerkezetük, így kisebb a tejük szomatikus sejtszáma, míg rosszabb tőgyszerkezet esetén nagyobb mennyiségű szomatikus sejt ürül a tejbe.

Vizsgálatunkban pozitív összefüggést tapasztaltunk az elülső tőgybimbó helyeződés és a szomatikus sejtszám között. Minél nagyobb pontszámot kapott tehenek elülső tőgybimbói a tőgynegyed legmélyebb pontjához viszonyítva belül helyezkednek el, vélhetően gátolják a kedvező tejleadást, így befolyásolhatja.

A hátulsó tőgybimbó helyeződés viszont negatívan függ össze a szomatikus sejtszámmal. Tehát minél közelebb helyezkednek el egymáshoz annál kedvezőbb a tej higiéniai értéke. Ennek magyarázata a tőgy függesztő szalagjával van összefüggésben, mivel minél erősebb a függesztő szalag, annál közelebb kerülnek a hátulsó tőgybimbók.

A tőgybimbó hossza negatív, de nem szignifikáns összefüggést mutattak a szomatikus sejtszámmal. A gyenge összefüggés hátterében az állhat, hogy mind a túl rövid, mind a túl hosszú tőgybimbók kedvezőtlenül befolyásolhatnak számos tényezőt (pl. a fejhetőséget, könnyebben sérülhetnek). Leginkább a középhosszú és közepes vastagságú tőgybimbók felelnek meg a minőségi tejtermelés feltételeinek.

A fejhetőség szempontjából fontos a tőgybimbó típusa, mivel ez is jelentős befolyást gyakorolhat a tej szomatikus sejtszámára. Az eredmény jelentőségét jól mutatja, hogy a hengeres tőgybimbótól eltérő tőgybimbó alakulás nagyobb fogékonyságra hajlamosít a tőgygyulladás kialakulására, melyet *Montaldo* és munkatársai (1993) kutatásai is megerősítettek. További negatív tényezőként kell értékelni, hogy a tölcséres tőgybimbók, méretükből adódóan, könnyebben sérülnek, növelve a fertőzés kockázatát.

Az értékelt tőgy és tőgybimbó tulajdonságok (tőgymélység, tőgyfüggesztés és hátulsó tőgybimbó helyeződés) vizsgálatára nagy hangsúlyt kell fektetni a mennyiségi és minőségi tehéntej előállítás során.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a GOP-1.1.1-11-2012-0145 azonosító számú és a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatták.

Irodalom

Gulyás L., Iváncsics J. (2000): A szomatikus sejtszám és néhány tőgymorfológiai tulajdonság kapcsolata. Állattenyésztés és Takarmányozás. 49, (4) 331-339.

Holló I., Babodi A. (1979): Különböző genotípusú tehenek fejhetőségi tesztjei. Magyar Állatorvosok Lapja. 34. 407-410.

Juozaitiene, V., Juozaitis, A, Micikeviciene, R. (2006): Relationship between somatic cell count and milk production or morphological traits of udder in Black-and-White cows. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 30, 47-51.

McDaniel, B.T. (1986): A tejtípusú szarvasmarha-tenyésztés programja. ÁGOK-Agroinform, Budapest, 22-45.

Montaldo, H., Martinez-Lozano, F.J. (1993): Phenotypic relationships between udder and milking characteristics, milk production and California mastitis test in goats. Small Ruminant Research. 12, (3) 329-337.

Rajcevic, M., Potocnik, K., Levstek, J. (2003): Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. Agriculturae Conspectus Scientificus. 68, 221-226.

Rogers, G.W., Hargrove, G.L. (1993): Absence of quadratic relationships between genetic evaluations for somatic cell scores and udder linear traits. Journal of Dairy Science. 76, 3601-3606.

Sipos M., Csiszár Á., Vertséné Z.R, Szentléleki A., Tőzsér J. (2009): Első laktációs holstein-fríz tehenek laktáció alatti tőgybimbó-méret változása. Állattenyésztés és Takarmányozás. 58, (2) 109-120.

Süpek Z. (1994): A tőgygyulladások kialakulását befolyásoló tényezők. Állattenyésztés és Takarmányozás. 43, (6) 529-534.

94/71/EC (1994): Directive amending Directive 92/46/EC laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. Off. J. Eur. Community L368, 33-37.

ALPAKÁK GYOMORFÉRGESSÉGE

Prágai Andrea, Kovács Alfréd

Szent István Egyetem, Állattenyésztés- tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
pragai.andrea@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A tevefélék családjához tartozó alpaka (*Lama pacos*), láma (*Lama glama*), vikunya (*Lama vicunga*) és guanakó (*Lama guanicoe*) Dél-Amerikából származik, az Andok térségéből. Az alpakát a vikunyából háziasították a gyapjújáért. Gyapjújának számos előnye van, finom, puha, erős, jól festhető, melegebb a juh gyapjújánál, nem tartalmaz lanolint (*Altizio,* 1998).
Hasonlóan más kérődzőkhöz az alpakára is veszélyesek a különböző férgekkel való fertőzöttség. A nagy gyomorféreg (*Haemonchus contortus*) 2012 nyarán Angliában a nyirkos, párás időjárás miatt nagy problémát okozott. Mivel nehéz felismerni a fertőzött állatokat, ezért nagyon sok el is pusztul a paraziták miatt (*Thomas,* 2012). Ez a parazita hazánkban is igen elterjedt, főként a legeltetett állatokban. Általában esős nyár végén, őszi hónapokban jelenik meg, leginkább a fiatal állatokat veszélyezteti (*Farkas,* 2004). A nagy gyomorféreg a *Trichostrongylidae* családba tartozik, a nőstény kb. 30 mm nagyságú, tarkázott, rozsdásvörös. A hím vörösesszürke, kb. 20 mm hosszú (*Internet I.*).
Különböző tenyészetekben (Békéscsaba, Jobaháza, Mezőtúr, Bábolna, Balassagyarmat, Noszlop) bélsár mintát vettünk. A mintákat a DUO-BAKT Állatorvosi Mikrobiológiai Laborban vizsgálták dúsítással és mikroszkópos módszerrel. A vizsgálatok eredményeként kiderült, a legtöbb mintában nem találtak semmilyen férget, vagy annak petéjét. Kizárólag a jobaházi állományban fordult elő *Strongylida* típusú féreg által okozott fertőzöttség.
Megállapítható, hogy jelenleg az állományok nem fertőzöttek a nagy gyomor féreggel, ennek oka száraz időjárási körülmények is lehettek.
Kulcsszavak: alpaka, betegség, férgesség, nagy gyomorféreg

BARBER POLE'S WORM IN ALPACAS

Abstract

Alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*), vicunas (*Lama vicunga*) and guanacos (*Lama guanicoe*).are members of the Camelid family. Originally they live in South America. Alpacas are domasticated from vicunas, because of the wool. The fiber of the alpcas is warm, fine, soft, warm, and contains less lanolin (Altizio, 1998).
The summer of 2012 was rainy, foggy, the temperature was mild, some crias (young alpacas) biths in heavy rain. This weather was optimal for barber's pole worms (*Haemonchus contortus*), to infect alpacas. For owners not easy to notice the signs of infestation. Because of this reason more alpacas die in the infection of worms than other illness (Thomas, 2012). The Barber's pole worm is common in Hungary too, mostly the grazing animals are infected eith them (Farkas, 2004).
We collected manure samples from some alpacas, from different places. The samples examined in laboratory. In most of them they can't find worms. Only in Jobaháza's samples found *Strongylida*-type worms. Maybe because of the dry, hot weather there wasn't barber's pole worm, we continue the research.
Keywords: alpaca, illness, worminess, large stomach worm

Irodalmi áttekintés

A tevefélék családjához tartozó alpaka (*Lama pacos*), láma (*Lama glama*), vikunya (*Lama vicunga*) és guanakó (*Lama guanicoe*) Dél-Amerikából származik, az Andok térségéből. Az alpakát a vikunyából háziasították a gyapjújáért. Gyapjújának számos előnye van, finom, puha, erős, jól festhető, melegebb a juh gyapjújánál, nem tartalmaz lanolint (*Altizio*, 1998).

Hasonlóan más kérődzőkhöz az alpakára is veszélyesek a különböző férgekkel való fertőzöttség. A nagy gyomorféreg (*Haemonchus contortus*) 2012 nyarán Angliában a nyirkos, párás időjárás miatt nagy problémát okozott. Mivel nehéz felismerni a fertőzött állatokat, ezért nagyon sok el is pusztult a paraziták miatt (*Thomas*, 2012). Visszatekintve, 2011-ben 7 esetet diagnosztizáltak az Egyesült Királyságban, 2012-ben 14-et (*Emerging Threats Quarterly Report*, 2012). Belgiumból is jelentették már nagy gyomorféreggel fertőződött alpakát. A farmon 45 állat volt, melyeket rendszeresen féregtelenítettek (*Sarre*, 2012). Ez a parazita hazánkban is igen elterjedt, főként a legeltetett állatokban. Általában esős nyár végén, őszi hónapokban jelenik meg, elsősorban a fiatal állatokat veszélyezteti (*Farkas*, 2004). Az alpakák főként akkor fertőződhetnek, ha más kérődzőkkel tartják egy legelőn vagy intenzív legelőkön, melyeken korábban kérődzők voltak (*Hill*, 1993, *Beldomenico*, 2003).

A nagy gyomorféreg a *Trichostrongylidae* családba tartozik, a nőstény kb. 30 mm nagyságú, tarkázott, rozsdásvörös. A hím vörösesszürke, kb. 20 mm hosszú (*Internet I.*). Életciklusa kb. 3 hét, a meleg, nyirkos körülmények a legoptimálisabbak számára. Az állatok takarmány felvételkor vehetik fel a lárvákat. A legveszélyesebb a kora reggeltől délelőttig tartó időszak. Ilyenkor a lárvák a takarmányon lévő harmatcseppekben vannak, később, ahogy szárad, a nedves talajba vándorolnak. A lárva az állatban fejlődik tovább. A nőstény több ezer petét képes rakni, és 200 mikroliter vért elfogyasztani naponta (*Burke*, 2005). Alpakákban vérszegénységet, súlycsökkenést okoz. Az érintett állatoknak folyadék halmozódik fel az állkapcsa alatt, amit a vér alacsony fehérje tartalma okoz. Az íny és a szemek sápadttá válnak (*1. kép*). Hasmenés általában nem fordul elő (*Poe*, 2012).

***1. kép*: Membrán színének ellenőrzése, a lazac szín a megfelelő (*Thomas*, 2013)**



Picture 1.: Checking membranes for colorness, salmon pink is good

Anyag és módszer

Különböző tenyészetekben bélsár mintát gyűjtöttük különböző évszakokban (2. kép). A mintákat Jobaházán, Mezőtúron, Békéscsabán, Bábolnán, Noszlopon található tenyészetek alpakáitól vettünk. A tenyészetekben rendszeres féregtelenítést végeznek. Az állatokat olyan területen tartják, ahol korábban más állatot nem tartottak. A kancákat és a csődöröket a farmokon külön terülten tartják, azok szomszédosak egymással. A mintákat DUO-BAKT Állatorvosi Mikrobiológiai Laborban vizsgálták felszíndúsítással és mikroszkópos módszerrel. 3-5 g bélsarat üvegbot segítségével kevernek össze egy kis tálkában dúsítóoldattal. Keverés közben a szuszpenziót átmossák egy kb. 1 mm átmérőjű nyílásokkal ellátott szűrőn. Annyi kell belőle, hogy egy 15 ml-es centrifuga csövet megtöltsön. Majd 1500 fordulat/perc sebességen 2-3 percig centrifugálják, míg a peték a folyadékoszlop tetejére emelkednek. A folyadékoszlop tetejét megérintik egy érdesre csiszolt végű üvegbottal. A rátapadt cseppet egy zsírtalanított vagy tojásfehérje-glicerin elegyével leheletszerűen megkent tárgylemez közepére teszik. Egy csepp víz hozzáadása, és fedőlemezzel való borítás után vizsgálható mikroszkóp alatt a minta.

2. kép: **Mintavétel (Fotó: saját kép, 2013)**



Picture 2: Sampling (Photo: own picture, 2013)

Eredmények és értékelés

A laboratóriumi vizsgálatok során kiderült, hogy a tavasszal vett minták közül a békéscsabai, noszlopi, balassagyarmati alpakák nem fertőződtek parazitákkal. A jobaházi állatok esetében azonban találtak Strongylida-típusú petéket.

***1. ábra*: 2013-ban vett trágya minták különböző alpaka tenyészetekben**

	Tavasz	Nyár	Ősz
Jobaháza	Strongylida-típusú peték	Strongylida-típusú peték	Strongylida-típusú peték
Békéscsaba	-		
Mezőtúr		-	
Bábolna			-
Noszlop	-		
Balassagyarmat	-		

Table 1: Dung sample results in different alcapa farms

A nyáron vett minták közül a mezőtúri tenyészetben negatív lett az eredmény bármilyen féregre nézve. A jobaházi alpakák eredménye újra pozitív lett Strongylida-típusú petére.

A Jobaházán tartott alpakák trágya mintája az ősszel is tartalmazott Strongylida-típusú petéket, míg a bábolnai állatokéban nem volt található semmilyen pete.

A vizsgálatok nem tudták megállapítani, hogy pontosan milyen parazitával fertőződtek a jobaházi alpakák. A jövőben folytatjuk a vizsgálatokat, hogy pontosíthassuk milyen parazita áll a Jobaházán lévő farm fertőzöttsége mögött.

Következtetések és javaslatok

Általánosságban elmondható, hogy a hazánkban található alpaka farmok nem fertőzöttek férgekkel. Azonban a legelő tisztaságára és az importált állatok féregtelenítésére fontos lenne, hogy a tenyésztők odafigyeljenek.

A trágya minták vizsgálata mellett javasolható a FACHMA teszt elvégzése, melynek segítségével a nagy gyomorféreggel való fertőzöttség és annak mértéke mutatható ki a szem nyálkahártyájának színe alapján.

Köszönetnyilvánítás

A munkánkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence 17586-4/2013/TUDPOL támogatta.

A munkánkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

Altizio B. A., Westendorf M. L. (1998): Llamas and alpacas, Rutgers Cooperative Research & Extension, NJAES, Rutgers, The State University of New Jersey

Beldomenico P.M., Uhart M., Bono M.F., Marul C., Baldi R., Peralta J.L. (2003): Internal parasites of free ranging guanacoes from Patagonia, Vet Parasitol, Res.103, 1465-1467 p.

Burke J. (2005): Management of Barber pole Worm in Sheep and Goats in the Southern U.S. , l Farms Research Update, February 2005, published by Dale Bumpers Small Farms Research Center, SPA, ARS, USDA

Emerging Threats Quarterly Report(2012): Miscellaneous Exotic & Farmed Species Surveillance quarterly report Vol 14 No 3 Date November 2012

Farkas R., Fok É., Hornok S. (2004): Állatorvosi parazitológiai diagnosztika, Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi kar, Parazitológiai és állattani tanszék, Bp. 195-199 p.

Hill F.I., Death A.F.,Wyeth T.K.(1993): Nematode burdens of alpacas sharing grazing with sheep in New Zealnd, New Zeal. Vet. J. 41, 205-208 p.

Poe I. (2012): Barber's Polein Sheep, Goats and Alpaca, http://www.lhpa.org.au/__data/assets/pdf_file/0006/430773/Barbers-pole-in-sheep_April2012.pdf

Sarrea C., Claerebouta E., Vercruyssea J., Leveckea B., Geldhofa P., Pardonb B., Alvineriec M., Sutrac J.F., Geurdena T. (2012): Doramectin resistance in Haemonchus contortus on an alpaca farm in Belgium, Veterinary Parasitology *185 (2012) 346– 351*

Thomas S. (2012): Parasite paradise, Alpaca World Magazine, Autumn, 40-45 p.

Internet I: http://www.agraroldal.hu/juh-4.html 2013.08.25.

AZ ALPAKA GYAPJÚ FELHASZNÁLÁSI LEHETŐSÉGEI A GYAPJÚIPARBAN

Prágai Andrea, Kovács Alfréd

Szent István Egyetem, Állattenyésztés- tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
pragai.andrea@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Az Újvilági tevefélék Peru, Chile, Bolívia területéről származnak (Morante, 2009). A vikunya és a guanakó ezek vad formái, míg a láma és az alpaka a háziasított alakjai (Wernery, 2002).
Napjainkban elfogadott, hogy az alpakát a vikunyából háziasították (Bromage, 2011).
Az alpakának két típusa különíthető el, a huacaya és a suri. A két típust elsődlegesen a gyapjú fenotípusa különbözteti meg. A huacaya bolyhos kinézetű, a gyapjú merőlegesen nő, kreppelt, míg a suri gyapjúja hosszú, tincsekbe rendeződik, fényes, 10-12 cm hosszú. A fonáshoz sokszor más fajta gyapjút kevernek hozzá, hogy kevésbé csússzon (Ponzoni, 1997, Internet I).
Az alpaka gyapjú esetében 22 szín különíthető el, a feketétől a barnáig és a fehérig, beleértve más finom árnyalatú színeket is. De egyéb színek is keverhetőek belőle. Nem tartalmaz lanolint, így antiallergén. További előnye, hogy kártolható, keverhető természetes és szintetikus szálakkal is. A juh gyapjúnál sokkal melegebb, erősebb. Puhasága a kasmíréhoz hasonló (Internet IV).
Hazánkban az alpakákat májusban nyírják, egy állat kb. 3-5 kg gyapjút termel. Mivel jelenleg kis mennyiséget termelnek, így azt kézműveseknek adják el. Az alpaka gyapjút világmárkák is szívesen használják, mint például a Gucci vagy a Lacoste, ezért fontos lenne a hazai állatállomány növelése, hogy el tudják adni kisebb gyáraknak. A paplan ipar is érdeklődést mutat iránta, nagyobb tételben.
Kulcsszavak: alpaka, gyapjú, ipar

INDUSTRY OF ALPACA WOOL

Abstract

The new world camelids come from the area of Peru, Chile, Bolivia (Morante, 2009). The vicuna and guanaco are the wild forms, whereas the llama and alpaca are the domesticated forms (Wernery, 2002).Today, it is accepted that the alpaca is domesticated from vicuna (Bromage, 2011). Two types of alpaca isolated the huacaya and the suri. The two primary types of wool distinguish phenotype. The huacaya is fluffy-looking, the wool creped. Suri wool is shiny and it's in long tufts. The spinning wool is often blended with other varieties of wool to make it less slippery (Ponzoni, 1997 Internet I). The alpaca wool in 22 colors isolated, from black to brown to white, including other subtle shades of colors. But other colors can be mixed with it. It does not contain lanolin; because of this it's hypoallergenic. Another advantages, it can be carded, mixed natural and synthetic fibers as well. Alpaca's wool is much warmer and stronger then sheep wool. The softness is like the wool of cashmere (Internet IV). In our country, the alpacas clipped in May. One animal produce round 3-5 kg of wool. As we currently produce small quantities, so it's sold craftsmen. However, alpaca wool is also welcome to use global brands such as Gucci and Lacoste. Therefore, it is important to increase domestic livestock to be able to smaller factories. The web industry is showing interest in it in bulk.
Kulcsszavak: alpaca, woolen, industry

Irodalmi áttekintés

Az Újvilági tevefélék Peru, Chile, Bolívia területéről származnak (*Morante*, 2009). A vikunya és a guanakó ezek vad formái, míg a láma és az alpaka a háziasított alakjai (*Wernery*, 2002).

Napjainkban elfogadott, hogy az alpakát a guanakónál kisebb vikunyából háziasították (*Bromage*, 2011). Dél-Amerikában főként a húsáért és a gyapjújáért tartják (*Altizio*, 1998).

Módosult kérődzők, többször megrágják az elfogyasztott táplálékot, azonban más a gyomrok elrendeződése és az emésztőrendszerük, mint például a juhoknak. Nyakuk hosszú és hajlékony, lábaik karcsúak, melyek két párnázott ujjban végződnek. Szemeik nagyok, kerekek, testük gyapjúval borított (Hoffman, 2006)

Az alpakának két típusa különíthető el, a huacaya és a suri. A két típust elsődlegesen a gyapjú fenotípusa különbözteti meg. A huacaya bolyhos kinézetű, a gyapjú merőlegesen nő, kreppelt, míg a suri gyapjúja hosszú, tincsekbe rendeződik, fényes, 10-12 cm hosszú. A fonáshoz sokszor más fajta gyapjút kevernek hozzá, hogy kevésbé csússzon (*Ponzoni*, 1997, Internet I). Az inkák az alpaka gyapjút az „Istenek gyapjújának" hívták. Úgy tartották, az istenektől kapták ajándékba, míg jól bánnak velük, és tisztelik az alpakákat. Csak a kijelölt embereknek volt szabad fonnia és szőnnie. Az 1800-as évek közepén a brit királyi család, és az előkelő emberek hordtak alpaka gyapjúból készült termékeket (Internet II, III). Dél-Amerikában az állatok 1,5 - 2,8 kg gyapjút termelnek, mely négy pulóverre elegendő mennyiség (*Cardellino*, 2009) Az alpakákat a tenyésztők 80%-a valamilyen ollóval nyírja, míg 20%-uk kést vagy konzervdoboz tetőt használ. Akiknek lehetőségük van, azok nyáron (november-december) nyírják meg az állatokat, de sokan akkor teszik ezt, amikor pénzre van szükségük. A gyapjúból kötelet, krumplis zsákot, ruhát készítenek és eladják a helyi piacon. A nyáron levágott gyapjút viszont összegyűjtik, és gyáraknak értékesítik, melyek exportra gyártják a termékeket (*Hoffman*, 2006).

Angliában egyesületet alapítottak az alpaka gyapjú összegyűjtéséhez. Eddig főleg a mennyiség volt a fontos, de most már a minőségre is egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek (Smith, 2013). Többek közt például luxus minőségű ágyneműket, párnákat is készítenek az Angliában az összegyűjtött gyapjúból (*Whitty*, 2013)

Az alpaka gyapjú esetében 22 szín különíthető el, a feketétől a fehérig, beleértve más árnyalatú színeket is. Nem tartalmaz lanolint, így antiallergén. További előnye, hogy kártolható, keverhető természetes és szintetikus szálakkal is. A juh gyapjúnál sokkal melegebb, erősebb. Puhasága a kasmíréhoz hasonló (*Internet IV*). A gyapjú jellemzői fontosak a feldolgozáshoz. Huacaya alpakák esetében a szálak egyöntetűsége, a finomság, a színek egyesíthetősége, a fürt hosszúsága, a fedőszőr hiánya, a szakítószilárdság, egyöntetűség és a hozam a meghatározóak. Surik esetében a fényesség, a finomság, a színek egyöntetűsége, a fürt hosszúsága, a szakítószilárdság, a fedőszőr hiánya, az egyöntetűség, és a hozam a fontos tulajdonságok (*Australian Alpaca Association*, 2013).

Anyag és módszer

A Győr melletti Jobaházán található alpaka tenyészetben 2013 áprilisában 11 saját és 2 más helyről érkező állat gyapjúját nyírták le. A munka megfelelő elvégzéséhez szükségünk volt egy nyíróasztalra, tárolóra a gyapjúhoz, nyírógépre, elektromosságra, fertőtlenítőre. Egy-egy alpakát két ember rak fel az asztalra. Az állat mind a négy lábát kikötjük, hogy ne tudjon mozogni. Először az értékes gyapjú levágása a történik, oldalról, és a hátról. Ezt követően lábakról nyírják le a gyapjút. Ebben a munkafázisban elvégezhető a körmök hosszának

megigazítása is. Utána a nyakról nyírják le a szőrt, ez szintén jó minőségű, de rövid. Az asztalon az alpaka könnyen megfordítható, a rögzítések leszedése nélkül. A fejen általában rajta hagyják a szőrt, mivel az védi az állatot a napsugárzástól. A farokról higiénia okokból jobb levágni a gyapjút. Végül a túlnőtt fogak visszavágása is megtörténik. Az egész folyamat nagyjából 15 percet igényel. A színes és a fehér gyapjút külön zsákba gyűjtöttük.

***1. kép*: Alpaka nyírás Jobaházán (fotó: Prágai, 2103)**



Picture1: Alpaca shearing

***2. kép:* Alpaka a nyírás után (fotó: Prágai, 2013)**



Picture 2: An alpaca after shearing

***3. kép*: Fog rövidítés (fotó: Prágai, 2013)**



Picture 3: Making teeth shorter

Eredmények és értékelés

Az alpaka gyapjúra van igény világszerte. Egyes divat cégek nemes gyapjúnak hívják. Különböző ruházati termékeket, ágyneműket készítenek belőle. Sok helyen luxuscikként is értékesítik. A hazánkban lenyírt gyapjút jelenleg kézművesek veszik át, azonban érdeklődött utána a paplan ipar is. A kevésbé értékes szőrt (például a lábról), pedig kötélkészítő vásárolná fel. Lehetőség lenne még Brandenburg-ba küldeni, ahol feldolgozzák a nyers gyapjút, már 500 g-os mennyiségtől, azonban a szállítás költség miatt, ez is csak akkor érné meg, ha nagyobb mennyiséget tudnának küldeni.

Következtetések és javaslatok

Egyre többen érdeklődnek az alpaka tartás és tenyésztés iránt. Fontos lenne, hogy akik újonnan szeretnének bekapcsolódni, ők is viszonylag jó minőségű állatokat vásároljanak. Így összességében nem csak a gyapjú mennyiségét, de a minőségét is javítani lehetne.

Köszönetnyilvánítás

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL és az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat támogatta.

A munkánkat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

Altizio B.(1998): Llamas and Alpacas, Rutgers Cooperative Research & Extension, NJAES, Rutgers, The State University of New Jersey.Desktop publishing by Rutgers-Cook College Resource Center

Australian Alpaca Association (2013): A class act, Alpaca World, Summer, 52-54 p.

Bromage G. (2011): Llamas and alpacas, A guide to management, The Crowood Express Cardellino R., Muelle J. (2009): Wool and other animal fibers in South America, Proceedings of the Symposium on Natural Fibres, 43-52 p

Czaplicki Z.(2012): Properties and Structure of Polish Alpaca Wool, FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe 2012, 20, 1(90) 8-12.

Hoffman E. (2006): The complete alpaca book, Bonny Doon Press

Morante R., Goyache F., Burgos A., Cervantes I., Perez-Cabal M.A., Gutierrez J.P.(2009): Genetic improvemenet for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacomara experience Anim. Genet. Resour. Inf., 45, pp. 37–43.

Ponzoni, RW; Hubbard, DJ; Kenyon, RV; Tuckwell, CD; McGregor, BA; Howse, A; Carmichael, I; Judson, GJ (1997):Phenotypes Resulting From Huacaya by Huacaya, Suri by Huacaya and Suri by Suri Alpaca Crossings, Proc. Adv. Anim. Breed.Gen. 12:

Smith H. N. (2103): A Spin on British Alpaca, Alpaca World Magazine, Autumn, 28-30 p.

Wernery U., Kaaden O-R. (2002): Infectious Diseases in Camelids, Georg Thieme Verlag

Whitty P. (2013): The birth of a bedding company how did this happen?,Alpaca World Magazine, Autumn, 50-52 p.

Internet I: http://www.criativeacres.com/ViewArticle.aspx?ID=4 2013.április.03.

Internet II. http://www.whisperingpinesalpacas-indiana.com/ 2013.szeptember 10.

Internet III. http://americanalpacatextiles.com/index.php?option=com_content&view=article&id=50&Itemid=60 2013.szeptember 10.

Internet IV: http://www.alpacamoon.com/fiber.html 2013.június.20.

AGRÁRERDÉSZETI RENDSZEREK ÉS ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEIK A HAZAI ÖKOLÓGIAI GAZDÁLKODÁSBAN

Saláta Dénes[1], Varga Anna[2], Penksza Károly[3], Malatinszky Ákos[4], Szalai Tamás[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Ökológiai Gazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
[2]Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar, 7624 Pécs Ifjúság útja 6.
[3]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Növénytani és Ökofiziológiai Intézet, Növénytani Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
[4]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Természetvédelmi és Tájökológiai Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
Szalai.Tamas@kti.szie.hu

Összefoglalás

Az agrárerdészeti rendszerek olyan összetett mezőgazdasági rendszerek, amelyek egy időben és térben több területhasználatot ötvöznek, - erdészet, növénytermesztés és állattenyésztés - a területek többcélú hasznosítását valósítva meg ezáltal. Optimális esetben ezen rendszerek lehetővé teszik, hogy a fásszárú fajok, természetes növényzet és termesztett haszonnövények, valamint a haszonállatok egymásra kifejtett pozitív kölcsönhatásai megnyilvánulhassanak, kialakítva így egy tartamosabb gazdálkodási formát. Napjainkban világszerte a trópusi és szubtrópusi területeken a legelterjedtebb az alkalmazásuk. Az európai országok közül Spanyolországban és Portugáliában találhatóak meg legnagyobb arányban, azonban meg kell jegyezni, hogy a Kárpát-medencében nagy történelmi múlttal rendelkező gazdálkodási formákról van szó. Többkomponensű és multifunkcionális rendszerek lévén különösen alkalmasak lehetnek egy tartamos gazdálkodás megvalósítására, nem csak táji, hanem kisebb léptékben is. Európában előforduló számos típusuk közül hazánkban legelterjedtebbek a köztes művelés és a mezővédő erdősávok mellett a fás legelők és legelőerdők (voltak), mindazonáltal számos olyan formájuk ismert, amely új lehetőséget jelenthet az ökológiai gazdálkodásban.
Kulcsszavak: agrárerdészet, ökológiai gazdálkodás, fás legelő

Agrosilvopastoral systems and possibilities of application in organic farming in Hungary

Abstract

The agroforestry systems are complex agricultural systems make possible multifunctional use of an area in the same time and space. Moreover these systems contain forestry, cropping and animal husbandry and – in optimal case – evolve a long-term management type through positive effect of elements to each other. Nowadays, the most widespread application of agroforestry systems is mainly typical in Tropical and Subtropical areas, while in Europe the highest ratio can be found in Spain and Portugal. In the other side these management types had notable tradition and history in the Carpathian Basin. Because of their complexity and multifunctionality these systems are especially applicable to achieve long-term management – in landscape scale and

smaller scales as well. Over the intercropping, shelter-belts the wood pastures and grazing forests are/were the most spread in Hungary from their several European variants. Nevertheless, several types are known which could be new possibilities in organic farming.
Keywords: agroforestry, organic farming, wood pasture

Bevezetés

„Agroerdő-gazdálkodás alatt olyan földhasználati rendszerek és technológiák gyűjtőfogalmát értjük, amelyben erdei fás növényeket tudatosan együttesen alkalmaznak szántóföldi kultúrákkal és/vagy állattartással azonos földhasználati egységeken belül – különböző térbeli elrendezésben vagy időbeli sorrendben.” (*Nyári*, 2006a).

Az agrárerdészeti rendszerek lehetővé teszik, hogy a fásszárú fajok, természetes növényzet és termesztett haszonnövények, valamint a haszonállatok egymásra kifejtett pozitív kölcsönhatásai megnyilvánulhassanak, kialakítva így egy tartamosabb gazdálkodási formát. Mindazonáltal a pozitív hatások akkor érvényesülnek, ha a különböző összetevők között valós kölcsönhatás alakul ki, továbbá a tartamos működőképesség megvalósul, ennek feltétele, hogy a rendszer a befoglaló környezettől nem idegen módon kerüljön adaptálásra, valamint legalább helyi, de akár térségi szintű gazdasági- és társadalmi beágyazásra is történjen, akár egy már megszilárduló keretekkel rendelkező, nagyobb rendszer részeként, amilyen az ökológiai gazdálkodás.

Irodalmi áttekintés

Az agrárerdészeti rendszerek témájában használt fogalmak tisztázása során *Nair* (1985, 1990, 1993, 1994) és a *HDRA* (é.n.) munkái szolgáltatnak útmutatásul, míg a hazai viszonyokat *Nyári* (2006a, 2006b, 2006c) tárgyalja részletesen. A gazdálkodási módok és lehetőségek széles köre igényli a rendszerek csoportosítását, amely több szempontból történhet. A különböző osztályozási lehetőségek alapjait *Szedlák és Szodfridt* (1992) gyűjtötte össze. A komponens tisztázásában *Mosquera-Losada és mtsai* (2009), valamint *Nair* (1994) munkái szolgáltak alapul, míg a komponens alapú osztályozás témájában *Nair* (1985, 1990, 1993), *Young* (1997), *McAdam és mtsai* (2009) munkái kiemelkedő jelentőségűek. Az egyes területhasználatokhoz kapcsolható funkciókról *McAdam és mtsai* (2009) írnak részletesen. Az agrárerdészeti rendszerek európai alkalmazását *Rigueiro-Rodríguez és mtsai* (2009) tárgyalják, míg a silvoarable rendszerek európai képéről *Eichhorn és mtsai* (2006) és *Herzog* (1998) nyújtanak átfogó képet. A hazai gazdálkodási gyakorlatról és lehetőségekről *Nyári* (2006a, 2006b, 2006c) közölt cikkeket, míg a fás legelők és legelőerdők témakörének történelmi aspektusáról (*Varga* 2008, *Varga és Bölöni*, 2008, *Saláta és mtsai*, 2009) publikáltak. A fás legelők jelenlegi helyzetéről *Bölöni és mtsai* (2008) közölnek adatokat. Az itthon nagy hagyományokkal rendelkező kaszált gyepű gyümölcsösökről *Malatinszky* (2004), míg a köztes művelésről *Hrobáts* (1931) írtak részletesen.

Eredmények és értékelésük

Az agrárerdészeti rendszerek megfelelő működtetése esetén olyan pozitív hatások érvényesülhetnek, amelyek hozzájárulnak a modern környezet- és tájgazdálkodási szemléletű, értékeket őrző és teremtő, tartamos gazdálkodás megvalósításához. Az alkalmazás előnyei között mindenképpen kiemelendő a talaj megóvása. A mezőgazdaságban igen jelentős az energia-

hatékonyság szerepe, amelyhez az agrárerdészeti rendszerek a fás szárú komponensen keresztül olcsóbb és könnyebben hozzáférhető, esetlegesen jobb minőségű tűzifát, építőanyagot biztosíthatnak. Az élő kerítéseknek, sövényeknek, vonalas rendszereknek kiemelkedő jelentősége lehet az egyes funkciók térbeli lehatárolásában, a haszonnövények védelmében (*HDRA,* é.n.). Mindenképpen megemlítendő a sokféleség minél több szinten megvalósuló védelme, amely, elengedhetetlen a változó környezethez való hosszabb távú alkalmazkodásban. A sokféleséghez kapcsolódóan a növényi erőforrásokon kifejtett pozitív hatások közül említendő a féltermészetes, agrár-élőhelyek természetességének növekedése és a gazdálkodás területén található növényfajok és -fajták számának növekedése, amely utóbbi segíthet a gazdálkodás stabilizálásában. Az ökonómiai beágyazás szempontjából jelentős lehet az agrárerdészeti rendszerekben megvalósuló kiegyensúlyozottabb bevétel-eloszlás. A termékvertikum szélesedése (pl. az állattartással vagy fával kapcsolatos hasznok megjelenése egy növénytermesztési célú rendszerben) mindenképpen hozzájárulhat a gazdasági stabilitás megvalósulásához (*HDRA,* é.n.). Mindazonáltal kiemelten fontos a megfelelő gazdálkodási tudás megléte, továbbá a gazdálkodási fegyelem megtartása.

Az agrárerdészeti rendszerek csoportosítására számos lehetőség van: az időbeli elrendezés, a térbeli elrendezés, a rendszerben részt vevő komponensek, valamint a struktúra (*Szedlák és Szodfridt,* 1992). Időbeli elrendezés alapján megkülönböztetünk váltógazdálkodást – amelynek hazánkban kifejezetten történeti vonatkozásai vannak), parlag alapú rendszereket pl. Taungya (tulajdonképpeni erdősítés parlagterületeken, azonban van átmeneti használat is, erdőnevelés során élelmiszernövény termelése) és egyidőben alkalmazott rendszereket. Térbeli elrendezés alapján főként az itthon köztes gazdálkodásként ismert műveléshez hasonló gyakorlatokat különböztetik meg, úgy mint szegélyfásítás, váltakozó sorok, váltakozó sávok és ezek véletlenszerű keverése (*Szedlák és Szodfridt,* 1992). A komponens alapú rendszerezés során megkülönböztetünk növénytermesztést és fásszárúakat ötvöző silvoarable rendszereket, állattartást és erdészetet ötvöző silvopastoral rendszereket, illetve növénytermesztést és állattartást ötvöző egyéb rendszereket (*Nair,* 1985, 1990) (*1. ábra*).

1. ábra: **Agrárerdészeti rendszerek komponens alapú osztályozása Nair (1990) alapján Saláta és Kenéz**

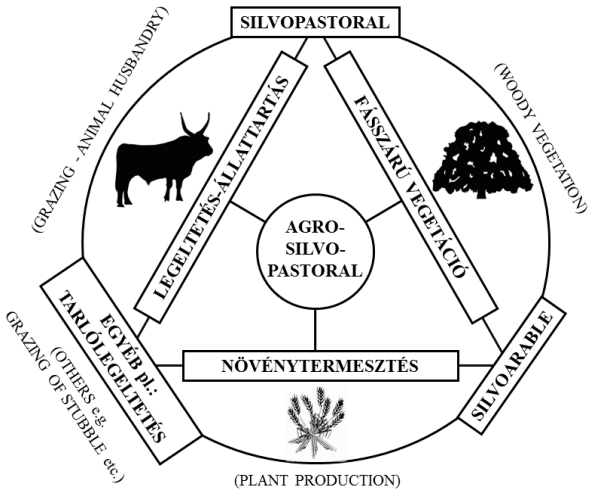


Figure 1. Component based classification of agroforestry systems. Saláta and Kenéz based on Nair (1990)

Struktúra alapján megkülönböztethetőek azon gazdálkodási módok, ahol növénytermesztés történik fák alatt, agroerdők, lineáris elrendezésű rendszerek, állattartásos erdőgazdálkodás, nem egyidejű rendszerek és kevésbé jelentős agrárerdészeti rendszerek (*Torquebiau,* 2000). Az agroerdők közé sorolhatóak az agrárerdészeti házikertek, települések és közösségek erdei kertjei, vegyes használatú erdőrészletek, illetve a többeshasználatú agrárerdészeti buffer zónák. Lineáris vagy vonalas rendszernek tekintjük a szélfogó és mezővédő erdősávokat, parcella- és birtokhatár-jelző növényzetet, élősövényeket, élő kerítéseket, talajvédelmi sövényeket és bokorsávokat, sorközti ágyásokat és művelést, útmenti fasorokat, egyéb fasorokat és erdősávokat. Az állattartásos erdőgazdálkodás csoportjába tartoznak a következő tevékenységek: legeltetés és lomblegeltetés fás/erdős területeken, legelőfásítások, lombtakarmányozás, partok és töltések legeltetése. Nem egyidejű rendszerek a váltóművelés, az erdősítendő parlagok és a már említett Taungya rendszerek. A kevésbé jelentős agrárerdészeti rendszerek: selyemhernyótartás, lakktermelés, fákra alapozott méhészet és fákra alapozott aquakultúrák.

Az agrárerdészeti rendszerek szélesebb körben a trópusi területeken kutatottak, ismertek, azonban európai használatuk is igen jelentős múltra vezethető vissza és napjainkban is jelentős területen találhatóak meg. Ezek csoportosítására is számos lehetőség van, ezt *Nair* (1990, 1993) és *Young* (1997) alapján, módosítva *McAdam és mtsai* (2009) foglalták össze: a rendszerek elkülöníthetőek komponenseik alapján, túlsúlyban lévő földhasználat alapján, tér és időbeli beosztásuk alapján, agro-ökológiai, szocio-ökonómiai és funkcióik alapján. A komponensek definiálását *Mosquera-Losada és mtsai* (2009) (*Nair,* 1994 alapján módosítva) végezték el: silvoarable agrárerdészet, erdei termesztés, parti buffer sávok, használt parlagok, többcélú faállományok és silvopasture rendszerek. A betöltött funkciók alapján *McAdam és mtsai*, (2009) a következőeket rendelik ezen rendszerekhez: termelés, élőhely, szabályozó szerep, valamint kulturális funkciók.

Az európai agrárerdészeti rendszerekről *Rigueiro-Rodríguez és mtsai* (2009) írnak részletesen. Az egyéves vagy évelő kultúrákat és egymástól távolabb eső fákat egyaránt tartalmazó silvoarable rendszerek közül kiemelendőek az oliva alapú módok, amelyek Görögországban és Olaszországban a legelterjedtebbek, gabona-, zöldség- vagy takarmánynövények termesztését foglalják magukba (*Eichhorn és mtsai*, 2006). Megemlítendőek a faültetvények többes használata és a lombtakarmány alapú rendszerek. Kiemelendőek továbbá a gyümölcsfa alapú rendszerek, ahol köztes növények termesztésével, takarmányszéna előállításával vagy legeltetéssel is hasznosítják a területeket (*Herzog*, 1998). Európában a legjelentősebb kiterjedéssel a tölgyfára alapuló rendszerek rendelkeznek (*Eichhorn és mtsai,* 2006).

A hazai gazdálkodási gyakorlatban (*Nyári*, 2006a, 2006b, 2006c) a silvopastoral rendszerek, mint fás legelők és legelőerdők voltak a legelterjedtebbek (*Varga*, 2008, *Varga és Bölöni,* 2008, *Saláta és mtsai,* 2009), illetve rendelkeznek évezredekre visszanyúló hagyományokkal (*Szabó,* 2005), mindazonáltal a gazdálkodási környezet megváltozása, az intenzifikáció következőben mindösszesen 5500 hektárnyi területen maradtak fenn (*Bölöni és mtsai*, 2008). Ezen kategóriában (fásszárú komponens és állattartás) megemlítendőek az alkalmi legelők pl. tarlók, és erdősávok legeltetése, továbbá a jelentős hagyományokkal rendelkező, extenzív, kaszált gyepű gyümölcsösök (*Malatinszky*, 2004). Az erdészetet és növénytermesztést ötvöző rendszerek (silvoarable) közül hazánkban a köztesművelés maradt meg időben legtovább (*Hrobáts,* 1931).

Következtetések és javaslatok

Figyelembe véve a nemzetközi irodalmi adatokat, a hazai agroerdő-gazdálkodás történelmi viszonyait, valamint hazai helyzetét megállapítható, hogy ezen rendszereknek mindenképpen van létjogosultsága a magyarországi mezőgazdálkodásban. Leginkább az ökológiai gazdálkodás az a rendszer, amelybe viszonylag könnyen integrálhatóak. A hazai hagyományok fényében érdemes fontolóra venni a fás legelők, illetve a kaszált, esetleg legeltetett gyepű gyümölcsösök rehabilitációját és újak kialakítását (*Varga és mtsai*, 2012). A hagyományos legeltetési rendszerben egykor fontos szereppel bíró területek legeltetésének (pl. tarlók, mezsgyék) elősegítése szorgalmazandó, amennyiben van lehetőség annak megvalósítására (pl. intenzív földművelési rendszerek esetében nehézségekbe ütközik). A hazánkban még nem vagy hosszú ideje már nem alkalmazott gazdálkodási módok közül, mindenképpen érdemes fontolóra venni némely silvoarable rendszerek alkalmazását, hazai körülményekhez való adaptálását. Kisebb léptékben nem tartjuk lehetetlennek ökológiai művelésű területeken árnyéktartó fák nevelését. Kísérleti jelleggel érdemes lenne agrárerdészeti kertek, illetve települések és közösségek erdei kertjeinek működőképességét vizsgálni. A korai betakarítású, viszonylag kevés munkát igénylő ültetvények esetén a sorközök alkalmasak lehetnek rövid tenyészidejű növények termesztésére, illetve takarmány előállítására. Táj- és talajvédelmi megfontolásból érdemes foglalkozni lineáris rendszerek alkalmazásával, illetve többoldalú hasznosításával (*Szarvas*, 2009). Hazánk jelenlegi törvényi szabályozása szerint erdeink legeltetése tilos, azonban egyes területeken szabályozott körülmények között ezen erdőhasználati mód újragondolása szükséges. Továbbá az egykor hagyományos lomblegeltetés és a lombtakarmányozás kísérleti keretek között alternatíva lehet az állattartás számára (Varga és mtsai, 2012). A kevésbé jelentős agrárerdészeti rendszerek közül kiemelendő a fákra alapozott méhészet lehetősége, amely kiegészítő jelleggel, viszonylag könnyen bevezethető az ökológiai méhészetbe.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk a Kutató Kari Kiválósági Támogatás (Research Centre of Excellence-17586 4/2013/TUDPOL) segítségével valósult meg.

Irodalomjegyzék

1. *Bölöni J., Molnár Zs., Bíró, M., Horváth F.* (2008) Distribution of the (semi-) natural habitats in Hungary II. Woodlands and shrublands, Acta Botanica Hungarica, 50, 107-148.
2. *Eichhorn M. P., Paris P., Herzog F., Incoll L. D., Liagre F., Mantzanas K., Mayus M., Moreno G., Papanastasis V. P., Pilbeam D. J., Pisanelli A., Dupraz C.* (2006): Silvoarable systems in Europe – past, present and future prospects Agroforestry Systems, 67: 29-50.
3. *HDRA – the organic organisation* (é.n.): Agroforestry in the tropics.
4. *Herzog, F.* (1998): Streuobst: a traditional agroforestry system as a model for agroforestry development in temperate Europe Agroforestry Systems, 42: 61-80.
5. *Hrobáts J.* (1931): A mezőgazdasági köztes műveléssel kapcsolatos felújításról. Erdészeti Lapok, 70: 370-378.
6. *Malatinszky Á.* (2004): Botanikai értékek és tájgazdálkodási formák kapcsolata a Putnoki-dombságban. Tájökológiai Lapok, 2: 65-76.
7. *McAdam, J. H., Burgess, P. J., Graves, A. R., Rigueiro-Rodríguez, A., Mosquera-Losada, M. R.* (2009): Classification and Functions of Agroforestry Systems in Europe in:

Rigueiro-Rodríguez és mtsai, (eds.) (2009): Agroforestry in Europe: Current status and Future Prospects.
8. *Mosquera-Losada, M. R., McAdam, J. H., Romero-Franco, R., Santiago-Freijanes, J. J., Rigueiro-Rodróguez A.* (2009): Definitions and Components of Agroforestry Practices in Europe in: *Rigueiro-Rodríguez és mtsai,* (eds.) (2009): Agroforestry in Europe: Current status and Future Prospects.
9. *Nair, P. K. R.* (1985) Classification of agroforestry systems. Agroforestry Systems, 3: 97-128.
10. *Nair P. K. R.* (1990): Classification of agroforestry systems. In: *MacDicken K. G., Vegara N. T.* (eds.) (1990) Agroforestry: Classification and Management.Wiley, New York.
11. *Nair P. K. R.* (1993): An Introduction to Agroforestry. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
12. *Nair P. K. R.* (1994): Agroforestry. Encyclopedia of agricultural sciences. Academic, New York
13. *Nyári L.* (2006a): Az agroerdő-gazdálkodás fogalma és történelmi háttere. Agrár-erdészeti Jegyzetek, 1.
14. *Nyári L.* (2006b): Az agroerdő-gazdálkodás tájhasználati megközelítései, jelenlegi jogszabályi keretei és jövőbeni lehetőségei. Agrár-erdészeti Jegyzetek, 2.
15. *Nyári L.* (2006c): Az agroerdő-gazdálkodás termelési rendszerei. Agrár-erdészeti Jegyzetek, 3.
16. *Rigueiro-Rodríguez A., McAdam J., Mosquera-Losada M. R.* (eds.) (2009): Agroforestry in Europe: Current status and Future Prospects. Springer Science and Business Media B. V.
17. *Rois-Díaz M., Mosquera-Losada R., Rigueiro-Rodríguez A.* (1999): Biodiversity Indicators on Silvopastoalism across Europe. EFI Technical Report 21., European Forest Institute.
18. *Saláta D., Horváth S., Varga A.* (2009): Az erdei legeltetésre, a fás legelők és legelőerdők használatára vonatkozó 1791 és 1961 közötti törvények. Tájökológiai Lapok, 7: 387-401.
19. *Schnabel S. és Ferreira A.* (2004): Sustainability of agrosilvopastoral systems – Dehesas, montados. Advances in geoecology 37. Reiskirchen, Germany.
20. *Szabó P.* (2005): Woodland and forests in medieval Hungary. Archaeopress, Oxford, England.
21. *Szarvas P.* (2010): Mezővédő erdősávok, fasorok jellemzése, ökológiai feltárása, kihatásai. Doktori értekezés, Debreceni Egyetem.
22. *Szedlák T. és Szodfridt I.* (1992): Agroerdőgazdálkodás: a trópusi területek igéretes lehetősége. Erdészeti Lapok 127: 224-225
23. *Torquebiau, E. F.* (2000): A renewed perspective on agroforestry concepts and classification. Life Sciences 323 (2000): 1009-1017.
24. *Varga A.* (2008): Fáslegelők és legelőerdők egykori és mai vegetációdinamikája. Kitaibelia, 13: 195
25. *Varga A. és Bölöni J.*(2008): Erdei legeltetés, fáslegelők, legelőerdők tájtörténeti kutatása. V. MTBK Természetvédelmi Biológiai Konferencia. Természetvédelmi Közlemények, 15: 68-79.
26. *Varga A., Máté A., Molnár Zs., Nagy T., Saláta D., Molnár Cs.* (2012): Agrár-erdészeti rendszerek használatának javaslata. Kézirat, Budapest-Kecskemét.
27. *Young A.* (1997): Agroforestry for Soil Management. CABI, Wallingford, UK.

SZARVASMARHA RCAN2 GÉN SZABÁLYOZÓ RÉGIÓJÁBAN TALÁLHATÓ SNP VIZSGÁLATA TRANSZGÉNIKUS EGÉRMODELLBEN

Skoda Gabriella[1], Kerekes Andrea[1], Hoffmann Orsolya Ivett[1], Barta Endre[2], Dominique Rocha[3], Véronique Lejard[3], Hiripi László[1], Bősze Zsuzsanna[1]

[1] Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiotechnológiai Intézet
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.
[2] Debreceni Egyetem. 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.
[3] Génétique Animal et Biologie Integrative (GABI) INRA UMR1313, Franciaország
skoda@abc.hu

Összefoglalás

A szarvasmarha gazdaságilag fontos tulajdonságaiban szerepet játszó gének szabályozó régióinak egypontos nukleotid-polimorfizmus (rSNP) - vizsgálatát végeztük el transzgénikus egérmodellben egy nemzetközi együttműködés keretében.
A bioinformatikai munkákat követő genotípus/génexpresszió asszociációs vizsgálatok eredményei alapján olyan rSNP-ket választottak ki az együttműködő partnerek a szarvasmarha több ezer szabályozó régióiban lévő egypontos nukleotid-polimorfizmusai közül, amelyek valószínűleg befolyásolják a hozzájuk tartozó gén kifejeződését. A kiválasztott 13 pár promóterben található SNP különböző módon történő tesztelése után, a markergénekkel (AcGFP, DsRed) ellátott vektor plazmid konstrukciókat egérmodellben teszteltük validálás céljából. A megérkezett plazmidok lineáris DNS-ének egér embrióba juttatásával kívántunk transzgénikus állat modelleket létrehozni. Az egyik vizsgált gén az RCAN2 (regulator of calcineurin) volt, mely elsősorban az agyban, szívben és vázizomban kifejeződő proteint kódol. Az átíródó fehérje a kalcineurin szabályozásában játszik szerepet, mellyel kalcineurinra érzékeny gének transzkripciós faktorának kötődését befolyásolja. A táplálék bevitelt és testsúlyt kontrollálja, ezáltal szerepe van az életkor és diéta indukált elhízásban, tehát gazdasági szempontból fontos tulajdonság szabályozásáért felelős. A projekt részeként szarvasmarha RCAN2 génjének promóterében előforduló két különböző SNP-t tartalmazó plazmidokkal létrehoztunk két transzgénikus egér vonalat (30 és 30M). Az eddig megszülető utódok genotipizálása során 3-3 transzgénikus egyedet azonosítottunk, melyek feldolgozása során qPCR segítségével hasonlítottuk össze a két vonal fluorescens markereinek expressziós szintjét, amely a vártnak megfelelő eredményt hozott. Ezzel alátámasztottuk az RCAN2 gén két rSNP-je által produkált expressziós különbség meglétét *in vivo* körülmények között.
Tehát az SNP-függő génexpresszió ismerete és a kifejlesztett módszerek alkalmazása megkönnyítheti a gazdasági szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkező haszonállatok tenyésztéséti eljárásainak korszerűsítését.
Kulcsszavak: szarvasmarha, rSNP, regulomix, RCAN2, kalcipresszin2, takarmány felvétel szabályozás

Examination of a regulatory SNP of bovine RCAN2 gene in transgenic mouse model

Abstract

We examined numerous regulatory single-nucleotid-polymorphisms (rSNP) of bovine genes with economically important traits in transgenic mouse models.
After bioinformatical studies and association surveys of genotypes/gene expressions, several rSNP-s were selected by our colleagues, which probably can regulate linked gene expression. These selected rSNP pairs (13 pair) were tested with different methods, finally we validated the vector plasmid constructions containing two marker genes (AcGFP, DsRed) in mouse model. We produced transgenic animal models through embryo microinjection with linearised plasmid DNAs. One of the examined genes in cattle was RCAN2 (regulator of calcineurin), which is particularly expresses in brain, heart and skeletal muscle. The RCAN2 protein has important role in the calcineurin ruglation. This protein has influence to the attachment of transcription factors in the promoter region of calcineurin sensible genes. RCAN2 protein controls the food intake and body weight, hereby it plays an important role in age- and diet-induced obesity. Thus, it can be responsible for the regulation of economically relevant traits.
We created two transgenic mouse lines (30 and 30M) with two alleles of RCAN2 promoter different only in the rSNP studied. After genotyping progenies, we could identify 3-3 transgenic offspring. We compared the expression level of marker genes by qPCR, and we confirmed that there is an expression difference between the examined alleles *in vivo*. Consequently, the study of SNP-dependent gene expression can be relevant in animal breeding.
Keywords: bovine, rSNP, regulomix, RCAN2, calcipressin2, regulation of food intake

Bevezetés

A szarvasmarha szabályozó polimorfizmusainak vizsgálatát egy francia-magyar együttműködés keretében végeztük el az elmúlt évben (Reglomix projekt). Célunk volt egy nagyléptékű regulációs egypontos nukleotid-polimorfizmus (rSNP) vizsgálat megvalósítása szarvasmarhában, ami fontos lépésnek tekinthető a szarvasmarha genom funkcionális annotációja felé.

Az egypontos nukleotid-polimorfizmusok olyan DNS szakasz variációk, amelyek csak egy nukleotidban különböznek egymástól. Megkülönböztetünk ún. kapcsolt SNP-ket, melyek a géneken kívül helyezkednek el, ill. a géneken belül található SNP-ket. A kapcsolt polimorfizmusok nincsenek hatással a képződő fehérjék mennyiségére és minőségére, míg a géneken belül található polimorfizmusok befolyásolhatják a termelődő fehérje mennyiségét (nem kódoló SNP, a szabályozó régiókban), és megváltoztathatják a keletkező fehérjék aminosav sorrendjét (kódoló SNP, a szabályozó régión belül).

Vizsgálatunk tárgya: a promóter régiókban található konzervált polimorfizmusok, ezen belül is a transzkripciós faktor kötőhelyekhez kapcsolódó SNP-k hatásának tesztelése. Ezek a DNS szekvencia változatok a transzkripciós-faktor és transzkripciós-faktor kötőhely interakciójának befolyásolásán keresztül lehetnek hatással a képződő fehérjék mennyiségére, illetve a transzkripció mértékére.

Az átfogó nemzetközi program első lépéseként bioinformatikai elemzéseknek vetették alá a kollégák (Barta és mtsai.) a publikus adatbázisokban elérhető, illetve a francia partnerek szekvenálási adataiból nyert szarvasmarha genomszekvenciákat. Ennek eredményeként több mint

6 millió SNP-t azonosítottak a szarvasmarha genomban. (A publikus adatbázisokban (dbSNP) ma kb. 22 millió szarvasmarha SNP-t találhatunk.) Ezen belül megközelítőleg 2800 szabályozó polimorfizmust fedeztek fel. Azt állapították meg, hogy ezek többsége a transzkripciós starthelyek közelében helyezkedik el. Egy másik érdekes megfigyelésük, hogy sokszor az reguláló SNP-kben megtalálható variációk megtalálhatóak ugyanebben a pozícióban más fajok ortológ szekvenciáiban is. Ez vagy azt jelenti, hogy más fajokban is SNP van ugyanebben a pozícióban, vagy azt hogy a különböző fajoknál különböző allélok fixálódtak.

A kiszűrt szabályozó polimorfizmusokat a francia csoportok vizsgálták tovább, melynek során elvégezték SNP-k genotipizálását 5 különböző francia szarvasmarha fajta egyedeinek felhasználásával (kb. 480 egyed). Ezután rSNP genotípus-fenotípus asszociációs vizsgálatokat, illetve genotípus-génexpresszió korrelációs teszteket végeztek. Ezek alapján kiválogatták azokat a szabályozó polimorfizmusokat, melyeknek feltételezhetően valamilyen hatása van a hozzájuk kapcsolódó gének expressziójára. Az így kiszűrt gének reguláló polimorfizmusainak szabályozását tovább vizsgálták *in vitro* sejttenyészetekben. Az SNP-ket tartalmazó promótereket vektor plazmidba építették egy markergén (GFP) elé. A plazmid konstrukció ezen kívül még egy viszonyítási alapként szolgáló CNV promóterrel meghajtott dsRed jelzőfehérje gént is tartalmazott. Azokat a plazmidokat, amelyek esetében a sejtekben megfigyeltek GFP expressziós különbségeket, (13 gén két különböző polimorfizmusa esetén találtak különbséget a génexpresszióban) csoportunk tovább vizsgálta *in vivo* körülmények között egérben. A 13 pár SNP-ből csak az érdekesnek tűnő polimorfizmus párokat kaptuk meg, melyekről *in vivo* körülmények között is kívántuk bizonyítani, hogy ténylegesen hatással vannak a fehérjék keletkezésére.

Irodalmi áttekintés

Az egyik vizsgált szabályozó polimorfizmus, amiről feltételezték, hogy ténylegesen hatással lehet a fehérjetermelésre, az egyik kalcipresszin gén promóterében található. Az kalcipresszin fehérjecsalád tagjai képesek megkötni és gátolni a calcineurint, ezáltal befolyásolni egy olyan transzkripciós faktor (NFAT) magi áthelyeződését, ami a kalcineurinhoz kapcsolt gének kifejeződésében játszik szerepet. Ilyen kalcineurin szignál által befolyásolt folyamatok: T-sejt aktiváció, szinaptikus plaszticitás, neuronok apoptózisa és fejlődése, hipertrófia, génszabályozás a váz és szívizomban (*Rothermel és mtsai*, 2003).

Az általunk vizsgált kalcipresszint Miyazaki és munkatársai mutatták ki 1996-ban humán bőr fibroblaszt sejtekből (mint thiroid hormon által indukált transzkriptumot) (*Miyazaki és mtsai*, 1996). A génről 2 splicing variáns íródik át, melyek közül az egyik jelentős mértékben az agyban expresszálódik, míg másikról kimutatták, hogy az központi idegrendszeren kívül a szív-, vázizomban is kifejeződik .

Fontos szerepe van az életkor és diéta indukált elhízásban, egy leptin útvonaltól független mechanizmusként működik a hipotalamuszban. A táplálék bevitelt és a testsúlyt kontrollálja, ezáltal szabályozza az energia egyensúlyt (*Sun és mtsai*, 2011). Megállapítható a szarvasmarháknál gazdaságilag fontos tulajdonság befolyásolásáért felelős génben is kimutatható egy feltételezett SNP hatás.

Anyag és módszer

Laboratóriumunkban a francia csoporttól kapott plazmid konstrukciókat alkalmaztuk transzgénikus egerek előállításához, melyek felépítése az *1. ábrán* látható.

Egysejtes FVB/n egér embriók előmagjába injektáltuk a linearizált plazmid DNS-eket, majd a mikroinjektálást túlélő embriókat álvemhes nőstények petevezetőjébe ültettük vissza még egysejtes állapotban.

***1. ábra*. A beültetett plazmid konstrukció térképe**

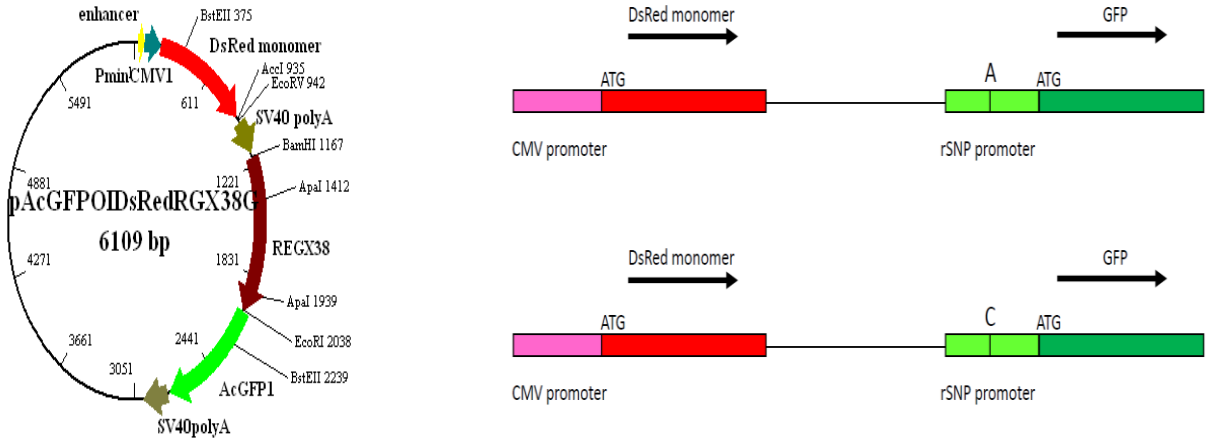


Figure 1. The map of the transfected plasmid contsruction

A megszülető utódok közül PCR segítségével válogattuk ki a transzgénikus egyedeket, majd a GFP expressziót mRNS szinten kvantitatív PCR alkalmazásával detektáltuk és hasonlítottuk össze a két SNP-t tartalmazó egér vonal között.

A rendszer beállításához egy olyan gén szabályozó régióját választottuk, amiről már irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy az itt található polimorfizmusok hatással vannak a génexpresszióra. Ez a prion protein (PrnP) gén volt (*Nakamura és mtsai*, 2007). Sikerült elsőként bebizonyítanunk, hogy tényleg van különbség két szabályozó polimorfizmus génkifejeződésre gyakorolt hatásában *in vivo* körülmények között.

Így megkezdhettük a kísérleteket a számunkra fontos gének reguláló SNP-it tartalmazó vektorokkal. Az *1. táblázatban* találhatók azok a gének, melyeknek promóterének szabályozását vizsgáltuk a GFP expresszión keresztül egérben:

***1. táblázat*. Projekt kódok és a hozzá tartozó fehérjék típusai, melyek expresszióját szabályozó polimorfizmusait vizsgáltuk egér modellben**

Regulomix kód [8]	**Fehérje típus [9]**
Rgx 8	Efrin receptor[1]
Rgx 29	Mikrotubulushoz kapcsolt protein[2]
Rgx 30	Kalcipresszin[3]
Rgx 33	Kopin[4]
Rgx 38	Lizoszómához kapcsolt transzmembrán fehérje[5]
Rgx 42	Tenascin[6]
PRNP	Prion fehérje[7]

Table 1. Project codes and the studied rSNP-s affected different types of proteins in transgenic mice.
[1]Ephrin receptor, [2]Microtubulus associated protein, [3]Calcipressin, [4]Copine, [5]Lysosome-associated protein transmembrane **,** [6] Tenascin, [7] Prion protein, [8] Code in regulomix project, [9]Type of proteins

Eredmények

Az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján eddig 10 transzgénikus egérvonalat sikerült létrehoznunk, melyek a fent látható gének promótereit tartalmazták. Az *2. táblázat* az egerekkel kapcsolatos munkák eredményeit szemlélteti.

***2. táblázat*. Az egér transzgenezis eredményei**

Gének [1]	**Kimosott embriók száma [2]**	**Injektált/beültetett embriók száma [3]**	**Megszületett utódok száma [4]**	**Transzgénikus utódok száma [5]**
PRNP	621	436	174 (39,9%)	7 (4%)
RCAN2	328	277	84 (30,3%)	4 (4,7%)
TNR	297	236	59 (25%)	6 (10%)
MAPRE2	184	127	21 (16%)	0
EPHA4	347	287	75 (26%)	9 (12%)
CPNE6	722	327	25 (12%)	0
LAPTM4A	241	210	43 (20%)	4 (9%)
Összesen:	*2740*	*1900*	*481 (25%)*	*30 (6,2%)*

Talbe 2. The results of mouse transgenesis
[1] Genes, [2]Number of embryos, [3]Number of injected/transfected embryos, [4]Number of borned, embryos, [5]Number of transgenic offspring

A legtöbb plazmid mikroinjektálásával sikerült létrehozni alapító egyedeket, amelyekből vonalat tudtunk előállítani. A transzgénikus utódok egy részét feldolgoztuk, és a belőlük nyert RNS mintákat qPCR segítségével hasonlítottuk össze. A legnagyobb eltérést az kalcipresszin gén esetében találtuk, ahol egyrészt sikerült kimutatnunk májban és lépben is a GFP kifejeződést. Ezekben az esetekben is jelentős (kb. 8-szoros) expressziós különbségeket tudtunk detektálni (*2. ábra*). Tehát ezzel alátámasztottuk *in vivo* körülmények között a sejttenyészetekben tapasztalt expressziós különbségeket az rgx 30 esetében.

***2. ábra*: Kalcipresszin promóter által meghajtott GFP expresszió különbség májban**

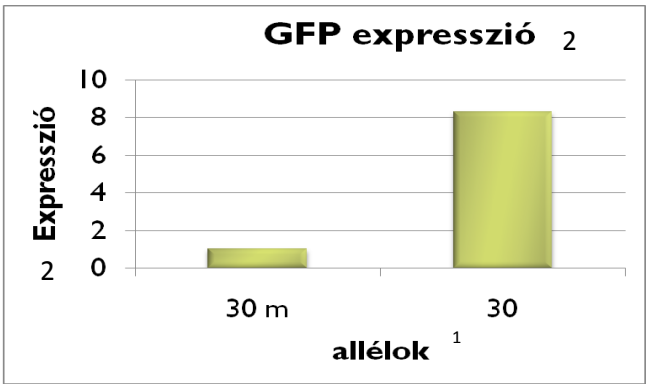


Figure 2: GFP expression's difference in liver. The GFP promoter contains the examined calcipressin SNP-s.

(1): allele (2): expression

Összefoglalás

A kalcipresszin promótere által szabályozott génexpressziót sikerült kimutatnunk máj és lép szövetekben is, emellett bebizonyítottuk egér modellben, hogy jelentős különbség van a különböző SNP-ket tartalmazó szarvasmarha kalcipresszin promóter régiók szabályozása között.

Bizonyítottuk, hogy az általunk kifejlesztett módszer alkalmas a szarvasmarha gazdaságilag fontos génjeinek kifejeződését befolyásoló szabályozó elemek azonosítására.

A projekt eredményei alapján beláthatjuk, hogy érdemes ezen módszerekkel (*in silico, in vitro, in vivo*) új markereket keresni a szarvasmarha-tenyésztésben. A rendszer további vizsgálatok alapjául szolgálhat, hiszen olyan genotípus-fenotípus kapcsolatokra világított rá, amiket eddig nem is feltételeztünk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a francia csoportoknak a rengeteg munkáért és energiáért, ami a projekt kivitelezéséhez elengedhetetlen volt. Szeretném megköszönni főnökeimnek, Dr. Bősze Zsuzsannának és Dr. Hiripi Lászlónak, hogy lehetővé tették, hogy részt vehessek a transzgénikus egerekkel történő munkákban, illetve szeretném megköszönni az anyagi támogatást a *Regulomix OMFV- 00312, 0013/2010* kutatási pályázatnak.

Irodalomjegyzék

Miyazaki T, Kanou Y, Murata Y, Ohmori S., Niwa T., Maeda K., Yamamura H., Seo H. (1996): Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fi-broblasts. J Biol Chem, 271.14567–14571

Nakamura I., Xue G., Sakudo A., Saeki K., Matsumoto Y., Ikuta K., Onodera T. (2007): Novel single nucleotide polymorphisms in the specific protein 1 binding site of the bovine PRNP promoter in Japanese Black cattle: impairment of its promoter activity. Intervirology, 50. 3. 190-196

Rothermel B.A., Vega R.B., Williams R.S. (2003): The Role of Modulatory Calcineurin-Interacting Proteinsin Calcineurin Signaling. TCM, 13.1. 15-21

Sun X-Y., Hayashi Y., Xu S., KanouY., Tang Y-p., Murata Y. (2011): Inactivation of the Rcan2 Gene in Mice Ameliorates the Age- and Diet-Induced Obesity by Causing a Reduction in Food Intake. PLoS ONE, 6. 1. e14605

T-2 MIKOTOXIN HATÁSA A MITOKONDRIUMOKRA ÉS AZ APOPTOTIKUS FOLYAMATOKRA EGÉREMBRIÓKBAN

Somoskői Bence[1], Keresztes Zsuzsanna[1], Kovács Melinda[2], Cseh Sándor[1]

[1] Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék, 1078 Bp. István u. 2.
[2] Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar, Élettani és Állathigiéniai Tanszék, 7600 Kaposvár Guba Sándor. u. 40.
somoskoibence@gmail.com

Összefoglalás

A T-2 a trichotecénvázas vegyületek családjába tartozó mikotoxin, amelyet főként a mérsékelt égövön igen gyakorinak számító *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák termelnek. A toxin káros hatásai között megemlíthetõ az apoptózis indukálás, a fehérjeszintézis gátlása, az immunszuppresszió, valamint a szaporodásbiológiai zavarok. Embriófejlődésre gyakorolt hatása ezidáig azonban kevéssé ismert. Vizsgálataink célja a toxin egérembriók *in vitro* fejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. A kísérletek során vizsgáltuk a mitokondriumok aktivitását és mintázatát, valamint a toxin apoptózist indukáló hatását. A kísérletben felhasznált embriókat szuperovulált BDF1 egerekből nyertük, és speciális táptalajon tenyésztettük. A zigóták fejlődését 5 napon keresztül, az expandált blasztociszta stádium eléréséig kísértük figyelemmel.
Vizsgálataink során 4 csoportot alakítottunk ki, attól függően, hogy a tápfolyadék milyen koncentrációban tartalmazta a T-2 toxint (0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml; 1 ng/ml és kontroll). A kontroll csoport embrióit toxint nem tartalmazó médiumban tenyésztettük.
Eredményeink azt mutatják, hogy a 0,5 ng/ml toxinkoncentráció nem befolyásolja az embriófejlődést, a zigóták a kontroll csoportnak megfelelő arányban (>80%) érik el az expandált blasztociszta stádiumot. Kismértékű, nem szignifikáns csökkenés figyelhető meg a 0,75 ng/ml csoport esetén. Az 1 ng/ml csoportban a zigóták jelentős része 2 sejtes állapotban megreked, az expandált blasztociszta stádiumot nem érik el.
A fejlődésben megrekedt embriók blasztomereiben a normál heterogén mitokondrium mintázat helyett homogén, diffúz eloszlást figyeltünk meg. Az 1 ng/ml toxinnal kezelt embriókban kaszpáz-3 felszabadulást detektáltunk.
Eredményeink alapján elmondható, hogy a T-2 mikotoxin károsíthatja a preimplantációs embriók fejlődését, gátolja a mitokondriumok megfelelő elrendeződését a sejteken belül, a kaszpáz útvonalon keresztül pedig apoptózist indukál.
Kulcsszavak: mikotoxinok, embrió, mitokondrium, apoptózis

Effects of T-2 mycotoxin on mitochondria and apoptotic pathway in mouse embryos

Abstract

T-2 is a member of the group of trichotecenes produced mainly by moulds of *Fusarium* genus. Among a lot of negative effects, T-2 can induce apoptosis, inhibits protein synthesis, has an immunosuppressive effect and may cause reproductive disorders. There are no data available

about the effect on early embryo development. The aim of the study was to assess the effect of the toxin on early embryo development until the blastocyst stage *in vitro*. We studied the effect of toxin on the activity and pattern of mitochondria and the apoptotic induction. Embryos obtained from superovulated BDF1 mice and cultured in special media for 5 days until the expanded blastocyst stage.
Four group were created depend on the concentration of the toxin in culture medium (0.5 ng/ml; 0.75 ng/ml; 1 ng/ml and control). Embryos in control group were cultured with no toxin.
Our results show that the concentration of 0.5 ng/ml does not affect the embryo development. The zygotes developed to expanded blastocyst stage in the proportion of minimum 80%. We observed a small-scale but non-signifant decrease in 0.75 ng/ml group. In the 1 ng/ml group much of the zygotes stop in the 2-cell stage and none of them develop to blastocyst stage.
Unlike the normal heterogen pattern of mitochondria we observed homogen (diffuse) in blastomeres of disrupted embryos. We detected caspase-3 release in embyos of 1 ng/ml group.
Our studies show that T-2 can disturb preimplantation embryo development, inibit the normal arrangement of mitochondria and can induce apoptosis via the caspase pathway.
Keywords: mycotoxins, embryo, mitochondrium, apoptosis

Irodalmi áttekintés

A T-2 a trichotecénvázas vegyületek családjába tartozó mikotoxin, amelyet fõként a *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák termelnek. Ezek a fajok mind a szántóföldi termelés, mind pedig a tárolás során szennyezhetik a gabonát (*Glenn, 2007*), toxinjaik többsége pedig ellenáll a hagyományos élelmiszer- és takarmány-előállítási folyamatok során alkalmazott kezeléseknek, így azok jelenléte kimutatható nemcsak állati takarmányokban, hanem alapvetõ emberi élelmiszerekben is (*Scott, 1984*).

A toxin sejtműködést károsító hatását számos kísérletben vizsgálták. Az egyik legrégebben ismert T-2 okozta jelenség a lipidperoxidáció fokozása, ezzel együtt a szabadgyökképződés indukálása (*Iwahashi, 1982*). A trichotecének zsíroldékony vegyületek, így könnyedén bejutnak a sejtekbe, ahol a peptidil-transzferázhoz kötődnek, ezáltal gátolják a fehérje-, közvetve pedig a DNS- és az RNS-szintézist (*Thomson és Wannemacher, 1990*). A T-2 toxin által okozott oxidatív károsodások (oxidatív stressz) a sejtekben apoptózist indukálhatnak (*Bouaziz et al, 2009*). Wu és mtsai a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének fokozódását figyelték meg granulosasejtekben T-2 hatására (*Wu et al, 2011*). Patkányokban megfigyelték az apoptózishoz kapcsolt gének expressziójának növekedését különböző szövetekben, T-2 toxinnal szennyezett takarmány etetését követõen (*Doi et al, 2006*). A vegyület immunszuppresszív hatását in vitro és in vivo körülmények között is kimutatták (*Gutleb et al, 2002*).

A T-2 mikotoxin mind a női, mind pedig a hím nemi működést megzavarhatja, károsíthatja. Ezek a hatások többek között a késleltetett ovuláció és a csökkent progeszteronszint (*Huszenicza et al, 2000*), sárgatestérési zavarok (*Ványi et al, 1995*), a granulosasejtek proliferációjának gátlása (*Caloni et al, 2009*) és romló spermaminőség formájában jelentkezhetnek (*Kovács et al, 2011*). Wu és mtsai kísérletei alapján elmondható, hogy a toxin a granulosasejtekben indukált apoptózishatás révén képes negatívan befolyásolni a petefészek működését állatokban és emberben egyaránt (*Wu et al, 2011*).

A vegyület foetotoxikus hatását illetően is számos adat áll rendelkezésünkre. A T-2 toxin képes áthatolni a placentán (*Lafarge-Frayssinet et al, 1990*), így a fejlõdõ magzatot károsíthatja. Vemhes egerek szennyezett takarmánnyal történõ etetését követően a thymus sorvadását észlelték

a magzatokban (*Holladay et al, 1993*). A toxin apoptózist indukáló hatását kimutatták a magzati idegrendszer fejlődésében is (*Ishigami et al, 1999*). A csontrendszer abnormális fejlődését, a csontosodás részleges hiányát, valamint egyes csontok hiányát is megfigyelték (*Nelson et al,1994).* Patkányokban a vér–agy gát roncsolódását és magzati agyi léziók keletkezését tapasztalták (*Sehata et al, 2004*).

A T-2 toxinnal kapcsolatos több évtizedes kutatások eredményeként széles körű ismeretanyaggal rendelkezünk a mikotoxin sejtszinten és a teljes szervezet vonatkozásában kifejtett káros hatásait illetően. Ennek keveset tudunk a toxinnak a korai embrionális fejlődésre gyakorolt hatásáról. Vizsgálataink célja, hogy adatokat gyűjtsünk a T-2 toxinnak a preimplantációs egérembriók in vitro fejlődésére és a mitokondriumok aktivitására, a blastomereken belüli eloszlására, valamint a reaktív oxigéngyökök sejten belüli mennyiségére gyakorolt hatásáról.

Anyag és módszer

A 6 hetes, BDF1 törzsből származó egereket, 21 °C-on, 12h/12h világítási program mellett tartottuk. A nőstény egereken szuperovulációt végeztünk [1. nap: 7,5 NE PMSG ip., 3. nap: 7,5 NE hCG ip., (Alvetra und Werfft AG; Ausztria)], ezt követõen pedig egy éjszakára hím egyedeknél helyeztük el. A zigótákat 20 órával a HCG-kezelést követően nyertük ki. A hialuronsavval megtisztított és tenyésztésre alkalmasnak ítélt embriókat ezt követően tenyésztőmédiumban (Cleavage Stage Medium, Cook Medical; Roskilde, Dánia) helyeztük el, amelyhez különböző koncentrációban T-2 toxint adagoltunk. Az így kialakított csoportok a következők voltak: 0,5 ng/ml; 0,75 ng/ml; 1 ng/ml és kontroll. Az embriók fejlődését 5 napon keresztül követtük.

A toxikológiai vizsgálatok során 4 ismétlést végeztünk, minden ismétlés alkalmával csoportonként 4-4 állat embrióival dolgoztunk.

A mitokondriumok elhelyezkedését MitoTracker CMTM Ros (Molecular Probes; USA) fluoreszcens festékkel ellenőriztük. A caspase-3 jelölésre Biotium NucView488 Caspase-3 Assay Kit-t (USA) használtunk. A jelölt organellumokat és enzimeket konfokális lézer scanning mikroszkóppal (C1/TE2000-U Nikon) detektáltuk. A nyers adatokat az Image J (NIH; USA) szoftverrel dolgoztuk fel.

A fejlődési adatok statisztikai kiértékelését R 2.15.2-ben ANOVA-val végeztük.

Eredmények és értékelés

Az 5 napos in vitro tenyésztést követően a blasztociszták aránya a következőképpen alakult (*1. táblázat*):

A tenyésztési eredményeket grafikusan ábrázolva az alábbi tendencia figyelhető meg (*1. ábra*)

Az ANOVA analízist követően a következő eredményeket kaptuk: p = 8.39e-06. A páronkénti összehasonlítás (Tukey-teszt) eredményeit a *2. táblázat* tartalmazza:

Az 1 ng/ml toxintartalmú csoportban megfigyelhető volt, hogy a zigóták legnagyobb hányada a kétsejtes állapotban megreked, fejlődésük 24 órát követően leáll. A 0,75 ng/ml-es csoportban a kontrolltól kismértékű, de nem szignifikáns eltérés mutatkozik a blasztociszták számát illetően.

***1. táblázat*. Blasztociszták aránya az egyes csoportokban 4 ismétlést követõen**

Blasztociszta arány (%) (1)	Kezelés (ng/ml) (2)
87,50	kontroll
84,37	kontroll
80,00	kontroll
91,67	kontroll
100,00	0.5
94,73	0.5
90,32	0.5
90,91	0.5
89,47	0.75
89,39	0.75
73,68	0.75
28,57	0.75
0,00	1.0
0,00	1.0
0,00	1.0
14,29	1.0

Table 1: Proportion of blastocysts in each toxin-contaminated and control group after 4 repeats
(1): rate (2): treatment

***1. ábra.* Blasztociszták aránya az egyes kezelési csoportokban (prop.Blast=blasztociszta %-os aránya)**

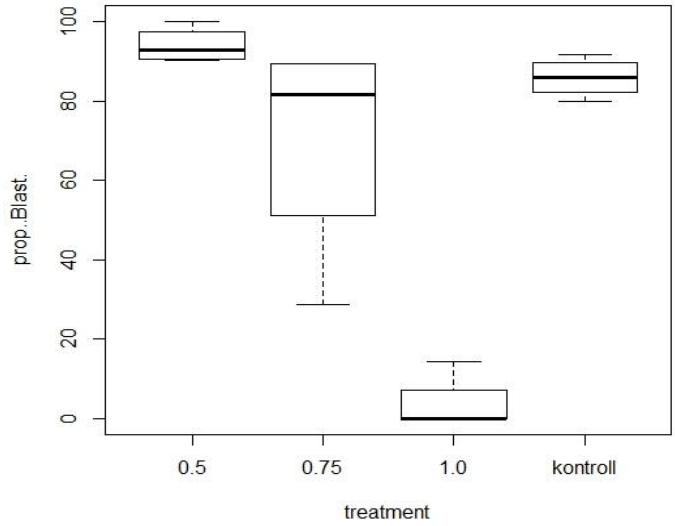


Figure 1: Proportion of blastocysts in each treatment group (prop.Blast=% of blastocysts)

2. táblázat. **Kezelési csoportok páronkénti összehasonlítása**

Párosítás	p-érték
0.75 - 0.5	0.176
1.0 - 0.5	<0.001 ***
kontroll - 0.5	0.873
1.0 - 0.75	<0.001 ***
kontroll - 0.75	0.493
kontroll - 1.0	<0.001 ***

Table 2: Pairwise comparison of treatment groups

Az 5 napos tenyésztés után megvizsgáltuk a mitokondriumiok elhelyezkedését a sejteken belül. A 2 sejtes állapotban megrekedt embriók mitokondrium mintázatát hasonlítottuk össze a kontroll csoport embrióival. A kontroll embriók blasztoméráiban a mitokondriumok perinukleáris és perikortikális elrendeződést mutattak, szemben a kezelt embriókkal, amelyekben a mitokondriumok diffúzan helyezkedtek el a citoplazmában (*2. ábra*).

2. ábra: **Mitokondriumok eloszlása a kontroll (felső kép) és a kezelt embriókban (alsó kép)**

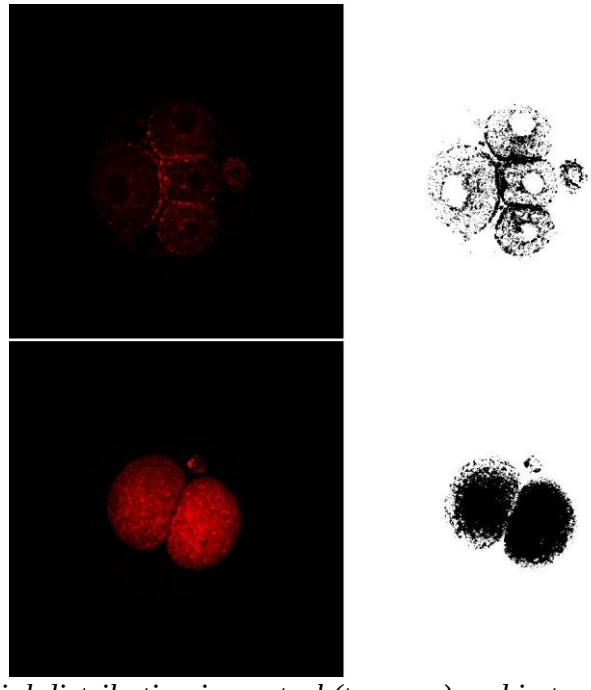


Figure 2: Mitochondrial distribution in control (top row) and in treated embryos (bottom row)

Az 1 ng/ml toxintartalmú csoport 2-sejtesen megrekedt zigótáiban kaszpáz-3 felszabadulást detektáltunk, ami azt mutatja, hogy a T-2 toxin képes apoptózist indukálni a feljődő zigóták sejtjeiben.

Következtetések és javaslatok

Adataink azt mutatják, hogy a toxin erős negatív hatást gyakorol a korai embrionális fejlődésre, amely akár az embrió korai elhalásához, rejtett – még a beágyazódás előtt bekövetkezõ – embriófelszívódáshoz vezethet. Vizsgálataink tapasztalatai azt jelzik, hogy azoknál a csoportoknál, amelyeket kis T-2 toxin koncentrációjú környezetben tenyésztettünk, az embriók többsége elérte a blasztociszta stádiumot, a normál embriófejlődés során pedig a blasztomérákban a mitokondriumok heterogén mintázata figyelhetõ meg. A toxin képes apoptózist indukálni a sejtekben.

További terveink között szerepel a mitokondriális mintázat módosulások okainak és az apoptotikus folyamatok pontosabb feltárása.

Irodalomjegyzék

Bouaziz, C., Martel, C. et al.: Fusarial toxininduced toxicity in cultured cells and in isolated mitochondria involves PTPC-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. Toxicol. Sci., 2009. *110*. 363–375.

Caloni, F., Ranzenigo, G. et al.: Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells. Toxicon, 2009. *54*. 337–344.

Doi, K., Shinozuka, J., Sehata, S.: T-2 toxin and apoptosis. J. Toxicol. Pathol., 2006. *19*. 15–27.

Glenn, A. E.: Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol., 2007. *137*. 213–240.

Gutleb, A. C., Morrison, E., Albertina, J. M.: Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol., 2002. *11*. 309–320.

Holladay, S. D., Blaylock, B. L. et al.: Fetal thymic atrophy after exposure to T-2 toxin: selectivity for lymphoid progenitor cells. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1993. *121*. 8–14.

Huszenicza, Gy., Fekete, S., Szigeti, G., Kulcsár, M., Fébel, H., Kellems, R. O., Nagy, P., Cseh, S., Veresegyházy, T., Hullár, I.: Ovarian consequences of low dose peroral fusarium (T-2) toxin in a ewe and heifer model. Theriogenology, 2000. *53*. 1631–1639.

Ishigami, N., Shinozuka, J. et al.: Apoptosis in the developing mouse embryos from T-2 toxininoculated dams. Histol. Histopathol., 1999. *14*. 729–733.

Iwahashi, M.: Mechanism of cytotoxic effect of T-2 toxin in protozoa. Proc. Assoc. Jpn. Mycotoxin, 1982. *4*. 23–30.

Kovács, M., Tornyos, G., Matics, Z., Kametler, L., Rajli, V., Bodnár Z., Kulcsár, M., Huszenicza, Gy., Keresztes, Zs., Cseh, S.: Subsequent effect of subacute T-2 toxicosis on spermatozoa, seminal plasma and testosterone production in rabbits. Animal, 2011. *5*. 1563–1569.

Lafarge-Frayssinet, C., Chakor, K. et al.: Transplacental transfer of T2 toxin: Pathological effect. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 1990. *10*. 64–68.

Nelson, P. E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J.: Taxonomy, biology and clinical aspects of Fusarium species. Clin. Microbiol. Rev., 1994. *7*. 479–504.

Scott, P. M.: Effects of food processing on mycotoxins. J. Food Prot., 1984. *47*. 489–499.

Sehata, S., Kiyosawa, N. et al.: Morphological and microarray analysis of T-2 toxin-induced rat fetal brain lesion. Food Chem. Toxicol., 2004. *42*. 1727–1736.

Thomson, W. L., Wannemacher, R. W.: In vivo effects of T-2 mycotoxin on synthesis of protein and DNA in rat tissues. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1990. *105*. 483–491.

Ványi A., Glávits R., Molnár T.: F-2 és T-2 toxin okozta reprodukciós zavarok nagyüzemi sertésállományokban. Magy. Állatorv. Lapja, 1995. *50*. 424–430.

Wu, J., Jing, L. et al.: T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. Toxicol. Letters, 2011. *202*. 168–177.

TESTTÖMEG-MENEDZSELÉSI ATTITŰDÖK MAGYARORSZÁGON

Soós Mihály[1,2], Szakály Zoltán[1,2]

[1]Debreceni Egyetem, AGTC-GVK, Marketing és Kereskedelem Intézet
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
[2]Kaposvári Egyetem, Gazdaságtudományi Kar, Marketing és Kereskedelem Tanszék
7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.
misi.soos@gmail.com

Összefoglalás

A magyar államháztartás kiadásai a túlsúly és az elhízás okozta megbetegedések miatt keletkezett csaknem elérték az 1900 Milliárd Forintot 2012 évben, emellett a háztartások a jellemzően a szénhidrátban és cukrokban gazdag élelmiszerek vásárlása során 2012 év első felében 1330 Milliárd Forintot költöttek élelmiszerre. A kutatás célja a hazai lakosság testtömeg-menedzselésével kapcsolatos attitűdjeinek vizsgálata volt, kiemelt tekintettel az egyén testtömeggel kapcsolatos megítélésére, ami meghatározó az élelmiszer-fogyasztási szokások alakításában. A kutatás során egy 1000 fős országosan reprezentatív kérdőíves megkérdezést hajtottak végre a szerzők, majd a kérdőív eredményei által kialakított csoportokon belül (fogyni vágyók, hízni vágyók és testtömegükkel elégedettek) a kvalitatív kutatási módszerek közül a fókuszcsoportos megkérdezéseket végeztek el, amik megkezdése előtt rögzítésre kerültek a válaszadók testmagasság, testtömeg, életkor és haskörfogat adatai, majd egy Omron Body Fat Monitor készülékkel kalkulált BMI (testtömeg index) és testzsírszázalék értékeik is. Az eredményekből kiderül, hogy fontosnak tartják testtömegük alakulását a válaszadók, viszont tíz magyarból csupán minden negyedik elégedett saját testtömegével. Legnagyobb arányban önmaguknak akarnak megfelelni a válaszadók. A testtömeg változtatás alapvető okai között az egészség szerepel, mint meghatározó tényező.
A kutatás az Európai Unio és Magyarország támogatásával, az Europai Szociális alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú, „Nemzeti Kiválóság Program-Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program“ című kiemelt projekt keretei között valósult meg“.
Kulcsszavak: élelmiszer-fogysztási szokások, testtömeg, attitűd

Attitudes related to Body Weight Management in Hungary

Abstract

The expenditure of the Hungarian government on illnesses caused by overweight and obesity was just about 1900 billion HUF in 2012, while the households' spending on food rich in carbohydrates and sugar was 1330 billion HUF during the first half of 2012. The aim of the study was to examine the attitudes related to body weight management in Hungary, with special regard to the individual's judgement of body weight, which can be decisive in developing food consumption behaviour. A nation-wide representative questionnaire with 1000 person was carried out; based on the results, different groups were formed and they were examined by the method of

focus group interview. Before it started, the height, weight, age and waist circumference of the group members were recorded, then with the aid of an Omron Body Fat Monitor their BMI (Body Mass Index) and body fat ratio were also calculated. With the analysis of the questionnaire and the three focus group interview, the researchers established (besides the food buying and consumption habits) the amount of money spent on food and the attitudes, preferences and habits toward self-image, lifestyle and physical activity. Results show that body weight is considered to be of high importance among the respondents, however every fourth out of 10 Hungarian is satified with his or her self-image. The highest proportion of respondents intend to comply themselves. Weight change was driven by health as a primary factor.
Keywords: food consumption behaviour, body weight, attitude

VÖRÖSÁRU /PÁRIZSI/ OBJEKTÍV ÉS SZUBJEKTÍV HÚSMINŐSÉG VIZSGÁLATA

Szabó Rubina Tünde[1], Kovács Alfréd[1], Kokavecz Gábor[1], Heincinger Mónika[1], Horvainé Szabó Mária[1], Ábrahám Csaba[2], Mézes Miklós[1], Weber Mária[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.
[2]Food Analytica Kft. 5711 Gyula, Dancza u. 13.
Szabo.Rubina.Tunde@hallgató.szie.hu

Összefoglalás

Napjainkban a minőség és élelmiszerbiztonság nagyon fontos kérdés, számos vizsgálódást kíván. Hazánkban nagy hagyománnyal rendelkezik a párizsi és rengeteg fajtája ismert. Így aktuális és szükséges a fogyasztói szokásoknak mind objektív, mind szubjektív vizsgálata az általunk alkalmazott összetett minőségi rendszerben. Egy új termék bevezetését vagy termékfejlesztést piackutatásnak kell megelőznie, melyben föltérképezik a megcélzott fogyasztók igényeit. A fogyasztók által elfogadott termékek jellemzőit viszont már lehet műszeresen vizsgálni, ami támpontot nyújthat, hogy megtaláljuk az összefüggést a műszeres mérési eredmények és a szubjektív megítélés között. A fogyasztók megkérdezésével történt kérdőíves felméréssel célunk volt megvizsgálni, hogy az általános fogyasztói szokások mennyiben érvényesülnek a párizsi fogyasztása során. Ezen kérdőív kitöltését 5 év elteltével megismételtük, hogy az esetleges fogyasztói szokások és vásárlási trendek változása feltérképezhető legyen. A párizsi organoleptikus vizsgálatával – az erre irányuló kérdőívvel – célunk volt megvizsgálni, hogy a szubjektív – az emberi érzékszervek „pontatlanságát" is magában foglaló vizsgálattal, mely terméket sorolják a megkérdezettek a kiemelt első helyekre. A laboratóriumi mérésekkel célunk volt a párizsi egyes tulajdonságait objektív, műszeres módszerekkel mérni, amelyek szubjektív elemekkel nem terheltek és minden esetben összehasonlíthatóak a standardizált mérési elemek. Végül összehasonlítottuk a szubjektív és objektív mérések eredményeit. Eredményként levonható az a következtetés, hogy a műszeres és érzékszervi vizsgálatok eredményei nem függenek össze az érzékszervi vizsgálatok szubjektivitása miatt, a fejlesztési célt figyelembe véve alkalmazható egyik vagy másik, azonban ezen termék esetében nem fedezhető fel párhuzam a két metodika között.
Kulcsszavak: vörösáru, élelmiszerbiztonság, húsminőség

Objective and subjective meat quality analysis of pre-cooked meat products („parisian" sausage)

Abstract

Food quality and safety are current issues nowadays, requiring a plenty of study. A pre-cooked meat product called Parisian is a kind of traditional sausage in Hungary, having many varieties. Therefore studying customers' habits both objectively and subjectively in a complex qualifying system is up-to-date and useful.

Developing a new product or introducing it into marketing must be preceded by a market research, surveying the need of the customers. Traits of the products already approved by the customers can be analyzed in the laboratories, giving us pinpoints in finding correlations between laboratory measures and subjective qualification.
Our aim with the questionnaire survey among customers was to analyze how general customer habits occur in consuming Parisian. The questionnaire was sent twice, second occasion 5 years later than the first, for being able to map changes – if there are such – customers' habit and in purchasing trends.
The goal of the organoleptic study of the Parisian – and the questionnaire based on it – was to investigate which products are the most favoured, ranked in the top places based on the human senses, taking their inaccurateness into consideration as well.
With the laboratory measures the aim was to define objectively, with devices the certain traits of the Parisian, when the standard measuring units are always comparable. At last, we compared the results of the sensory and laboratory methods.
As a result we can conclude, that laboratory and sensory results can not be linked to each other, so based on the aim of the product developing can be used one or he other, but there's no parallelism between the two methods in case of this meat product.
Keywords: pre-cooked meat, food safety, meat quality

Bevezetés

A különböző gazdasági haszonállatok húsának beltartalmi értékei különböznek egymástól. Jelentős különbséget tapasztalhatunk a hús összetételében, melyet főként az állatok kora, neme, fajtája és az elfogyasztott táplálék minősége befolyásol számos egyéb tényező mellett.

Az elfogyasztott élelmiszerrel szemben alapvető követelmény, hogy „megfelelő arányban" tartalmazza az életműködéshez szükséges tápanyagokat. További fontos elvárás az is, hogy az étel elfogyasztása, az étkezés megfelelő élvezetet nyújtson a fogyasztó számára. Lényeges szempont az élelmiszer megjelenése, a csomagolása. Mindezeknek az elvárásoknak úgy kell eleget tenni, hogy a vonatkozó jogszabályi előírásoknak az élelmiszer gyártója mindenben megfeleljen (*Laczay*, 2008). A megszűnő családi kisgazdaságok, hatásaként jelentkezik, hogy napjainkban jelentősen megnövekedett a multinacionális cégek által előállított töltelékes hústermékek iránti kereslet. Nem elhanyagolható szempont a gazdaságosság, melyet az adalékanyagok és a technológia kulcsfontosságú szerepe alakít (*Incze*, 2000). A párizsi igen jelentős szerepet kap az alacsony előállítási és értékesítési költségei miatt, melynek fő okai a húskészítmények összetevőire vezethetők vissza (szójafehérje, húspép, bőrke tartalom), illetve a fogyasztók nagymértékben korlátozott anyagi helyzetére. A párizsi legalább 55 mm átmérőjű, természetes, vagy műbélbe töltött húspépet tartalmazó, főzéssel hőkezelt, füstölt, (vízgőzzáró műbélbe töltött termék esetén) füstöletlen vagy füstízesítésű homogén metszéslapú, jól szeletelhető készítmény. A hústartalom a késztermékre vonatkoztatva legalább 40%. Fehérjetartalma legalább 10,0%(m/m), víztartalom legfeljebb 71,0%(m/m), zsírtartalom legfeljebb 23,0%(m/m), nátrium-klorid-tartalom legfeljebb 2,5%(m/m).

Mindemellett a diétás étrendbe kiválóan beilleszthető magas víztartalma és alacsony kalóriatartalma miatt. (www.kaloria.extra.hu) Mindent egybevetve a termelő és a fogyasztó számára a minőség voltaképpen a nyersanyagoknak és a gyártott élelmiszereknek az a tulajdonsága, hogy teljes belső értékűek legyenek és megfeleljenek a vásárló által támasztott kívánalmaknak. Célja elsősorban az, hogy az ipar és a kereskedelem a fogyasztók mindenkori

igényeinek megfelelő termékeket juttasson a belföldi és külföldi piacokra. A minőség elemi építőkövei vagy meghatározói: a minőségjellemzők. Minőségjellemző lehet minden fizikai, kémiai, technológiai, mikrobiológiai, érzékszervi tulajdonság, méret, csomagolás stb., amellyel a termék jellege leírható.

Anyag és módszer

Kérdőív

A fogyasztók a párizsi fogyasztásával kapcsolatos szokásukat zárt, illetve nyílt kérdést, Likert-típusú skálát tartalmazó önkitöltéses egyéni, írásos kikérdezéssel – kérdőíves felméréssel – mértük fel.

2009-ben 54 fő töltötte ki a kérdőívet, öt évvel később – 2013-ban – a felmérés megismétlésekor 90 fő.

Az organoleptikus vizsgálat során a párizsi mintákat sorszám szerint helyeztük el tányérokra, melyeket a vizsgáló bizottságnak szintén kérdőív segítségével kellett értékelni. A vizsgálatot 7 fő végezte el.

Organoleptikus vizsgálat

Összbenyomás és szín szerint értékeltek először, ahol a besorolás 1-11.helyezés között mozgott. Ezt követően íz, homogenitás és állag szerint a jó, megfelelő és rossz kategóriába lehetett besorolni a 11 féle párizsi mintát, melyek márkajelzés nélkül beszámozva voltak vizsgálhatóak.

Laboratóriumi vizsgálat

pH mérés: A párizsik pH-ját a pH-STAR Matthäus® – pH mérővel mértük, mintánként lejegyzés készült róluk.

A hússzín mérése: A párizsi minták színét reflektancia spektrometriás módszerrel, Minolta CR 410 típusú Chromameterrel határoztuk meg a CIE Lab L*a*b* színrendszerben a párizsi friss metszésfelületén. Az L* értéke a hús világosságát adja meg (0=fekete; 99=fehér), az a* értéke a hús pirosságát (+60 irányban piros, -60 irányban zöld), a b* értéke a hús sárgaságát adja meg (+60 irányban sárga, -60 irányban kék).

A hús színének fogyasztói szempontból történő értékeléshez az L*a*b* színrendszerben kapott értékek alapján a ΔE^*_{ab} értéket szükséges meghatározni az alábbiak szerint:

$\Delta E^*_{ab}=\sqrt{(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^{2+}(\Delta b^*)^2}$.

Ennek segítségével összehasonlíthatóvá, illetve vizuális érzékelés szempontjából is értékelhetővé válnak az egyes csoportokban kapott értékek közötti különbségek.

Porhanyósság: A nyíróerő érték (porhanyósság) meghatározásához kb. 5 cm hosszú 1x1 cm négyzet alapú hasábokat vágtunk (próbatestek) párizsi fajtánként. A párizsik nyíróerő értékének meghatározásához TA.XT2 PLUS (Stable Micro System Ltd., USA) készüléket használtunk. A méréseket a készülékhez rögzített 1,2 mm vastagságú Warner-Bratzler pengével végeztük, amely az analízis során 250 mm/perc egyenletes, merőleges mozgással vágta át a próbatestet. Az azonos szeletből származó próbatestek maximális nyíróerő értékeinek átlaga adta a szelet nyíróerő értékét. A TA.XT2 PLUS készülékkel lemért nyíróerő értéket Texture Exponent 32 számítógépes

program segítségével számítottuk ki. Egy termékből származó próbatesten 5 mérést végeztünk, melyeknek ezt követően átlag- és szórás-értékeket, majd megbízhatóságot számoltunk.

A minták

Kereskedelmi forgalomban lévő, 11 db párizsi mintát vizsgáltunk: Alföldi-Hús Zrt.-pulykapárizsi (A), Számoljon Velünk! (B), Suga-Food Kft- baromfipárizsi (C), Gallicoop Zrt.- pulykapárizsi (D), Ságа Foods Zrt.- Midi füstölt pulykapárizsi (E), Toldi- pulykapárizsi (F), Tesco-marhapárizsi (G), Debrecen Hús Zrt.-baromfipárizsi (H), Ságа Foods Zrt.- Falni jó! pulykapárizsi (I), Pick Szeged Zrt.- sertés párizsi (J), Pick Szeged Zrt.- Nosztalgia marhapárizsi (K).

Eredmények

Kérdőív

Az *1. táblázat* a 2009-ben, illetve 2013-ban készült kérdőív 7 szempontját és annak eredményei mutatja.

Azt láthatjuk, hogy az 5 év alatt nem változott jelentősen a húskészítményt vásárlók és fogyasztók köre.

A leggyakrabban vásárolt húskészítmény a kolbász, amit 2009-ben még a szalámi és a harmadik helyen a párizsi követett, míg 2013-ban inkább a virslit, májas, illetve párizsit fogyasztják leggyakrabban a kolbász után.

***1. táblázat*: 2009-es és 2013-as kérdőívek egyes pontjainak összehasonlítása**

Szempont (1) / **év** (2)	**2009**	**2013**
Húskészítményt vásárol és fogyaszt (3)	96%	98%
Leggyakrabban vásárolt húskészítmény (4)	kolbász (5) szalámi (6) párizsi (7)	kolbász (5) virsli (24) kenőmájas (8) párizsi (7)
Párizsi fogyasztása (9)	kéthavonta (30%) (10) hetente (22%) (11)	kéthavonta (20%) (10) hetente (17%) (11), havonta (17%) (12)
Párizsi vásárlás szempontjai (13)	minőség (14) gyártó (15) íz (16)	ár (17) küllem (18) íz (16) minőség (14) gyártó (15)
Párizsi nem az egészséges táplálkozás része (19)	52%	57%
Milyen állatfajból készült párizsit fogyaszt? (20)	baromfi (21) marha (22) sertés (23)	baromfi (21) sertés (23) marha (22)

Table 1.: Compare the questionnaire results

(1) viewpoint (2) year (3) buy and eat meat products (4) the most common meat product (5) sausage (6) salami (7) parisian (8) liverwurst (9) intake of parisian (10) bimestrial (11) weekly (12) monthly (13) sales viewpoint of parisian (14) quality (15) manufacturer (16) taste (17) prize (18) appearance (19) The rate of parisian not a healthy meal (20) Which animal species is the origin of the parisian? (21) poultry (22) cattle (23) pig (24) frankfurter

A párizsi fogyasztásának gyakorisága sem változott kiemelkedő mértékben, viszont arányiban többen fogyasztják a 2013-as évben kitöltött kérdőívek alapján.

A párizsi vásárlási szempontjai kissé átalakultak. Míg 2009-ben markánsan a minőséget, a gyártót és az ízt részesítették előnyben, 2013-ra már az ár és a küllem, mint szempontok is fontosan lettek a fogyasztók számára.

Azok köre, akik szerint a párizsi nem egészséges táplálék, így nem fér bele az egészséges táplálkozásra kissé megnőtt, bár ez sem mondható kimagaslónak.

2009-ben a baromfipárizsi után leggyakrabban marha párizsit fogyasztottak és csak ezután sertéspárizsit. 2013-ban a baromfipárizsi után látható, hogy sertéspárizsit választanak inkább a vásárlók, összehasonlítva a marhapárizsival.

Organoleptikus vizsgálat

A kérdőív kiértékelését követően az összbenyomás szerint a Sága Midi füstölt párizsi állt az első helyen, 3-an tartották a legjobbnak.

A párizsik állagát tekintve az első helyre a Pick sertés párizsiját helyezték, majd a Pick marha és a Gallicoop párizsikat.

Legtöbben a Pick marha párizsiját tartották a legjobb ízűnek, majd ezt a Sága Midi füstölt és a Gallicoop párizsi követi a sorban.

A homogenitás vizsgálat eredményeit tekintve a vélemények arányos megoszlását mutattak, leghomogénnek a Pick marha és sertés, illetve a Számoljon velünk párizsit ítélték.

Laboratóriumi vizsgálat

pH mérés

Az értékek mindegyik esetben savasnak minősülnek, az előírásnak megfelelően. Jelentősen kiugró értéket nem figyelhettünk meg a vizsgált húskészítmények között, ami látszik a *2. táblázatban.*

***2. táblázat*: A pH mérési eredmények**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
pH	6,31	6,58	6,62	6,55	6,31	6,40	6,62	6,53	6,41	6,06	6,33

Table 2.: Results of pH

A hússzín mérése

A legszembetűnőbb, hogy a Pick sertéspárizsi (*1. kép*) a Sága Falni jó! párizsi kivételével mindegyik termékhez képest nagy eltérést mutat, ez tér el legnagyobb mértékben szín tekintetében a többi vizsgált terméktől. A legtöbb esetben minimum $\Delta E^*=1,5$, tehát a termékek között észrevehető a színbeli különbség. Két esetben viszont alig volt észrevehető az eltérés: a Gallicoop pulykapárizsi és a Sága Falni Jó! pulykapárizsi, illetve a Sága Midi füstölt pulykapárizsi és a Pick Nosztalgia marhapárizsi között.

***1. kép*: Pick sertéspárizsi**



Picture 1.: Pig parisian of Pick

Porhanyósság

Legpuhábbnak a Suga baromfipárizsi bizonyult, legkeményebbnek pedig a Tesco- marhapárizsi. A porhanyóssági értékeket az 3. táblázat szemlélteti.

***3. táblázat*: Porhanyósság mérésének eredményei**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Átlag (1)	*0,36*	*0,37*	***0,17***	*0,24*	*0,24*	*0,34*	***0,59***	*0,31*	*0,25*	*0,27*	*0,37*
Szórás (2)	0,03	0,07	0,02	0,02	0,03	0,03	0,12	0,02	0,03	0,05	0,04
Rangsor (3)	4	2	11	10	9	5	1	6	8	7	3

Table 3.: Results of friability

(1) mean (2) scatter (3) ranking

Következtetések

Kiderült felméréseinkből és vizsgálatainkból, hogy a műszeres objektív mérésekből nem következtethetünk arra, hogy az adott termék megfelel-e a fogyasztók elvárásainak, hiszen a szubjektív megítélést felmérő organoleptikus vizsgálat lényegesen eltérő eredményeket produkált ugyanazon időpontban, ugyanazon termékeken végzett műszeres vizsgálatoktól.

Tekintettel arra, hogy a műszeres minőségvizsgálat eredménye és a megkérdezettek választása eltér, kijelenthetjük, hogy a fogyasztók preferenciája nem függ a „valós” minőségtől. A választást a szokások és a megszokás olyannyira befolyásolják, hogy a „valós” minőség eltörpül ezek mögött. Vélhetően a szubjektív érzékszervi bírálat végeredményét az az összhatás adja, amely az egyes alaptulajdonságokból tevődik össze. Továbbá egy-egy alaptulajdonság megítélésekor sem tudjuk „kikapcsolni” úgy a többi érzékszervünket, hogy azok ne befolyásolják a kialakuló eredményt.

A talált különbségek ellenére a Magyar Élelmiszerkönyv előírásainak minden vizsgálatnak alávetett párizsi megfelelt, (mind szín, állag, illat, alak, burkolat, szerkezet szempontjából) eleget téve a vonatkozó minőségirányítási rendszerek követelményeinek.

Tekintettel a párizsik jelentős víztartalmára és növényi eredetű összetevőire, és arra, hogy a Magyar Élelmiszerkönyv kritériumainak mindegyik általunk vizsgált termék megfelelt, fogyasztásukat bátran ajánlhatjuk bárkinek, sőt fogyasztásuk beilleszthető az egészséges életmódot megvalósító táplálkozásba is.

Köszönetnyilvánítás

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat, illetve *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú, *„Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen”* című pályázat támogatta."

Felhasznált irodalom

Incze K. (2000): a HÚS című folyóirat 2000- 1.szám, Szójafehérjék a húsfeldolgozásban, „Alapítvány a Húsipari Kutatásért” Kiadó, 7 p.

Laczay P. (2008) Élelmiszer-higiénia Élelmiszerlánc-biztonság, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 157-208, 353-362 p

http://kaloria.extra.hu/huskeszitmenyek_2.html Letöltés ideje: 2008. 12. 03.

ÚJABB ADATOK A SZÉLES KÁRÁSZ EX SITU ÉS IN SITU VÉDELMÉHEZ

Szakáli János Miklós, Müller Tamás, Demény Ferenc

Szent István Egyetem, Halgazdálkodási Tanszék
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
Szakali.Janos.Miklos@hallgato.szie.hu

Összefoglalás

A magyarországi széles kárász (*Carassius carassius*) állomány az elmúlt egy évszázadban erősen hanyatló tendenciát mutat, melyet elsősorban a megromlott környezeti feltételek indokolnak. 2012-ben a Magyar Haltani Társaság honlapján történő szavazás eredményeképpen a széles kárászt választották az év halának, ráirányítva a közvélemény figyelmét a fajra. A környező országok gyakorlatával ellentétben (pl. Ausztria, Horvátország, Szlovákia, Szerbia, Románia) célunk a védettségi státusz bevezetését megelőzni, ennek érdekében eredeti élőhelyeinek rehabilitációjával és telepítésekkel megerősíteni a hazai állományokat. Célomként a széles kárász indukált szaporítás technológiafejlesztést (alternatív ikrakezelés), ivadék nevelését, majd kitelepítését tűztem ki, valamint egy revitalizált helyen telepített széles kárász állomány megfigyelését.
A ponty indukált szaporítási technológiáját sikeresen alkalmaztam. A termékenyítést és az ikra ragadóság elleni kezelést követően az ikrák inkubálása során az áztatott égertoboz (0,5kg/550l 12 h áztatás) hatásos védelmet nyújtott ikrákat veszélyeztető gombásodás ellen. Fontos, hogy később az oldat a lárvákban sem okozott kárt. A lárvák tartására Óriás-Zugert (200l), majd nevelő kádakat (500l) használtunk, artemia, gyűjtött plankton, tubifex etetéssel. Előnevelés után az ivadékokat a tanszéki fóliás tóba telepítettük ki (10 m^3). A nevelt ivadékok közül a Halbarát Vízprogramnak felajánlottunk és kitelepítettünk 150 széles kárászt (~5cm). A veresegyházi Tavirózsa Környezet-és Természetvédő Egyesület által 2008-ban megkezdett lápi póc fajvédelmi mintaprogram keretében 550 széles kárászt (~1,5-3cm) telepítettem ki revitalizált élőhelyekre. Ezentúl még a saját szaporításból 850 kárászt telepítettünk ki fajmegsegítési célzattal 3 helyre (Isaszeg, Rajka, Szarvas; ~2-6cm). Munkám során szerzett tapasztalataimat szeretném bemutatni előadásom során.
Kulcsszavak: széles kárász, égertoboz, gombásodás

New data for *ex situ* and *in situ* conservation of crucian carp

Abstract

In the past century, the Hungarian population of the crucian carp (Carassius carassius) decreased sharply, which was mainly caused by the degraded environmental conditions. In 2012 the crucian carp had been chosen to be ‘the Fish of the Year’ due to the vote on the website of the Hungarian Ichthyologycal Society. In the neighbouring countries the crucian carp enjoys official protection. We would protect this fish without governmental intervention. We strengthen populations with the rehabilitation of habitats and with settlements. My aims were to develop the

induced breeding technology of the crucian carp (alternative egg treatment), to grow the progenies, settlements and to observe a revitalized habitat.

For the breeding I used the induced breeding technology of the common carp. After the fertilization and the treatment against the stickiness of eggs, we used Alnus glutinosa cones for the egg incubation (0,5kg/550l 12 h soak). This treatment protected the eggs from water fungi. It is important that the treatment did not damage the eggs and larvae. To keep and rear larvae we used big Zuger-glass (200l), later we used tanks (500l). We used Artemia salina nauplius and collected plankton to feed them. After pre-rearing we put the young fish into the pond of the department (10m3).

We gave 150 (~5cm) crucian carps to the Halbarát Víz Program. With the help of the Lápi póc Fajvédelmi Mintaprogram, which was initiated by the Tavirózsa Környezet- és Természetvédő Egyesület in Veresegyház, we settled 550 fish (~1,5-3cm) to revitalized habitats, where I evaluated the survival of the fish.

In addition, from our breeds we settled 850 fish to 3 habitats (Isaszeg, Rajka, Szarvas; ~2-6cm). In my presentation I would like to present my experience concerning this work.

Keywords: Carassius carassius, Alnus glutinosa, water fungi

Irodalmi áttekintés

A magyarországi széles kárász (*Carassius carassius*) állomány az elmúlt egy évszázadban, de főleg az utóbbi ötven év folyamán erősen hanyatló tendenciát mutat, melyet elsősorban a megromlott környezeti feltételek indokolnak. 2012-ben a Magyar Haltani Társaság honlapján történő szavazás eredményeképpen a széles kárászt választották az év halának, ráirányítva a közvélemény figyelmét a fajra. Hazánkban a környező országok gyakorlatával ellentétben (pl. Ausztria, Horvátország, Szlovákia, Szerbia, Románia) célunk a védettségi státusz bevezetését megelőzni, ennek érdekében eredeti élőhelyeinek rehabilitációjával és telepítésekkel megerősíteni a hazai állományokat.

Munkám során 3 fő célom volt: Mesterséges szaporítás útján ivadékokat nyerni és nevelni: a már mások által használt szaporítási folyamatot megismerni, alkalmazni és kiegészíteni alternatív, környezetbarát ikrakezelési megoldással. Továbbá telepítés útján részt venni a faj megőrzését szolgáló programokban: az ivadékokat telepíthető méretig nevelni, majd különböző élőhelyekre kitelepíteni. Végül mindenképpen szerettem volna lakóhelyem, Gödöllő környékén is elősegíteni a széles kárász fennmaradását.

A széles kárász (Carassius carassius) általános és morfológiai jellemzése, elterjedése

Zömök testű, oldalról lapított, magas hátú halunk. Bajuszszálai nincsenek. Pikkelyei nagyok, egymásra borulóak, az oldalvonal mentén 32-35 db található. Hátúszója 14-21 sugarú, magas, pereme kifelé domborodik. Az első sugár puha, hátulsó széle sűrűn fogazott, a fogak száma 25-30. Az egészen fiatal egyedek faroknyelén, közvetlen a farokúszó előtt, egy körbefutó fekete gyűrű látható, mely később folttá válik, az idős halaknál el is tűnhet. Közepes termetű faj, hossza 15-25 cm, ritkán nő 30 centi fölé.

Őshonos halunk, mely Európa túlnyomó részén, továbbá Nyugat-és Közép-Szibéria vizeiben is megtalálható (web1).

Ökológiai jellemzése, jelentősége

Tipikus állóvízi hal. Elsősorban a dús növényzetű, sekély, iszapos aljzatú tavakat és holtágakat részesíti előnyben. A széles kárász mindenevő halfajunk (web1). A fitofil fajok közé tartozik, erősen ragadós ikráit vízinövényekre vagy vízbe merülő növényekre rakja (Kiss 2000).

A széles kárász hajdan országszerte elterjedt és gyakori volt, ezáltal fontos szerepet töltött be a vízi ökoszisztémákban.

Anyag és módszer

A mesterséges szaporítás menete

Kísérletemben az anyák hormonális kezelésére pontyhipofízist használtam. Az ikraszórás megkezdésekor az ikrásokat kiemeltük, nedves törölközőbe csavartuk, az ivarnyílás tájékát szárazra töröltük, az ikrát pedig műanyag edénybe fejtük le. Mindegyik ikratételhez két tejes tejét használtuk, a genetikai variancia elősegítése és a jobb termékenyülés végett. A tejet közvetlenül az ikrára fejtük. A termékenyítést az úgynevezett száraz termékenyítési eljárással végeztük. A spermiumokat állott csapvízzel aktiváltuk, majd egy perces, óvatos kevergetés után a Woynárovich-féle termékenyítő oldattal duzzasztottuk az ikrákat (30 g karbamid, 40 g só 10 liter vízben feloldva) folyamatos keveréssel. A termékenyítő-oldatot 1-2 alkalommal cseréltük. Az ikraduzzasztás végeztével (60-90 perc) az ikrákat tanninos oldattal (5 g csersav / 10 liter víz) is kezeltük 3 × 15 másodpercig. Ezt követően a teljes ikratételt három részre osztottam és az adagokat 1,5 liter térfogatú mini Zuger-üvegekbe töltöttem.

Enyves éger (Alnus glutinosa)

Általános jellemzés:

Fiatalon szabályos, kúpos koronával rendelkezik, az idő múlásával széles koronájú, 20-40m magas fává terebélyesedik. Finom repedésektől tagolt kérge szürke vagy barna. Széles, visszás-tojásdad, karéjos szélű, kicsípett vagy tompa csúcsú levelei a mogyoróra emlékeztetnek, 4-7 érpárosak, fiatalon enyves tapintásúak. A porzós barkák a nyíréhez hasonlóak, azonban nagyobbak, bordópiros fellevelekkel, sárga portokokkal rendelkeznek. A termős virágok tojásdad barkában állnak, melyek idővel elfásodnak, megérve tobozszerűek, azonban bennük nem magokat, hanem apró hártyásszárnyú terméseket találunk. Fája nem korhad a vízben, törzsét az ártereken nem ritkán több méteres víz is boríthatja huzamosabb ideig. Elterjedési területe Eurázsia és Észak-Afrika. Hazánkban aránylag gyakori faj, patakok folyók menti liget- és láperdőkben találja meg életkörülményeit. (More&Fitter 1980, Debreczy&Bíró 1973, Simon&Seregélyes 2005)

Jelentősége, felhasználása

Az enyves éger felhasználása rendkívül sokrétű. Az építő és- bútor ipar továbbá a népi gyógyászat és az akvarisztika is alkalmazza.

Ikrakezelés égertobozzal, ivadéknevelés

Az ikrák Zuger-üvegbe kerülését megelőző napon, fél kg száraz égertobozt áztattam a rendszerre kötött 500l-es kád vízébe. A 12 óra hosszan tartó kezelés hatására, reméltük, hogy minden egyéb, mesterséges vegyszer hozzáadása nélkül sikerül megóvni az ikrákat a penészedéstől (Pl.: *Saprolegnia*).

Miután a lárvák kikeltek egy óriás Zugerbe (200l), majd nevelő kádakba (500l) telepítettem őket. Az etetést Artemia salina naupliussal, gyűjtött planktonnal, később tubifexel végeztem. Előnevelés követően az ivadékokat a tanszéki fóliás tóba telepítettük ki (10 m^3).

Eredmények és értékelésük

Ikrainkubáció

Az ikrák inkubálása mini-Zuger üveg rendszerben történt. Az égertoboz igazolta a szakirodalomban leírt antimikrobiális hatását. A keltetés során, sem az elpusztult, sem pedig az élő ikrákon nem jelent meg penész (pl.: *Saprolegnia*). A termékenységi %-ok 69-85% között változtak. A lárvák kezdeti nevelése is ebben a vízben történt, probléma nélkül.

Telepítések

A veresegyházi Tavirózsa Környezet-és Természetvédő Egyesület által 2008-ban megkezdett lápi póc fajvédelmi mintaprogram keretén belül 550 széles kárászt (~1,5-3cm) telepítettem ki revitalizált élőhelyekre, ahol monitoring adatok alapján értékeltem a megmaradásukat, növekedésüket. Ezentúl még a saját szaporításból 850 kárászt telepítettünk ki fajmegsegítési célzattal 3 helyre (Isaszeg, Rajka, Szarvas; ~2-6cm).

Revitalizált élőhely monitoring

A veresegyházi székhelyű Tavirózsa Környezet- és Természetvédő Egyesület 2008-ban indította el a Lápi póc Fajvédelmi Mintaprogramot, melyhez a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéke is csatlakozott.

Kettő telepítés és egy 2012. 09. 06-án történt halfaunisztikai vizsgálatok alapján (elektromos halászgép) kijelenthető, hogy a halak megtalálták életfeltételeiket, és szaporodtak is, tehát a revitalizált élőhely kialakítása sikeresnek tekinthető.

Következtetések és javaslatok

Alternatív ikrakezelési megoldásként ajánljuk az égertoboz használatát. Az általunk végzett kísérletben az enyves éger (*Alnus glutinosa*) elfásodott termős virágait (tobozait) használtuk fel. Az ikrák Zuger-üvegbe helyezése előtti este, fél kg, száraz tobozt helyeztünk a vízbe. A rendszerbe lévő víz 550 liter volt, tehát körülbelül 10 dkg toboz/100 liter az általunk ajánlott mennyiség. Ekkora dózis hatására a gombásodás már nem jelent meg, az ikrák és az ivadékok viszont még nem szenvedtek károsodást.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Urbányi Béla** tanszékvezető úrnak, hogy kísérleteim helyszínét biztosította. Ezen kívül külön köszönettel tartozom konzulenseimnek **Dr. Müller Tamásnak és Demény Ferencnek**, akik segítettek kutatási témát találni, melynek lebonyolításához messzemenőkig minden segítséget megadtak. Köszönettel tartozom még Hegedűs Istvánnak, Domokos Ágostonnak, Búza Eszternek és mindenkinek, aki szakmai és baráti segítséget nyújtott! Továbbá munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat,

illetve TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatta."

Irodalomjegyzék

Debreczy Zs, Bíró K. (1982): Fák, bokrok. Móra Ferenc Könyvkiadó, Budapest, 61. p.
Kiss, I. (2000): Az indukált halszaporítás módszerei,. Szerk. Horváth, L. Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp. 46-50.
More, D., Fitter, A. (1990): Fák. Gondolat Kiadó, Budapest, 240. p.
Simon T., Seregélyes T. (2005): Növényismeret. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 276. p.
Internetes források:
web1: *Harka Á., Sallai Z.* (2007): Magyarország halfaunája.
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/magyarorszag-halfaunaja/ch05s43.html
elérés dátuma: 2012. 10.

BIOGAZDÁLKODÁS A HAZAI MÉHÉSZETEKBEN

Szalai Tamás[1], *Szalai Dániel*[2], *Saláta Dénes*[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Ökológiai Gazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
[2]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Természetvédelmi és Tájökológiai Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
Szalai.Tamas@kti.szie.hu

Összefoglalás

A konvencionális és a bioméhészetet is számos rendelet szabályozza. Hazánkban az ellenőrzött és tanúsított bioméhészetek a kilencvenes évek közepétől jelentek meg. Az átállt méhészetek száma kb. 1%-a a konvencionálisnak, a méhcsaládok száma az ottani átlagnál kissé nagyobb. Az ökológiai előírások jelentős része vonatkozik az átállásra, amelynél a lépkészlet cseréje kiemelt jelentőségű. A méhlegelőt tekintve a bioméz legfontosabb forrása az akác (*Robinia pseudoacacia*) és az igen elterjedt veszélyes évelő gyom, a selyemkóró (*Asclepias syriaca*). A kártevők és méhbetegségek elleni védekezési lehetőségek jelentős eltéréseket mutatnak a bioméhészetben. A méhlegelő és a klíma változásai kedvezőtlenül befolyásolhatják a méhcsaládok gazdaságos fenntarthatóságát is. A dolgozatban a hazánkban alkalmazott kaptárakat és egyes technológiai változatokat ismertetjük és javaslatokat teszünk a bioméhészet fejlesztésére.
Kulcsszavak: méhészet, ökológiai gazdálkodás, átállási idő

Organic apiculture in Hungary

Abstract

Conventional and organic apiculture are regulated with several directives. In Hungary controlled and certified apiaries have started in the mid-nineties. Organic apiaries after the conversion period mean 1% of the conventional ones; however the number of colonies exceeds its average. Significant part of the organic regulations deals with the transition period where the replacement of the combs has outstanding importance. Regarding to the bee pasture the most important sources of organic honey are black locust (*Robinia pseudoacacia*) and the dangerous, wide spread perennial milky weed (*Asclepias syriaca*). There are big differences in the possibilities of pest and disease control in the organic operations. Changes of climatic conditions and bee pasture may have negative influence on economic sustainability of the colonies. In the paper technological versions and hive types of Hungary are dealt with. For the development of organic beekeeping suggestions have been included.
Keywords: apiculture, organic farming, conversion period

Introduction

Beekeeping has a long and successful tradition in Hungary (*Nikovitz*, 1983, *OMME*, 2013). The country is among the largest producers in Europe. The annual honey production varies between 15-25 tons produced by over 18000 Hungarian beekeepers. The European Union regulated the production of organic agriculture to give a common framework through the certification of the environmentally sound production system (*EU*, 1991, *EU*, 2007). In Hungary the number of organic beekeepers stabilised in the last decade as shown on *Table 1*, however their number is around 1% of the conventional producers. The number of organic colonies is about 2% of the total (*Biokontroll*, 2012).

Table 1: **Number of organic beekeepers in Hungary**

Year	2001	2002	2008	2009	2010	2011	2012
Nr. of organic apiaries (1)	207	193	200	192	181	181	176
Nr. of organic colonies (2)	15532	15337	20044	20170	18622	19376	19296

Source: Biokontroll, 2013

1. táblázat: Ökológiai méhészek száma Magyarországon
(1): biométhészetek száma (2): a biométhészetekben élő méhkolóniák száma

Although honeybees (*Apis mellifera*) have successfully adapted to the environment since millions of years and have good abilities to resist or tolerate many diseases, pests and infections, new parasites and diseases have appeared from the eastern race (*Apis cerana*). Since the varroa mite (*Varroa destructor*) have become common in the colonies beekeepers need regular acaricide treatments to keep mite populations under control. *Bogdanov* (2006) reported that the main danger for bee products originates more from apicultural practices than from the environment. The main contamination risks for the different bee products are as follows: Honey: antibiotics; wax: persistent lipophylic acaricides; propolis: persistent lipophylic acaricides, lead; pollen: pesticides; royal jelly: antibiotics.

Our aim was to study the main characteristics of the Hungarian organic apiaries.

Material and methods

Our survey was based on the organic apiaries, which are under control by Biokontroll Hungária Nonprofit Ltd. in Hungary. Organic (certified) beekeepers were selected from three areas that are different in terms of agro-ecological conditions:

- Zone 1 – north part of Hungary hilly region
- Zone 2 – north-east part of Hungary relatively flat area along the river Tisza
- Zone 3 – south-east part of Hungary definitely flat area

The database of the selected beekeepers consists of 62 apiaries with 5164 colonies.
--Origin of the colonies was determined (transition from conventional or purchase of organic ones).
--Source of wax or comb foundation for the conversion period was observed.
--Management, preparation of conversion was monitored.
Beekeepers from the three zones were interviewed and data were recorded. An evaluation was prepared based on the three zones. The comparison and the evaluation were based on the regulation of the organic production according to EU 834/2007. The present regulation 834/2007

of the European Union and its implementation 889/2008 came into force in 2009 (*EU*, 2007, *EU*, 2008).

Results and discussion

The survey was carried out in the most significant regions in Hungary regarding the numbers of organic beekeepers. The studied apiaries and the number of the colonies in the three regions are shown on *Table 2*.

Table 2: **Number and size of the studied apiaries**

Zone (1)	Number of apiaries (2)	Number of colonies (3)	Average size of the apiary (hives/apiary) (4)
1	26	1900	73
2	13	1444	111
3	23	1820	79
Total	62	5164	88

2. táblázat: A vizsgált méhészetek mérete és száma
(1): régió (2): méhészetek száma (3): kolóniák száma (4): a méhészet átlagos mérete (kaptár/méhészet)

There are three main types of hives in the Zones. The one time traditional horizontal 'NB' (frame size: 42x36cm), the half height of '½NB' with supers of 42x18cm and the 'Hunor' supers (42x27cm). *Table 3.* indicates the shares of the hive types in the studied apiaries.

Table 3: **Hive types of the in the studied apiaries**

Hive type	Percent of the beekeepers in (1)		
	Zone 1	Zone 2	Zone 3
NB (horizontal)	47	92	61
Hunor	15	-	26
½NB	38	8	13

3. táblázat: A vizsgált méhészetek kaptártípusai
(1): a méhészek százalékos aránya (régiónként: oszlopok, kaptártípusonként: sorok)

The effect of local conditions can be followed on the development of the regional beekeeping and methods of production as well. The flat areas (Hungarian Great Plain) were among the first areas where migratory beekeeping was introduced. It was often linked with the greater frame/comb size which were used in larger hives as well (*Nikovitz,* 1983). The number of migration is shown on *Table 4.*

Table 4: **Frequency of migrations in the apiaries**

Number of migration	Percent of beekeepers in		
	Zone 1	Zone 2	Zone 3
0	11,5	7,5	-
1	19,2	85	4
2	34,6	7,5	13
3	11,5	-	17
4	19,2	-	66
5	3,8	-	-

4. táblázat: A vándorlások gyakorisága a méhészetekben
(1): a vándorlások száma (2): a méhészek százalékos aránya

The total areas of Black locust (*Robinia pseudoacacia*) forests are around 400 thousand hectares (*ÁESZ*, 2005). Sunflower has got a high value in the beekeeping sector because of the significant sowing area as well, however it cannot be certified as organic honey and it represents a different commercial category. Since the Black locust forests are not treated with plant protection products and can be considered as "natural" vegetation is territorial distribution ensures that it can be the main source for organic honey as it is reflected on *Table 5*. Milkweed (*Asclepias syriaca*) has become widespread in many abandoned areas as unwanted vegetation and provides good source of nectar for organic honey as well (*Szalai és mtsai*, 2008).

Table 5: Main bee-pastures of the studied apiaries

Bee pasture (1)	Number of apiaries in (2)		
	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Black locust (3)	26	13	23
Sunflower (4)	8	-	18
Milkweed (5)	6	-	-
Rape (6)	2	-	13
Wild flowers (7)	2	2	1
Pumpkin (8)	1	-	-
Mustard (9)	1	-	-
Willow (10)	-	1	-

5. táblázat: A vizsgált méhészetek főbb méhlegelői
(1): méhlegelő (2): a méhészek százalékos aránya (3): akác (4): napraforgó (5): selyemkóró (6): repce (7): vadvirágokn 8: tök 9: mustár (10): szomorúfűz

The origin of organic colonies/apiaries was mostly the transition of the conventional apiaries, (92%) however from 2010 the purchase of organic colonies could be followed in higher rate/year (8-20 %) due to national programmes for young farmers. In the transition process the main task is the replacement of wax, which means the combs of the colonies. The EU regulation accepts the use of virgin wax/comb built under the transition period in the given apiary. In our survey this type of wax production varied between 21-33%. The other source was the purchase of certified organic wax or comb foundation. We found 71% and 29%, respectively. The origin of the wax or comb foundation was in 99% from certified organic beekeepers in Hungary.

Unfortunately, organic wax or comb foundation is not a regular product in the Hungarian market. The 1% exception means certified purchase from abroad.

In the management practice in establishing/converting new apiaries the effect of weather conditions influencing nectar and pollen sources was significant. Summer drought in zones 2 and 3 caused shortage of nectar in the bee pastures and in 21-42% reduced honey yield too. The amount of new combs and colony population was significantly higher in good years (24-95%). However, migration in most sites helped the progress in conversion but generated higher costs as well.

Feeding of organic colonies is possible with their own honeycombs. The use of conventional sugar is not allowed since 2002, thus the application means non-conformity against the regulations. Organic sugar is available in the market but the extra costs are high for general use.

Conclusions

During in-conversion the full compliance with the regulation is needed. The selection of the proper bee pastures was not considered as a difficult request. However, the replacement of the combs is often needs extra attention and monitoring. The contamination risk might be lower in the honey supers than in the brood combs (*Bogdanov és mtsai,* 1998).

In the case of the hive types comparing their ratio to the national average, the horizontal NB hive is very different from the 47% or 61%. This traditional big frame and technology may cause difficulties in mite control and in further development as well. In Zone 2 the big (NB) hive type was 92%, which reflects the traditional honey production. There was only 1 or 2 migrations with the horizontal type hives (‘NB’ - 92%), while 4-5 migrations/year were done by hives having different supers (‘½NB’ - 53%, ‘Hunor’ - 39%).

At the same time the local conditions of these sites influenced the migrations as well. In Zone 1 seven pastures were attended, sometimes in 5 migrations. The group of the beekeepers from Zone 2 transport the colonies almost exclusively to Robinia pseudoacacia pasture. In Zone 3 the visit of arable crops was almost as frequent as acacia. Technologies contributing to sound colony management (migration, mite control, honey harvest, etc.) with improved knowledge in organic apicultural operations may lower the risk of production. The findings are complementary to studies on land use change and organic beekeeping and the different treatments used in organic beekeeping (*Szalai et al,* 2008, *Skubida et al,* 2006) respectively.

Acknowledgement

The authors express their thanks for the participating beekeepers, Biokontroll Hungária Nonprofit-Ltd.-and-Kutató-Kari-Kiválósági-Támogatás-Research-Centre-of-Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL.

References

ÁESZ (2005): Magyarország erdőterületei. Állami Erdészeti Szolgálat.

Biokontroll Hungária Kft. (2013): Beszámoló a 2012-es tevékenységről. Budapest, www.biokontroll.hu

Bogdanov S. (2006): Contaminants of bee products Apidologie, 37: 1-18.

Bogdanov S., Kilchenmann V., Imdorf A. (1998): Acaricide residues in some bee products, J. Apic. Res., 37: 57-67.

EU (1991): Council Regulation (EEC) No 834/2007 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products

EU (2007): Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 834/2007

EU (2008): COMMISSION REGULATION (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control

Nikovitz, A. (ed.)(1983): A méhészet kézikönyve. ÁTK, Budapest

RASFF (2006): Annual report, European Commission

Skubida P., Semkiw P., Teper D. (2006): Organic beekeeping management. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 51: 164-170.

Szalai D., Szalai M. E., Szalai T. (2008): Changes of land use and its effect on organic apiculture. Cereal Research Communications 36: 267-270.

ILLÓOLAJ TARTALMÚ KÉSZÍTMÉNY ALKALMAZÁSA NÖVENDÉK PULYKÁK TERMELÉSI PARAMÉTEREINEK FOKOZÁSÁRA

Szöllősiné Bende Réka[2], Erdélyi Márta[1], Mézes Miklós[1], Szabó Rubina Tünde[1], Koczka Noémi[1], Horvainé Szabó Mária[1], Fazekas Natasa[1], Podmaniczky Béla[1], Weber Mária[1]

[1]Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
2103 Gödöllő, Páter K. u. 1.
[2] Gregus Máté Mezőgazdasági Szakképző Iskola
6800 Hódmezővásárhely, Árpád u. 8.
bendereka@hiszk.hu

Összefoglalás

Kísérletünkben oregano+rozmaring+fokhagyma növényekből származó illóolajok hatását vizsgáltuk növendék pulykák termelési paramétereire. Az állatok az utónevelési időszakban (6-16 hét) kapták meg az illóolajokat tartalmazó készítményt, mint takarmány kiegészítőt. A gyártó ajánlását követve minden hételső 3 napján kapták a készítményt, majd 4 nap szünet következett. A kivonatokat ivóvízben adagoltuk a gyártó által ajánlott mennyiségben. Vizsgálati célkitűzésünk annak felmérése volt, hogy a fent említett kivonatok, miként befolyásolják a telepi termelést.
Megállapítható volt, hogy ugyan élőtömegben a készítményt fogyasztó csoport egyedei átlagosan 0,5 kg-mal kissebek voltak, azonban a nevelési időszak során feljegyzett elhullások mértéke alapján a gyógynövényes csoport kiemelkedően teljesített.
Ezen paraméterek önálló vizsgálata alapján nem látszik egyértelműen a kivonatok jótékony hatása, mert ugyan az elhullások mértéke igen alacsony volt, az élőtömegben azonban nagy elmaradás volt tapasztalható a kísérleti csoportokban, amit nem ellensúlyozott teljes mértékben a csekély elhullás.
A vágóhídi eredményközlés alapján azonban elmondható, hogy az élőtömeget tekintve a kontroll csoport egyedei teljesítettek jobban (8,69 kg), amely mögött gyakorlatilag a kiegészítést kapott (V) csoport egyedei sem maradnak el (8,64).
Az értékes húsrészek arányából is látható, hogy a vegyes kiegészítés igen jótékony hatással volt az állatok termelésére. Amennyiben a főtermékek összesítését vizsgáljuk a vegyes kiegészítésben részesült csoport 2,66 %-kal múlta felül a kontroll csoportot.
Kulcsszavak: pulyka, növényi kivonat, termelési paraméterek,

Investigation of effect of different plant oils on turkey meat quality

Abstract

Effects of oregano and blend of oregano+rosemary+garlic extracts on turkey were studied in the experiment. The phytobiotics were used during the finisher phase of turkey fattening. Extracts were used according to the recommendation of the producer – extracts were added for three days a week, while no treatment was done in the further four days. Herb extracts were added to the drinking water of the birds in concentration recommended by the producer. Aim of the

experiment was to study the effect of extracts on the frying and the following cooling losses, as well as on texture and sensory characteristics of the meat. Medallion of the birds were taken and frozen until analysis. Then frying was done until nucleus temperature of the meat has reached 72C. Then meat was placed on a tray for cooling to room temperature. Results have shown that texture and sensory characteristics of the meat were not affected by the two phytobiotics (oregano; oregano+rosemary+garlic).
Keywords: turkey, herbal extract, production parameters

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A pulykahús ma már világszerte közkedvelt élelmiszer, de igazi térhódítása csak akkor kezdődött, meg amikor a folyamatos termelési feltételek megteremtődtek. Magyarországon a pulykatenyésztés területén nagy átalakulás ment végbe. Integrált termelési rendszerek jöttek létre, amelyek magukba foglalják a tenyészállatok tartásától a késztermék értékesítéséig közbeeső összes tenyésztési, nevelési, tartástechnológiai és feldolgozási fázist.

A pulyka nagy genetikai képességet csak az igényeinek legmegfelelőbb takarmányozással lehet kibontakoztatni. A pulykahús termelés költségeinek 60-70 %-a a takarmányköltség, tehát a cél az, hogy minél kevesebb takarmány elfogyasztásával minél több pulykahúst lehessen előállítani.

Az életminőség javítása magába foglalja az állati termékek minőségére vonatkozó előírások egyre szigorodó betartását, az egészségre ártalmas anyagok kivonását az állati termék előállítás folyamatából és a természetes anyagokhoz, a természethez való visszatérést.

Napjainkban egyre inkább megnőtt az emberek egészséges táplálék iránti igénye. Megnézik, hogy mit vásárolnak, honnan származik a termék és milyen körülmények között állították elő.

A fogyasztók egészséges táplálék iránti igénye, valamint az állati termékek előállításának egyre szigorodó szabályozása, a természetes hozamfokozók alkalmazására irányítja a kutatók, a termelők és a fogyasztók figyelmét. Óriási lehetőségeket teremt az erdeinkben, legelőinken, kertjeinkben megtalálható gyógynövények faunája az állatok takarmányozásában. Hatásuk és hatásmechanizmusuk megismerése, hozamfokozáshoz szükséges mennyiségük megállapítása körültekintő kutatómunkát igényel (*Szűcsné et al.*, 2003).

A szigorodó előírások, valamint a minőségi áru előállításának felárral kecsegtető feltételei sarkaltak arra, hogy megvizsgáljam a dolgozatomban ismertetett természetes anyagok – oregano, fokhagyma, rozmaring – kivonatának hatását és gazdasági jelentőségét.

Valaha a gyógy- és fűszernövényeket az orvosi aromaterápiás, ízesítő hatásuk miatt használták. Egyes fajtáik orvosi használata több ezer éves. Visszavezethetők az ősi egyiptomi, kínai, indiai illetve görög időkre. A széleskörű használat illetve szokások következtében mára sok növény közönséges étellé, vagy fűszerré vált. Például a fokhagyma, a mustár, az oregano (*Gill*, 2005).

Azokat a növényi anyagokat, amelyek kedvező hatást gyakorolnak a gazdasági állatok termelésére, fitobiotikumoknak nevezzük. A növényi drogok fogalma - a szövegkörnyezettől függően – használható a fűszerek szinonimájaként is. E körbe szárított, tartósított növények, növényi szervek, illetve részek tartoznak. A fitobiotikumok hatását leginkább az úgynevezett másodlagos, azaz olyan anyagoknak tulajdonítják, amelyek a növény elsődleges anyagcseréjében nem játszanak ugyan fontos szerepet, mégis létfontosságúak a növény életének fenntartásához.

Másodlagos növényi anyagok alatt az esszenciális olajokat, csípős anyagokat, keserű anyagokat, pigmenteket és fenol vegyületeket értünk. (*Wald,* 2004).

Az oregano gyakrabban használt magyar nevei: fekete gyopár, vadmajoránna, vargamajoránna. Rendszertani besorolás szerint a Lamiales (árvacsalán-virágúak) rendjébe, Lamiaceae (ajakosok) családjába Origanum nemzetségbe tartozó faj. A drog illóolaj-tartalma alfajtól függően igen eltérő lehet (0,5-8 %). A hazai termesztésű populációk drogjának illóolaj-tartalma 0,5-1,5 % között változhat. Fő összetevői a karvakrol és a timol. (*Halászné, Szabó,* 2000)

A rozmaring latin neve: Rosmarinus officinalis az ajakosok (Lamiaceae) családjába tartozó évelő, örökzöld, félcserje. Rosmarinus officinalis fűszer- és gyógynövény. Dél-Európában honos, de nálunk is újra kedvelt. A kámforra emlékeztető keserű, aromás fűszert az örökzöld bokor leveleiből (rosmarini folium) kapjuk (*Petrovicsné,* 2006).

A fokhagyma (*Allium sativum*) a liliomvirágúak rendjébe (*Liliales*), azon belül a liliomfélék (*Liliaceae*) családjába tartozik. Őshazája egyesek szerint a kirgiz sztyeppvidék, mások szerint India. A gyógytermékek gyógyszerkészítmények kiindulási alapanyaga a friss fokhagyma (*Allii sativi bulbus*), melyből hagyományos gyógyászati célra szárítással és őrléssel fokhagymaport (*Allii sativi bulbi pulvis*-Ph. Eur.4.), vagy illóolajat (*Allii sativi aetheroleum*) állítanak elő (*Babulka,* 2004).

A hús ősidők óta az emberiség létfontosságú tápláléka. A hús és húskészítmények az emberi szervezet fehérjeszükségletének fedezésében játszanak fontos szerepet, és ami kevésbé köztudott, vitaminokat és ásványi anyagokat is tartalmaznak. (*web 1.*).

A pulykahús népszerű baromfihús, melyet elsősorban kis kalóriatartalmának és fehérjedús mivoltának köszönhet. Íze nem annyira jellegzetes, mint a többi szárnyasé, de ízletesen, sokoldalúan elkészíthető és egészséges. A pulykahúsról bőrét lefejtve bármilyen energiaszegény diétában alkalmazható, jelentős a szív- és érrendszervédő hatása többszörösen telítetlen zsírsavtartalma miatt. Energiatartalma átlagosan 174 kcal, 727 kJ/100 gramm (*web 2.*).

A húsminőség egy összetett meghatározás, amely számos paramétert magába foglal, azonban a szoros értelemben vett húsminőségen a vágás utáni biokémiai változások következtében kialakuló fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságok összességét értjük Ezeket a paramétereket négy tulajdonság kategória köré csoportosíthatjuk. Úgymint érzékszervi, táplálkozási, élelmiszerbiztonsági és technológiai tulajdonságok. (*Vadáné,* 1996).

Anyag és módszer

A kísérletbe vont madarak a Nagyfa - Alföld Kft nagyfai pulykatelepén lévő telepen voltak elhelyezve.

A kísérletben a Hendrix Genetics Company által forgalmazott Converter hibrid tojó egyedek vettek részt. Az állatokat véletlenszerűen 3 csoportra osztottuk (K: kontroll; O: oregano kivonatot tartalmazó kiegészítésben részesült; V: oregano+fokhagyma+rozmaring vegyes kivonatot tartalmazó kiegészítésben részesült)

Az állatok takarmányozása a telepi gyakorlat szerint a termeltető ajánlásának megfelelő, kereskedelmi forgalomban kapható teljes értékű keveréktakarmánnyal történt 6 hetes kortól a 16. hétig – az utónevelőbe kerüléstől vágóra szállításig. A kísérlet során 3 fázisban takarmányozták az állatokat (Nevelő I., Nevelő II., Befejező I.).

Az oregano-kivonatot HERBAN® készítmény formájában az oregano+fokhagyma+rozmaring vegyes kivonatot HERBAMIX ENTERO® készítmény formájában kapták az állatok ivóvízbe adagolva a gyártók által ajánlott mennyiségben.

A kísérleti időszak alatt közel hetente mértük az állatok testtömegét, továbbá folyamatosan feljegyeztük az elhullások számát.

A vágóhídi paraméterek közül a következőket vizsgáltuk: vágáskori testtömeget, előhűtés előtti grilltömeget, előhűtés utáni grilltömeget, értékes húsrészek arányát (alsócomb, felsőcomb, mellfilé), hőtermékek kihozatali %-ot, hasznos kihozatali %-ot.

A vizsgálatok eredményeiből csoportonként számoltam ki a számtani átlag és szórás (S.D.) értékeket az egyes mérési paraméterek esetében. A szignifikancia-szintek megállapításához t-próbát alkalmaztam.

Eredmények és értékelés

A telepen reprezentatív mintákból hetente testtömeg méréseket végeztünk. Az *1. táblázatban* a telepi csoportonkénti átlag testtömeg méréseket mutatjuk be. Az utónevelési időszakban az egyes csoportok nem tértek el szignifikáns mértékben a testtömeg-mérések adatai alapján, azonban a vágást megelőző mérlegelés alapján a kontroll csoport egyedei statisztikailag igazolhatóan (K-V és K-O: $P<0,05$) nagyobbak voltak, mint a kísérletiek (K: 9,08 kg, V: 8,5 kg, O: 8,6 kg).

1. táblázat: **Csoportonkénti telepi átlag testtömegek**

Testtömeg-mérési időpontok (1)	**K átlag testtömeg (2) (kg)**	**V átlag testtömeg (2) (kg)**	**O átlag testtömeg (2) (kg)**
2011.06.03	2,48	2,30	2,38
2011.06.10	3,38	3,44	3,22
2011.06.17	4,74	4,72	4,49
2011.06.29	6,25	6,37	6,15
2011.07.09	6,80	7,12	6,93
2011.07.15	7,50	7,82	7,66
2011.07.22	8,15	8,16	8,09
2011.08.01	9,08	8,50	8,60

Table 1: Average body weight of the groups at the ranch
(1) dates of the weightings (2) average body mass

A nevelési időszak során feljegyzett elhullások összesítését követően kiszámoltuk az adott csoport létszámára vetített hányadát (%). A nevelés alatti elhullások mértékét a *2 táblázat* tartalmazza. A nevelési időszak során feljegyzett elhullások összesítése alapján a növényi kivonatok alkalmazása során a kontroll csoporthoz képest csekély mértékű volt az elhullás.

2. táblázat: **Elhullások mértéke**

Megnevezés (1)	**K**	**V**	**O**
Elhullás (db) (2)	58	15	12
betelepített létszám (3) (db)	1011	512	611
Elhullási % (4)	5,74	2,93	1,96

Table 2: Mortality rate
(1) categories (2) mortality (head) (3) introduced population (head) (4) mortality %

A vágóhídi szemrevételezés alkalmával a kontroll (K) csoportról a következő megállapítást tették: „Szemre vételezésnél viszonylag kerek formás állomány, a szórtság a szokott mértékű, 5,30 kg-os grillsúlytól a 7,70 kg-os grillsúlyig".

Az oregano+rozmaring+fokhagyma vegyes kivonat adagolása viszonylag kerek formás állományt eredményezett, azonban a szórtság a szokottnál jóval nagyobb volt, a 4,40 kg-os grillsúlytól a 7,60 kg-os grillsúlyig.

Az oregano kivonat következtében sovány, nyurga állomány került vágóhídra, a szórtság azonban a szokott mértékű volt, 5,00 kg-os grillsúlytól a 7,00 kg-os grillsúlyig. Szembetűnő volt, hogy híg, világoszöld bélsár jellemezte a csoportot.

A vágóhídon mért eredményeket a 3. *táblázat* tartalmazza. A vágóhídi eredményközlés alapján látható, hogy az élőtömeget tekintve a kontroll csoport egyedei teljesítettek legjobban (8,69 kg), amely mögött a vegyes (V) kiegészítést kapott csoport egyedei sem maradnak el (8,64). Azonban szembetűnő különbség figyelhető meg az oregano (O) kiegészítést kapott csoport esetében (8,24). Ez a lemaradás (0,45 kg) már jelentékeny, 599 állat esetében már tetemes (269,55 kg) élőtömeg elmaradást eredményezett.

3. táblázat: **A vágóhídon mért eredmények**

Megnevezés (1)		**V**	**K**	**O**
Vágáskori testtömeg (kg) (2)		8,64	8,69	8,24
Előhűtés előtti grilltömeg (kg) (3)		6,57	6,63	6,14
Előhűtés utáni grilltömeg (kg) (4)		6,49	6,57	6,05
Értékes húsrészek aránya (5)	Alsócomb (6)	10,44	8,80	9,95
	Felsőcomb (7)	9,36	9,08	9,25
	Mellfilé (8)	22,07	21,35	21,69
Főtermékek kihozatali % (9)		41,88	39,22	40,9
Hasznos kihozatali % (10)		81,56	75,53	79,5

Table 3: Results after slaughtering
(1) production trait (2) body weight at slaughtering (3) grill weight before pre-cooling (4) grill weight after pre-cooling (5) proportion of valuable meat parts (6) drumstick (7) thigh (8) breast fillet (9) main product capacity % (10) profitable capacity %

Az előhűtés előtt és után mért grilltömegből látható, hogy az oreganos csoport ebben is elmaradt a kontroll és a vegyes kiegészítést kapott csoport mögött, amely különbség statisztikailag is igazolható, igen jelentős.

Az előhűtés előtti és utáni grilltömegek között csoporton belül statisztikailag nem igazolható a különbség, azonban ismét megfigyelhető az oreganos csoport lemaradása (átlag 0,09 kg/egyed), illetve a kontroll csoport jó teljesítménye (átlag 0,06 kg/egyed). A vegyes kiegészítésben részsült csoport a kettő közötti értéket produkált (átlag 0,08 kg/egyed).

Az értékes húsrészek arányából is látható, hogy a vegyes kiegészítés igen jótékony hatással volt az állatok termelésére. Azonban az elvárttal ellentétben nem az oreganos, hanem a kontroll csoport teljesített legrosszabbul a feltüntetett paraméterek mindegyike esetében. Amennyiben a főtermékek összesítését vizsgáljuk a vegyes kiegészítésben részesült csoport 2,66 %-kal múlta felül a kontroll csoportot, míg az oreganos csupán közel 1 %-kal maradt el.

Tovább vizsgálva a kihozatali százalékot, illetve a hasznos kihozatalt látható, hogy a vegyes kiegészítésben részesült csoport nemcsak a főtermékek kihozatalában jeleskedett, hanem összességében a további – belsőségeket és egyéb termékeket is beleszámítva – termékek, kidolgozási csoportok arányában is. Ezt ismét az oreganos csoport követi, majd a kontroll.

Következtetések

A termelési paraméterek önálló vizsgálata alapján nem látszik egyértelműen a kivonatok jótékony hatása, mert ugyan az elhullások mértéke igen alacsony volt, az élőtömegben azonban nagy elmaradás volt tapasztalható a kísérleti csoportokban, amit nem ellensúlyozott a csekély elhullás.

A vágási paraméterek alapján javasolható a vegyes (oregano+rozmaring+fokhagyma) kivonat adagolása, amely ugyan élőtömegben nem eredményezett többletet, de a vágóhídon mért paraméterek tekintetében előnyös hatásai voltak megfigyelhetők.

Mind a mell, mind a comb hús pH-t tekintve elmondható, hogy a pulyka húsának jellegét tekintve mindegyik érték a normál tartományban található, ami azt jelenti, hogy a növényi kivonatok adagolása egyik esetben sem okozott szélsőséges kémhatást.

A comb és a mell hús színének mérési eredményei esetében a kapott eredményekből megállapítható, hogy az általunk alkalmazott kiegészítések nem okoztak olyan mértékű vagy irányú elváltozást a hús színében, amely a jellegét veszélyeztette volna. Ez alapján egyik kivonat adagolása sem aggályos.

Köszönetnyilvánítás

A munkánkat a TÁMOP-4.2.1. B-11/2/KMR-2011-0003 azonosító számú, „Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatta.

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence-17586-4/2013/TUDPOL és az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat támogatta.

A Gallfood Pulykafeldolgozó és Értékesítő Kft.-nek, különösen Bánhalmi László gyárigazgató úrnak és munkatársainak Ratkai Andrea technológusnak és Kelemen Zsoltnak, akik a vágóhídon aktív segítségnyújtásukkal lehetőséget biztosítottak a mintavételek és a mérések precíz elvégzésére.

Borsi János bv. ezredes ügyvezető igazgatónak és Szöllősi Zsolt bv. őrnagy ügyvezető igazgató-helyettesnek, a nagyfai Nagyfa-Alföld Kft. vezetőinek, akik hozzájárultak a kísérlet elvégzéséhez és szakmai tanácsokkal segítették munkámat.

Irodalomjegyzék

Babulka (2004) Gyógy-, illóolaj-,és fűszernövények CD-ROM Com-Com Bt.
Gill C. (2005) Növények és kivonatok, mint hozamfokozók. Internetes cikk fordítás
Halászné Zelnik K.- Szabó K. (2000) Origanum vulgare, Szerkesztette Bernáth J., Mezőgazda Kiadó, 444-447 o.
Petrovicsné Takács R. (2006) www. bmmk.hu/herbalnetw/Techn.doc
Szűcsné Péter J.- Avasi Z.- Sófalvy F.- Vidács L.- Bíró J.- Hideg J. (2003) Gyógytea itatás hatása a brojler nevelés eredményeire. Állattenyésztés és Takarmányozás. 2003/vol52. 501-505 o.
Vadáné Kovács M. (1996): Az állatvágás és a hűtés fiziológiája, a hús fizikai tulajdonságai, húsminőség és előrejelzésének lehetőségei. – A nyers hús. Húsipari Továbbképző Napok, pp.103-125.
Wald C. (2004) Fitobiotikumok (növényi hozamfokozók) a takarmányozásban. 2004 év 3. szám 26 o.

Internetes hivatkozások:
Web 1. www. jomagyarbaromfi.hu
Web 2. www. gourmandnet.hu

A MAGYAR AKVAKULTÚRA ÁGAZAT ELŐTT ÁLLÓ KIHÍVÁSOK ÉS FEJLESZTÉSÉNEK FŐBB PRIORITÁSAI

Szűcs István

Debreceni Egyetem, AGTC Gazdálkodástudományi és Vidékfejlesztési Kar
Gazdálkodástudományi Intézet, Agrobiznisz Menedzsment Tanszék
4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
szucsi@agr.unideb.hu

Összefoglalás

A világ összes hal és halászati termék termelésében az akvakultúra szerepe egyre felértékelődik, mivel a tengeri fogások további növekedése már nem várható, miközben a fogyasztói és a ipari igények évről évre növekednek. Jelenleg a fogyasztási célú hal és halászati termékek mintegy felét az akvakultúrában állítják elő.
A jelenlegi tendenciák egyértelműsítik, hogy Európában a jövőben is nagy kereslet lesz a halra és az egyéb halászati termékekre. Az erőforrások hatékony felhasználása, a fenntarthatósági és élelmiszerbiztonsági szempontok előtérbe kerülése miatt, ezeknek a kihívásoknak legjobban az akvakultúra rendszerek tudnak megfelelni.
Ebben a cikkben a hazai akvakultúra előtt álló legfontosabb kihívások kerülnek bemutatásra. Az ágazati helyzetkép értékeléséhez kapcsolódva az akvakultúra ágazat versenyképessége és a lehetséges fejlesztési irányok kijelölése is megtörténik. A fejlesztési prioritások meghatározása során az innovációnak *(termék/technológia/marketing/szervezeti)* kiemelt szerepe van, mind a haltermelés, mind a halfeldolgozás területén. A konkrét fejlesztési prioritásokra alapozva készült el a hazai akvakultúra ágazat jövőbeli kívánatos állapotának a bemutatása, azaz az ágazati víziója.
Kulcsszavak: akvakultúra, gazdaságtan, fejlesztés

The challanges Hungarian aquaculture sector is facing and the key priorities of development

Abstract

Aquaculture plays an increasing role in the world's total fishery product and fish production as a further increase in marine fisheries based seafood is not expected, while consumer and industrial demand is growing from year to year. At the present, half of the fish and fishery products for consumption are originated from aquaculture.
It’s clear based on the current trends, that there will be high demand for fish and other fishery products in Europe in the future. Aquaculture systems can face those challenges the best, due to the efficient use of resources, sustainability and food safety issues.
The main challenges Hungarian aquaculture is facing are presented in this paper. The competitiveness of the aquaculture sector and the directions of the potential development are also discussed, in connection to the situation of the branch. Innovation plays a leading role in determining the priorities of the development *(product / technology / marketing / organizational)*, both in the fish production and in the fish processing area. Based on the specific development priorities on a desired future state of the Hungarian aquaculture industry we demonstrate the sectors' vision.
Keywords: aquaculture, economy, innovation

KORAI EMBRIÓELHALÁS ÖSSZEHASONLÍTÁSA SPF (SPECIFIED PATHOGEN FREE) ÉS NORMÁL TYÚKTOJÁSNÁL

Takács Attila, Weber Mária, Szabó Rubina Tünde, Kustos Károly, Fazekas Natasa, Liptói Krisztina

[1]Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet,
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
takacs.attila@indamail.hu

Összefoglalás

Témám a keltetés első 9-11 napjában történő korai embrióelhalás összehasonlító vizsgálata SPF tyúktojás és normál (Hampshire X Plymouth) keltetőtojásokban. A kilencedik napon történő lámpázás után azokat a tojásokat törtem fel, amelyek nem mutattak normális embrionális fejlődést.
Három fő fenotípusos kategóriát alkalmaztam (*Abbot és Yee*, 1975 és *Szalay*, 1989 nyomán):
- Pozitív fejlődésmenet (positive development - PD): A membránfelületek csak ekto- és endodermális szöveteket tartalmaznak. Vérszigetek nem alakultak ki.
- Embrió nélküli blasztoderma (blastoderm without embryo - BWE): Ektodermális, endodermális és mezodermális szöveteket lehet megfigyelni. A vérszigetek kialakultak.
- Elhalt embrió (dead embryo - D1-9): Az inkubáció első kilenc napja során különböző fejlődési stádiumban elhalt embriók.

Vizsgálataim célja, hogy az eredmények értékelése után következtetést tudjunk levonni, hogy vannak -e alapvető eltérések SPF és normál tojások embrióelhalása között. Az eddigi vizsgálatok alapján a kieső tojások száma mindkettő kategóriában közel azonos volt és a D3-5 fenotípus dominál. Jelentős embrionális elhalás figyelhető meg a PD és BWE fenotípusoknál is a többi kategóriához képest. A D6-9 fenotípusok mennyisége elhanyagolható az előzőekhez viszonyítva.
Kulcsszavak: tyúk, keltetés, SPF (Specified pathogen free), embrióelhalás

Comparing early embryonic mortality in SPF (Specified Pathogen Free) and normal hen eggs

Abstract

Our study was about the comparative analysis of early embryonic mortality in SPF hen eggs and standard (Hampshire X Plymouth) hatching eggs. Eggs not showing normal embryonic development during the candling on the 9th day were broken.
Three main phenotype categories were defined (according Abbot and Yee 1975, Szalay 1989):
- Positive development (PD): Membrane surfaces are made up only from ecto- and endodermal tissues. There are no blood islands formed
- Blastoderm without embryo (BWE): Ectodermal, endodermal and mesodermal tissues are visible as well. Blood islands are formed.
- Dead embryos (D1-9): Embryos died in different developmental stage during the first nine days of incubations.

The aim of our study is to draw conclusions whether there are essential differences between the embryonic death of SPF and normal hatching hen eggs. Based on our results so far, the number of the discarded eggs is almost equal in both categories, with D3-5 phenotype being dominant. In the BWE and D3-5 phenotypes the early embryonic mortality was more remarkable than in other categories. The quantity of D6-9 phenotype is inconsiderable compared to the previous ones.
Keywords: hen, hatchery, SPF (Specified pathogen free), embryonic mortality

Irodalmi áttekintés

Az SPF (Specific Patogene Free – meghatározott kórokozóktól mentes) minőségű tojások rendkívül fontos alapanyagok a gyógyszeripar számára. Ennek ellenére vizsgálatával kevesen foglalkoznak, így csekély számú adat, szakirodalom áll a rendelkezésünkre.

Az Európai Gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VIII.-Ph.Eur.6.6-1) megfogalmazása szerint a vakcinák termelésére, illetve minőségellenőrzésére szolgáló csirkéknek, embrióknak és sejttenyészeteknek – amennyiben ez a követelmény – meghatározott kórokozóktól mentes (SPF) csirkeállományból származó tojásokból kell származniuk. Állománynak a madarak azon csoportját nevezzük, amelynek egyedei ugyanazon környezetben élnek, és saját gondozószemélyzetük van, amely nincs kapcsolatban nem SPF állományokkal. Amennyiben az állományt már kijelölték, nem SPF madarak nem kerülhetnek be az állományba. Minden egyes állományt úgy kell elhelyezni, hogy a fertőződés kockázata a lehető legkisebb legyen.

Annak ellenére, hogy a korai embrionális elhalás általában magas a baromfifajokban (*Coleman,* 1983; *Krueger,* 1990), ennek biológiai alapjai még nem teljesen tisztázottak. Baromfiban az első barázdálódás 6-8 órával a fertilizáció után történik (*Perry,* 1987). Annak köszönhetően, hogy a megtermékenyített petesejteknek az embriók fejlődésének kezdetén az oviductus elülső részéből történő eltávolítása az állat kiirtása nélkül nem lehetséges, a korai embrionális rendellenességek tanulmányozása főként a megtojás utáni időszakra korlátozódik (*Foulkes,* 1990). Így tehát, az embriófejlődés leírása többnyire az őscsík megjelenésétől (csirkében ez az első 6-8 óra inkubáció) kezdődik, ez a jele a gasztruláció megindulásának.
Hamburger és Hamilton (1951) megalkották a normál embrionális fejlődés állomásainak szám szerinti leírását a megtojás után kezdődően csirke embriókra, amely jelenleg a legszélesebb körben használt rendszer. 46 embrionális fázist írtak le, amely három fő szakaszra osztható:
1. Az őscsík megjelenésétől és megnyúlásától a feji redő megjelenéséig (2-6. fázis).
2. A szomiták megjelenésétől és megsokszorozódásuktól az embrió görbült formájának kialakulásáig (7-14. fázis).
3. Az embrionális szervek és extra-embrionális struktúrák kialakulása (15-46 fázis).
Hamburger és Hamilton (1951) az oviductusban lezajló embrionális fejlődés egészét és az inkubáció (postovipozició) első óráját az őscsík megjelenéséig bezárólag nevezte első fázisnak.

A tyúk esetében számos irodalmi adat utal arra, hogy a korai embriófejlődés során jelentős veszteséget (1-12%) okozhatnak a kromoszóma-rendellenességek (*Fechheimer*, 1981; *Szalay et al*., 1988). Ezek az elsősorban számbeli eltérések, mint például a triploidia, haploidia, poliploidia, amelyek a meiózis vagy a termékenyülés során, illetve az embriófejlődés kezdetén lépnek fel és többnyire letálisak (*Mong et al.,* 1974; *Fechheimer és Jaap*, 1980; *Fechheimer*; 1981).

A tyúkembrió keltetés alatti elhalásának kedvező körülmények között is az összes kiesésnek kb. 25%-a (összesen kb 1,5%) a 2., 3. és 4. nap folyamán következik be. Ez tehát az embriófejlődés kritikus szakasza, emiatt bármilyen keltetési hiba ebben a szakaszban sokkal

érzékenyebben érinti az embriót, mint a későbbiekben. Ezek a hibák lehetnek, a keltetés előtti rossz higiéniai és tárolási körülmények, helytelen gázosítás, keltetőgép hőmérsékletének emelkedése, tojások rázkódása vagy elégtelen forgatás.

Célom az SPF tojásokban előforduló korai embrionális rendellenességek vizsgálata, az adatok összehasonlítása a normál (Plymouth / Hampshire) keltetőtojásokban kimutatható rendellenes embriók fenotípusával, továbbá a gyakorlatba átvihető tapasztalatokat, javaslatokat megfogalmazni a keltethetőségre vonatkozóan.

Anyag és módszer

Öt összehasonlító vizsgálatot végeztem a korai embrióelhalás vizsgálatára 9-11 napos tojásokon.

Vizsgálatban részt vevő fajták:

Normál: Hampshire X Plymouth keresztezés, a K+K Farm KFT Becskei telephelyéről.

SPF: Leghorn fajta, a Couvoir de Cerveloup franciaországi telephelyéről.

Kifejlett tojók testtömege: 1,5-2,1kg. Kifejlett kakasok testtömege: 1,9-2,5 kg. Ivarérés 4,5-5 hónaposan. Éves tojástetmelés 230-250 db. Tojáshéj mészfehér színű. Átlagos tojásméret 56-60g.

Embriók vizsgálata:

Minden vizsgálathoz 1050 db tojást lámpáztam meg. Azokat a tojásokat törtem fel, amelyek az 9-11 napon végzett lámpázás során nem mutattak normális embrionális fejlődést. A terméketlennek tűnő tojások tartalmazhatnak olyan embrionális szöveteket, amelyeket nem lehetséges a lámpázáskor kimutatni, csak feltörés után válnak láthatóvá.

A korán elhalt embriók illetve embrionális szövetek éles ollóval történő kimetszése után a mintákat 0,9%-os NaCl oldatba helyeztem a fenotípus meghatározásának idejére, amelyet sztereomikroszkóp (Leica MZ6) segítségével végeztem. A következő fenotípusos kategóriákat alkalmaztam (*Liptói*, (2004) nyomán:

* pozitív fejlődésmenet (positive development - pd): A membránfelületek csak ekto- és endodermális szöveteket tartalmaznak. Vérszigetek nem alakultak ki.
* embrió nélküli blasztoderma (blastoderm without embryo - bwe): Ektodermális, endodermális és mezodermális szöveteket lehet megfigyelni. A vérszigetek kialakultak.
* elhalt embrió (dead embryo - d1-9): Az inkubáció első öt napja során különböző fejlődési stádiumban elhalt embriók.

***1. táblázat*: Vizsgálati minták**

vizsgálat (1)	SPF (db) (2)	normál (db) (3)
1.	82	80
2.	94	74
3.	76	100
4.	85	56
5.	87	78

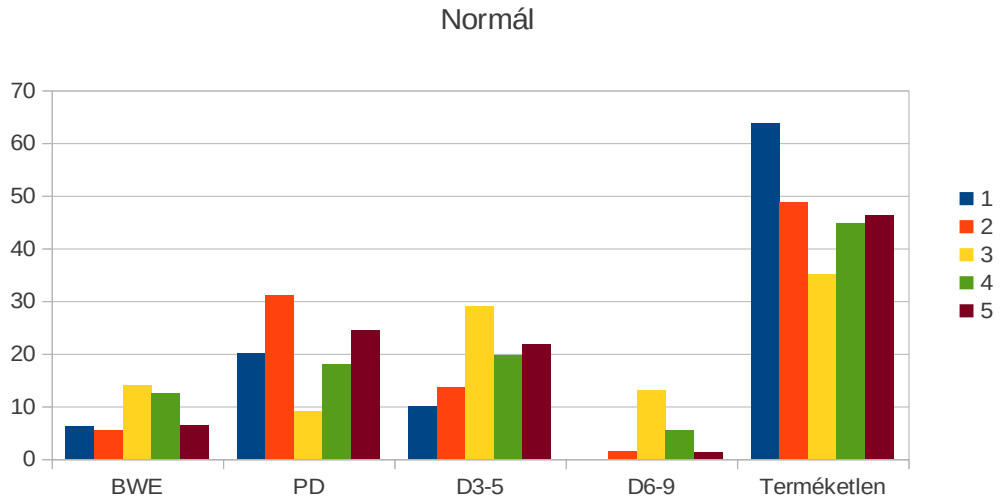
Table 1: Samples

(1) Experiment (2) Specified pathogen free (3) Normal

Normál tojásoknál a Pd fenotípus a leggyakoribb. SPF tojásoknál a D3-5 fenotípus a leggyakoribb .
A terméketlen tojások minden vizsgálatnál a legmagasabb arányt mutatják.

Összesítve a normál tojások esetében az elhalások aránya nagyobb volt, mint a terméketlen tojások aránya, az első vizsgálat kivételével. Az SPF tojásoknál a terméketlenek mennyisége volt domináns, kivéve a 4. vizsgálatot.

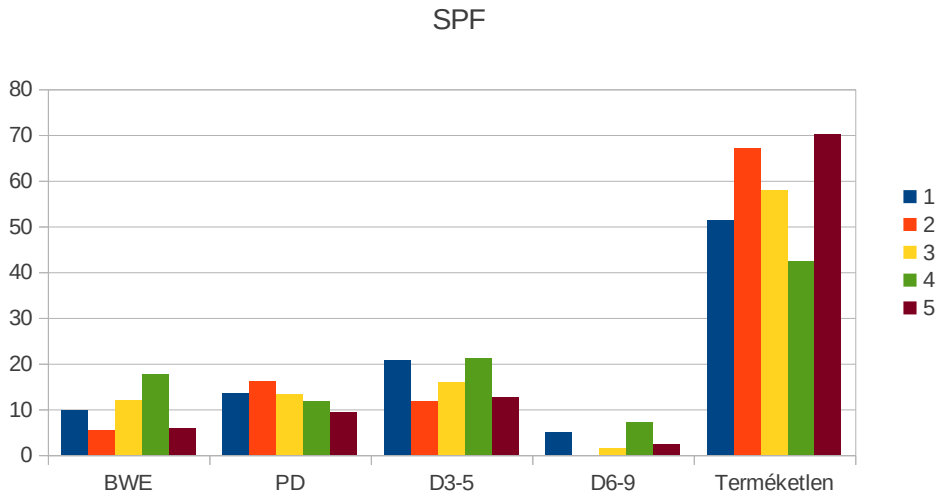
1. *ábra*: A normál csoport eredményei



(1)

Figure 1: Results of the normal group
(1) Infertile

2. *ábra*: Az SPF csoport eredményei



(1)

Figure 2: Results ofthe SPF group
(1) Infertile

Következtetések, javaslatok

Mind a korai embrionális rendellenességek, mind a terméketlenség kialakulása, különféle okokra vezethető vissza. Technológiai, genetikai problémák egyaránt állhatnak a háttérben. A korai embrióelhalás genetikai háttere akkor tanulmányozható objektíven, ha az azt esetlegesen kiváltó technológiai hibákat kiküszöböljük. A tenyészállomány toxinoktól, fertőző anyagoktól mentes, optimális összetételű takarmányozása, megfelelő méretű és almozású tojófészkek kialakítása és a tojások naponta többszöri gyűjtése elengedhetetlen (*Bogenfürst-Ballay* 1990; *Bogenfürst,* 1992). Az állomány fertőzésektől való mentessége meghatározó, mivel például a Mycoplasma sp. és Salmonella sp. rontják a keltethetőséget is (*Bogenfürst*, 1992). A keltetőben gondos tojáskezelés szükséges. A keltetésre alkalmas tojások tisztítása és fertőtlenítése után nem elhanyagolható kérdés a tárolás időtartama, a tárolási hőmérséklet és páratartalom, a tárolás során történő előmelegítés szerepe (*Bogenfürst*, 1989; *Fasenko et al.*, 1992; *Bakst,* 1996; *Bakst-Akuffo,* 1999; *Fasenko et al*., 2001; *Kuurman et al*., 2002).

A terméketlen tojások magas aránya és az embrionális rendellenességek előfordulása az SPF tojásoknál több okból is adódhat. Sajnos nem áll rendelkezésünkre elegendő információ az állomány genetikai hátterével, tartástechnológiájával és takarmányozásával kapcsolatban, valamint az egyes tojók tojástermelésére vonatkozóan, hogy pontos következtetéseket vonjunk le kialakulásukról.

Általánosságban elmondható, hogy hústípusú vonalak esetében mind az embrionális, mind a genetikai problémák előfordulása jóval gyakoribb, mint tojótípus esetén;
Duber és munkatársai (1973) megfigyelték, hogy a hústípusú fajtákban magasabb a kromoszóma- rendellenességek aránya (4,9%), mint a tojótípusú állományokban (2,8%).

Tartás, takarmányozás hibáira is oda kell figyelni. A tenyészállomány toxinoktól, fertőző anyagoktól mentes, optimális összetételű takarmányozása, megfelelő méretű és almozású tojófészkek kialakítása és a tojások naponta többszöri gyűjtése elengedhetetlen (*Bogenfürst-Ballay* 1990; *Bogenfürst*, 1992).

Fertőzések telepen, tárolásnál, keltetés során:
A mikrobiális fertőzések megváltoztatják a tojástartalom kémiai összetételét és akadályozzák a tápanyagok áramlását a fejlődő embrió irányába, így elsősorban a keltetés közepén és végén okoznak nagyarányú embriópusztulást és növelik az elhalt és befulladt tojások arányát (*Harry,* 1957, *North,* 1978).
Szállításkor a rázkódás megnövelheti az iker embriók előfordulását.

BWE, Pd kialakuása:
Savage et al. (1988) beszámoltak egy autoszómális recesszív letalitást okozó génről (blr), amelyet csirkeembriókban vizsgáltak. Ez a keltetés harmadik napja előtt jár embrióelhalással és jellegzetessége, hogy az embrió körül vérgyűrű látható, az érrendszer helyén pedig vérpettyek. Véleményük szerint ennek kiváltó tényezője egy génmutáció lehet.

Korábbi kutatások bizonyították, hogy pedigré keltetés során kiszűrhetők olyan családok, ill. egyedek, amelyek utódai magasabb arányban mutatják a korai embrióelhalást. Amennyiben ezek élő utódait ismételten megvizsgálták, ezek is örökölték ezt a hajlamot. Így annak ellenére, hogy a keltethetőség h2 értéke kicsi, ha ezek az egyedek az állományban maradnak, az embrionális veszteségek aránya, valamint a tojáskiesés megnő és keltethetőség csökken.

- Javaslom az embrióelhalások további vizsgálatát SPF állományoktól származó tojásokon.
- Amennyiben pedigré keltetés során a korai embrióelhalás vizsgálatát, mint szelekciós szempontot figyelembe veszik, kiszűrhetővé válnak azok az egyedek, ill, családok,

amelyek magasabb arányban produkálnak rendellenes embriókat. Így javulhat a keltethetőség.

- Javaslom az embrionális rendellenességek vizsgálatát olyan „normál" állomány esetén, amelyet SPF állományok számára szokásosan kezelt takarmánnyal etetnek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani konzulenseimnek, Dr. Kovács-Weber Máriának és Dr. Liptói Krisztinának, hogy lehetővé tették vizsgálataim elvégzését és segítettek az eredmények feldolgozásában.
Köszönöm a Ceva-Phylaxia Zrt.-nek hogy hozzájárultak az adatok gyűjtéséhez.
Köszönöm Katona Lajosnak a K+K Farm Kft tulajdonosának, hogy támogatott a vizsgálatok lebonyolításában.
A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat, illetve *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú, *„Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen"* című pályázat támogatta."

Irodalomjegyzék

Abbot, U.K., Yee, G.W. (1975): Avian Genetics. In Handbook of Genetics. V.4. R.C.King, Ed. Plenum Publ. Corp. NY. 151-200.

Bakst, M.R. (1996): Impact of egg storage on early embryonic development in turkeys. Turkeys, December: 17-19.

*Bakst, M.R.*és *Akuffo, V.* (1999): Impact of egg storage on embryo development. Proc. of Int. Congress on Bird Reproduction, Tours: 125-131.

Bogenfürst F. (1986): A keltethetőség javításával összefüggő tényezők vizsgálata különös tekintettel a lúd fajra. Kandidátusi értekezés. Kaposvár.

Bogenfürst F. (1994): Keltetés, Gazda kistermelői Lap- és Könyvkiadó vállalt,Budapest

Bogenfürst F. (1989): Long term storage with periodical warming. Proc. of 8th Int. Symp. of Waterfowl. Budapest, 148-150.

Bogenfürst, F. (1992): Lúdtenyésztők kézikönyve. Új Nap Lap- és Könyvkiadó, Budapest.

Bogenfürst, F., Ballay, E. (1990): Effect of fusarium mycotoxins on reproduction of geese. Proc. of VIII. European Poultry Conference, Barcelona. 718-720.

Coleman, M.A. (1983): Extra 25 chicks per hen with "embryo watch". Boiler Industry, May: 32-34.

Fasenko, G.M., Christensen, V.L., Wineland, M.J., Petitte, J.N. (2001): Examining the effects of prestorage incubation of turkey breeder eggs on embryonic development and hatchability of eggs stored for four to forteen days. Poultry Sci. 80: 132-138.

Fasenko, G.M., Robinson, F.E., Hardin, R.T. (1992): Research note: Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl. Poultry Sci. 71: 2129-2132.

Fechheimer, N.S. (1981): Origins of heteroploidy in chicken embryos. Poultry Sci. 60:1365-1371.

Fechheimer, N.S., Jaap, R.G. (1980): Origins of euploid chimerism in embryos of Gallus domesticus. Genetica 52/53:69-72.

Foulkes, A.G. (1990): The unincubated avian blastoderm; its characterization and an investigation of developmental quiscence. Ph.D. Dissertation. Dep. of Biology, Fac. of Science, Univ. of Southampton, UK.

Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. of Morphology 8, 49-92.

Harry, E.G. (1957): Effect on embryonic and chick mortality of yolk contamination with bacteria from the hen. Vet. Record 69: 1433-1439.

Krueger, K.K. (1990): Fertility in female turkeys: How manage it? Page 205-212 in Control of Fertility in Domestic Birds. No. 54. Les Colloques de l'INRA, Nouzilly, France.

Kuurman, W.W., Bailey, B.A., Koops, W.J. és Grossman, M. (2002): Influence of storage days on the distribution for time of embryonic mortality during incubation. Poultry Sci. 81: 1-8.

Liptói Krisztina (2004): A korai embrióelhalás genetikai okainak vizsgálata lúdban,Doktori értekezés, Gödöllő

Mong, S.J., Snyder, M.D., Fechheimer, N.S., Jaap, R.G. (1974): The origin of triploidy in chick (Gallus domesticus) embryos. Can. J. Genet. Cytol. 16:317-322.

North, M.O. (1978): Commercial chicken production manual. 2ed. AVI Publication Co. Inc. Westport. Connecticut

Perry, M.M. (1987): Nuclear events from fertilization to the early cleavage stages in the domestic fowl (Gallus domesticus). J. Anat. 150: 99-109.

Savage, T.F., DeFrank, M.P., Brean S.E. (1988): Blood ring: An early embryonic lethal condition in chicken. J.Hered. 79(2): 124-128.

Szalay, I., Hidas, A., Vas, E. (1988): Rendellenes kariotípusú embriók vizsgálata pecsenyecsirke nagyszülő állományban. Baromfitenyésztés és feldolgozás 35:149-155.

KISTERMETŰ, EGZOTIKUS MACSKAFÉLÉK ÁLLATKERTI TARTÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Tarnavölgyi Csilla

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék, Egzotikus Állat és Vadegészségügyi Osztály
tarnacsilla@gmail.com

Összefoglalás

Az életterük folyamatos csökkenésével a szabadon élő egzotikus macskafélék száma is évről – évre kevesebb, így kihalásuk megelőzésében egyre nagyobb szerepet kapnak a fajvédelmi programok és az ezekben részt vevő állatkertek, vadasparkok. Annak ellenére azonban, hogy a fogságban tartott példányok jelentősen biztonságosabb körülmények között élnek, mint vad társaik, az állatok átlagos élettartama az esetek nagy részében így sem éri el a lehetséges biológiai maximumot. Elhullásuknak számos oka lehet, mind fertőző, mind nem fertőző eredettel.
A Franciaországban található Le Parc des Felins-ben végzett felmérés során a park felépítése, állattartói technológiája, egészségügyi protokolljai mellett a 2006 és 2012 között elpusztult állatok elhullási okait vizsgáltuk.
A vizsgált időszakban 64 kistermetű macskaféle pusztult el. Az elhullási okok között szerepeltek fertőző és nem fertőző eredetű megbetegedések is. Az elhullott állatok között egyaránt előfordultak fiatal és idős egyedek, faji, illetve ivari diszpozíció nem volt tapasztalható.
Kulcsszavak: macskafélék, állatkert, tartástechnológia, mortalitás

Keeping technology of small wild felids in zoo

Abstract

The amount of wild cats is reduced yearly since their territory is continually being reduced, so racial preservation programs are playing increasing role to prevent extinction of those animals. But despite of the fact that living conditions of wild cats, kept in parks, zoo-parks are safer and healthy compared to those living in the wild, their life is usually shorter, than expected. It can be explained in several ways, sourcing from infectious, or non-infectious diseases.
The analysis about the park's structure, animal keeping technology, medical protocols and the causes of mortality in small wild exotic cats have been conducted in France, at Le Parc des Félins between 2006 and 2012.
During this period 64 small wild exotic cats died. There was infectious and non-infectious originated mortality too. Young and old animals died as well, and there wasn't tendency about species or breeds involved.
Keywords: felides, zoo, keeping technology, mortality

Irodalmi áttekintés

A macskafélék családjába tartozó 36 vadon élő fajból 7 a nagymacskafélék csoportjába, a további 29 faj a kistermetű macskafélékhez tartozik. Számos fajuk, széles körű elterjedtségük ellenére az emberek többsége ezen fajok közül csak egy-kettőt ismer, míg a nagymacskák közül világszerte közel minden fajt ismernek az emberek (*Sanderson és Watson,* 2011).

Világszerte elterjedtek, Ausztrália és az Antarktisz kivételével minden kontinensen és kisebb, nagyobb szigeteken fellelhetők. Élőhelyük igen változatos, akár igen szélsőséges körülmények között, mint például sivatagi, vagy éppen magas hegyvidéki tájon is megélnek, bár a többségük erdei ökoszisztémában lelhető fel (*Macdonald és Loveridge,* 2010).

Széles körű elterjedtségükből is adódóan ezen fajokra igen nagy változatosság jellemző. Legkisebb képviselőik a rozsdafoltos macskák (*Prionailurus rubiginosus*) felnőtt egyedei is csak ~1 kg-os súlyt érnek el, míg a legnagyobb méretet elérő ködfoltos párducok (*Neofelis nebulosa*) kifejlett egyedei 11-22 kg-ot is nyomhatnak (*Macdonald és Loveridge,* 2010 *Sanderson és Watson* 2011).

Az emberi terjeszkedés által életterük rohamosan csökken. Napjainkra a Természetvédelmi Világszövetség vörös listáján 7 faj a sebezhető, 4 faj a veszélyeztetett és 1 faj a súlyosan veszélyeztetett kategóriába lett besorolva. Éppen ezért, igen fontos, hogy megfelelő figyelmet fordítsunk a fogságban tartott példányokra.

Állatkerti tartásuk jelentősen megváltozott életkörülményeket nyújt részükre, ami miatt az állatok jóllétének biztosítása fontos szerepet játszik a stressz kialakulásának megelőzésében (*Shepherdson, Carlstead, Mellen, Seidensticker,* 1993).

A krónikus stressz kialakulása vitathatatlan következménye az állatok nem kielégítő tartástechnológiájának (*Mcphee és Carlstead,* 2010). Számukra potenciális stresszor lehet többek között a korlátozott mozgás, a menedék hiánya, a szokatlan táplálék, a váratlan környezeti változások, a zsúfoltság. Éppen ezért szükséges ismerni az egyes fajok igényeit és toleranciájuk mértékét. Az ismétlődő, vagy hosszú távú stresszor hatásnak egészségügyi következménye lehet például az immunszuppresszió, a csökkent reprodukciós funkciók, szervi atrophiák vagy viselkedészavarok kialakulása (*Mcphee és Carlstead,* 2010).

Az ideális tartástechnológiának fontos eleme az állatok takarmányozása is. A táplálékbevitel komplex folyamatában az érzékszervek mellett számos élettani folyamat is részt vesz. Az éhség, és a táplálék érzékelése mellett a táplálék elfogadásában számos tényező játszik közre az állatoknál: szín, szag, forma, etetés ideje, prezentáció módja, etetés gyakorisága és mennyisége (*Shepherdson, Carlstead, Mellen, Seidensticker,* 1993). „Egyesek azt gondolják, hogy a fogságban tartott állatok takarmányozására vonatkozó tudásunk teljes a vadállatok állatkertekben való tartásának hosszú története miatt. Ennek ellenére a fogságban tartott állatok közel 25%-a pusztul el takarmányozási problémák miatt és 60-70%-uk a rossz menedzsment és gazdálkodás eredményeképpen” (*Robbins,* 1983).

Anyag és módszer

A vizsgálataimat Franciaországban, Párizstól 52 km-re DK-re, Nesles-ben található, 2006-ban megnyitott Le Parc des Félins-ben végeztem. 70 hektárnyi területéből 35 hektár az egzotikus macskafélék tartására szolgál. Fás és nyílt területtel egyaránt rendelkeznek, így az állatok elhelyezésénél maximálisan figyelembe tudták venni azok igényeit. A kistermetű macskafélék 29 fajából 19 megtalálható a Le Parc des Félins-ben.

A hiúzok, az ocelotok és a ködfoltos párdúcok kivételével a macskákat ivar szerint elkülönítve, sokszor egyedi elhelyezést adó, tágas kifutóban helyezték el. A fajok egy részénél a kifutók az erdős, fás részeken kerültek kialakításra, ahol elegendő búvóhely is rendelkezésükre állt. A közepes illetve kistestű állatok minden nap kapnak táplálékot, mivel anyagcseréjük is gyorsabb és a vadonban is minden nap zsákmányhoz jutnak, kistestű prédáikból akár naponta többet is elkapnak. Etetésük nyúllal, fürjjel, tyúkkal, hallal, naposcsibével vagy szeletelt marhahússal történik. Az etetések alkalmával az állatok mindig kapnak vitamin és ásványi anyag kiegészítőt. Az állatok eledeleit a kifutó több pontján helyezik el a gondozók. Az ivóvizeket minden nap frissre cserélik.

Az állatok évente háromszor kapnak féreghajtó tablettákat, melyeket porítva az eledelre/-be szórva vesznek fel. Az állatokat évi rendszerességgel vakcinázzák veszettség, FPV, FCV, FHV-1, FLV és Chlamydia ellen. A parkban született kölyköket először két hónapos korukban oltják be, melyet 1 hónappal később egy ismétlő oltás követ, majd az állatok minden évben ismétlő oltásokat kapnak. A kölyköket azonosító chippel is ellátja az állatorvos.

Az állatok tartásáról és etetéséről az adatok az intézményigazgató helyettese által rendelkezésre bocsátott technológiai leírásokból származnak, továbbá az állatok gondozása során is aktív adatgyűjtést folytattam.

Az állategészségügyi adatokkal kapcsolatos információk az állatkertet ellátó állatorvos elektronikus vagy kézzel vezetett nyilvántartásaiból illetve a vele folytatott munka során gyűjtött megfigyelésekből származnak. A dokumentációk információt adtak az elhullás okáról, az elhullott állat koráról, neméről és az elhullás idejéről. Az adatok táblázatok formájában számos szempont alapján rendszerezésre kerültek (fajok, elhullás oka, kor stb.).

Eredmények és értékelésük

2006 és 2012 között összesen 64 állat pusztult el (*1. ábra*). A vizsgált időszak alatt egy évesnél fiatalabb korban 25, ezen belül újszülött korban 7, egy hónapnál fiatalabb korban 4, 1-6 hónapos korban 9, 6-12 hónapos kor között pedig 5 állat pusztult el. 4 fiatal pusztult el súlyos traumás hatás következtében, melyet az esetek döntő többségében az idősebb egyedek okoztak. Az újszülöttek számára elsősorban az el nem különített hímek jelentenek veszélyt, de arra is volt precedens, hogy a nőstény ölte meg és ette meg kölykeit.

A kölyköknél előforduló másik gyakori elhullási ok a kiszáradás és a kórosan gyenge tápláltsági állapot, mely több állat elhullását eredményezte. Ezeknél az eseteknél nem mindig volt eldönthető, hogy a háttérben az anyaállatok kölyköket elutasító magatartása állt-e, vagy a nem megfelelő tejtermelés. Előbbi a fiatalabb, és így tapasztalatlanabb nőstényekre, utóbbi az idősebb anyákra volt jellemző.

A 39 felnőtt állatból fertőző eredetű megbetegedésben 12 állat pusztult el, amelyek közül 4 légzőszervi megbetegedésben (pneumonia), 4 elhalásos bélgyulladásban és egyéb enteritisben és 4 fertőző hashártyagyulladásban (FIP) szenvedett. Feline herpespesvirus-1 által okozott fertőző rhinotracheitis kifejezetten ragályos betegség, melyre minden korban fogékonyak az állatok, de fiatal illetve idős állatokban súlyosabb elváltozást okoz. Ebben a betegségben egy 10 éves ázsiai vadmacska és egy 9 hónapos európai vadmacska pusztult el. Utóbbi állatnál hajlamosító körülmény lehetett a szállítási stressz is, az állat ugyanis elhullása előtt 9 nappal érkezett a parkba. Az emésztőkészülék megbetegedésében Coronavirus okozta fertőző peritonitis állt a háttérben.

***1. ábra*: Az egyes kistermetű macskafélék 6 év alatt megfigyelt mortalitási adatai fajonkénti megoszlásban**

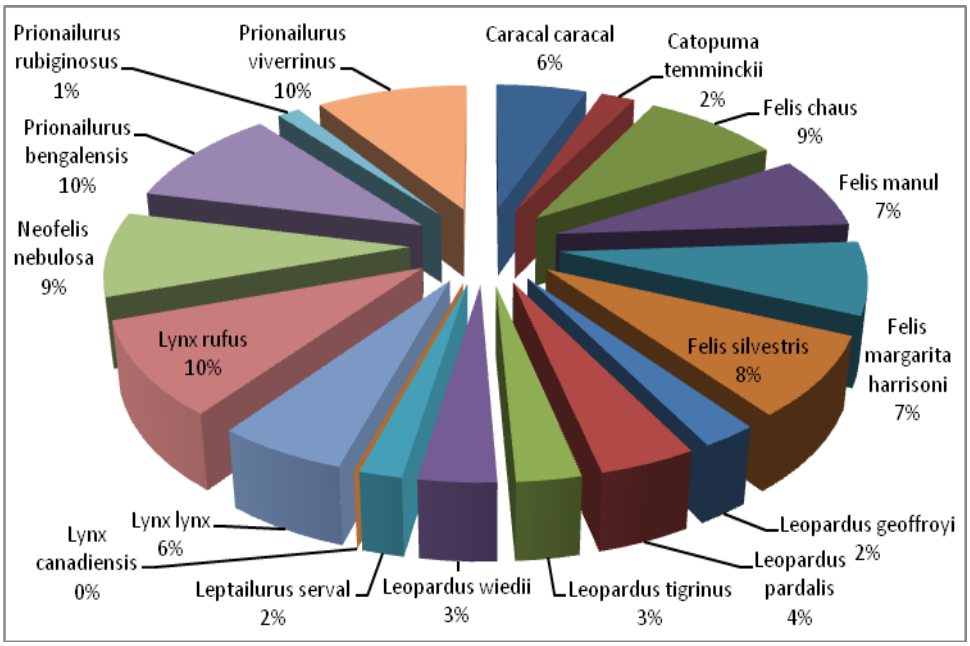


Figure 1: Mortality rates of certain small size feline breeds (in percantage) during the 6 years

Bakteriális eredetű megbetegedésben elhullott macskákban kruppos pneumoniát diagnosztizáltak jobbára, de néhányban következményes septicaemia is előfordult.

2006-2012 között 27 állat pusztult el nem fertőző megbetegedésben. Az elhullási okok között szerepel többek között súlyos mechanikai sérülés, krónikus veseelégtelenség (chronicus interstitialis nephritis) és daganatos megbetegedés is.

A vizsgálatban több olyan állat is volt, amelyiknél csak az elhullás tényét rögzítették, de az elhullás okát nem sikerült megállapítani, így azok az elemzésben sem szerepelnek.

Irodalomjegyzék

Macdonald, D. W., Loveridge, A. J. (2010): Biology and Conservation of Wild Felids. New York: Oxford University Press 1-762.

Mcphee, M.E., Carlstead, K. (2010): The Importance of Maintaining Natural Behaviors in Captive Mammals. In: *Kleiman, D.G., Thompson, K.V., Baer, C.K.*: Wild mammals in captivity. Chicago, University of Chicago Press 303-313.

Robbins, C. T. (1983): Wildlife Feeding and Nutrition. New York 1-170.

Sanderson, J.G., Watson, P. (2011): Small wild cats. Baltimore: The Johns Hopkins University Press 5-144.

Shepherdson, D. J., Carlstead, C., Mellen, J. D., Seidensticker, J. C. (1993): The influence of food presentation on the behavior of small cats in confined environments. Zoo Biol.12. 203–216.

A MAGYAR HERPETOLÓGIA TÖRTÉNETE

Tóth Tamás

Fővárosi Állat és Növény Kert, 1146 Budapest, Állatkerti Krt. 6-12.
truffoi@gmail.com

Összefoglalás

A hazai herpetológia első nagy művelője *Földi János* (1755-1801) orvos, aki nem kutató természettudós, hanem inkább természettudományokkal foglalkozó író volt.
Kitaibel Pál (1757-1817) nevéhez fűződik a pannongyík (*Ablepharus kitaibelli*) megtalálása, amely hazánk egyik kiemelten védett hüllőfaja.
Frivaldszky Imre (199-1670) hüllőkkel is foglalkozó széles érdeklődésű kutatója volt a Magyar Nemzeti Múzeum Természettudományi Osztályának.
Gerenday József (1814-1862) a Füvészkert egykori igazgatója 1839-ben adta ki az első magyar nyelvű, herpetológiai témájú munkát „Magyar's dalmátországi kígyók", amiben részletesen mutatja be az akkor ismert fajokat és morfológiájukat.
Károli János (1842-1882) a Magyar Nemzeti Múzeum munkatársaként a „Magyarország Amphibiái" és a „Magyarország kígyóinak átnézete" munkákat adta ki a kezéből a témában.
Id. Entz Géza (1842-1919) orvosként, az Akadémia tagjaként összesen 200 tudományos közleményt publikált, melyből csak néhány foglalkozik a herpetológiával. Ezek közül a legfontosabb az 1888-ban megjelent „Adalékok Erdély herpetológiájához" című munka.
Méhely Lajos (1862-1953) a Budapesti Műegyetem elvégzése után 1885-1896 között a brassói főreáliskol tanára lett, ahol megírja első nagyobb herpetológiai témájú műveit. 1896-1915 között a Nemzeti Múzeum Állattani Osztályán dolgozik, majd a Pázmány Péter Tudomány Egyetem Állattani Tanszékén tanít. 1899 és 1931 között a Magyar Tudományos Akadémia tagja. A herpetológiai tanulmányain kívül még több más, a zoológia egyéb területein is megjelentek írásai.
Bolkay István (1887-1930) a Pázmány Péter Tudományegyetemen szerzett doktori címet. 1919-től élete végéig a Bosznia-Hercegovina Tudományi Múzeumban tevékenykedett, ahol az összesen megjelent 108 közleményéből 60-t ír meg.
Fejérváry Géza Gyula (1894-1932) már 15 éves korában publikál a herpetológia tárgyköréből a Rhone völgyének herpetológia viszonyairól. Egyetemi tanulmányait követően a Magyar Nemzeti Múzeum lesz munkahelye kisebb megszakításokkal, majd 1930-ban a Pécsi Egyetemen nyilvános rendkívüli tanári kinevezést kap. Fejérváry filogenetikával, evolúciós kutatásokkal, származástannal foglalkozó, filozófus beállítottságú tudósa a kornak.
Lángh Aranka Mária (1898-1988) a Budapesti Pázmány Péter Egyetemen tanul. Később Magyar Nemzeti Múzeum munkatársa lesz, majd feleségül megy Fejérváry Gézához. 1919-ben doktorál, aminek főtárgya a palentológia volt. 1956-ban Svájcba, majd végleg Venezuelába költözik és telepszik le.
Vasvári Miklós (1898-1945) ornitológusként tevékenykedett, bár ami miatt itt szólunk róla az doktori disszertációja, amelynek címe „Adatok a zöldgyík formakör ismeretéhez (1926)". Az ornitológiai kutatásai, tevékenysége mellett mindig jutott hely a hüllőknek is, így Kis-Ázsiából a gazdag ornitológiai anyag mellett herpetológiai gyűjteményt is bővítette.
Klobisitzky Dénes (1900-1974) orvos, de foglalkozott herpetológiával is. Így egyik fő munkája többek között a *Bothrops*-fajok mérgének a vizsgálata volt.

Szabó István (1913-2000) banktisztviselőként kezdte életét, ám eközben a botanika iránt érdeklődött, majd a háború után, 1947-től kétéltűekkel és hüllőkkel is foglalkozott. Később a Természettudományi Múzeumhoz kerül, ahol létrehozza a parazitológiai gyűjteményt.
Marián Miklós (1914-2011) tanárként kezdi a pályáját, 1951-től a Kaposvári Múzeum munkatársa lett, majd később a Szegedi Móra Ferenc Múzeumnál helyezkedett el. A II. világháború utáni időszak egyik legkiemelkedőbb terepherpetológusa, aki több jelentős tájegységünk herpetofaunáját tanulmányozta és tárta fel.
Janisch Miklós (1922-2002) az egykori Állatorvos-tudományi Egyetem, majd jogutódjának a munkatársa volt. Herpetológiával, elsősorban mérgeskígyókkal foglalkozott, de vadászkörökben is ismert volt a neve.
Dely Olivér György (1927-2003) muzeológusként és herpetológusként vált ismertté. 1951-től a Magyar Természettudományi Múzeum Állattárában dolgozott, ahol a herpetológiai gyűjtemény munkatársa volt. A munkásságát 83 tudományos közlemény, szerkesztőbizottsági tagság, herpetológiai konferencia megszervezése fémjelzi.
Kulcsszavak: magyar herpetológia története, herpetológia nagy alakjai

History of Hungarian herpetology

Abstract

This review paper is introducing the famous herpetologist in Hungary: János Földi (1755-1801), Pál Kitaibel (1757-1817), Imre Frivaldszky (1799-1870), József Gerenday (1814-1862), János Károli (1842-1882), Géza Entz (1842-1919), Lajos Méhely (1962-1953), István Bolkay (1887-1930), Gyula Géza Fejérváry (1894-1932), Mária Aranka Lángh (1898-1988), Miklós Vasvári (1898-1945), Dénes Klobusitzky (1900-1974), István Szabó (1913-2000), Miklós Marián (1914-2011), Miklós Janisch (1922-2002) and György Olivér Dely (1927-2003) and their work.
Keywords: Hungarian herpetology, history, influental persons

Irodalmi áttekintés

Bár a „Systema Naturae” megjelenése előtt is számos zoológiával és ezekben a munkákban érintőlegesen a herpetológiával is foglakozó mű [pl. Apáczai Csere János (1653): Magyar Encyclopedia; Miskolczi Gáspár (1702): Egy jeles vadkert; stb.] jelent meg Magyarországon, de ezekben még keveredtek a valódi megfigyelések a vallásos tanokkal és babonás hiedelmekkel. A magyar herpetológia első hazai művelője **Földi János** (1755-1801) hajdúhadházi orvos volt, akinek halála évében Pozsonyban jelent meg az a zoológiai témájú könyve („Természeti História. A Linné Systémája szerént. Első tsomó. Az állatok országa”), amelynek már herpetológiai vonatkozásai is voltak. Azonban a szerző nem kutató természettudós volt, hanem természettudományokkal foglalkozó író, akinek fentebb említett munkája nagyrészt Blumenbach (1799) „Handbuch der Naturgeschichte” című könyvének fordítása, amit a szerző különböző megjegyzésekkel egészített ki.

Tudománytörténet szempontból megemlítendő a kiváló magyar botanikus és természettudós, **Kitaibel Pál** (1757-1817) is, aki 1797-ben begyűjtött egy kis gyíkot, amely még

ma is az ő nevét viseli. Az említett kis hüllő a pannongyík (*Ablepharus kitaibelii*), amely hazánk egyik kiemelten védett természeti értéke.

A széles érdeklődésű, hüllőkkel is foglalkozó **Frivaldszky Imre** (1799-1870) a Magyar Nemzeti Múzeum Természettudományi Osztályának kutatója volt, aki saját pénzéből különböző gyűjteményeket vásárolt, egy Zoológiai Múzeum létrehozásának céljából. Legfontosabb herpetológiai műve a „Monographia Serpentum Hungariae", amely 1823-ban jelent meg Pesten.

Gerenday József (1814-1862) orvos és a Füvészkert egykori igazgatója 1839-ben jelentette meg az első magyar nyelvű herpetológiai munkát „Magyar 's dalmátországi kígyók" címmel, amelyben részletesen kitárgyalja az egyes fajokat, ismerteti anatómiájukat, élettanukat, hasznukat, előfordulásukat, sőt beszámol a mérgeskígyók mérgének hatásairól, a marások tüneteiről, valamint ezek kezeléséről is.

Ugyanitt kell említést tenni **Károli Jánosról** (1842-1882), a Magyar Nemzeti Múzeum néhai munkatársáról, aki 1878-ban megírta a „Magyarország Amphibiái", illetve 1879-ben a „Magyarország kígyóinak átnézete" című munkáit.

Id. Entz Géza (1842-1919) a XIX. század második felének és a XX. század elejének kiváló zoológusa, akinek szinte az egész családja kötődik a magyar tudományossághoz. Entz Géza a kiegyezés évében szerzett Pesten orvosi diplomát és már 1873-tól a kolozsvári egyetem tanáraként látjuk működni. Innen előbb a pesti Műegyetem állattani tanszékére hívták, majd 1901-ben a Tudományegyetem állattani tanszékére kapott kinevezést. 1883-tól az Akadémia tagja, de 1909-ben már az akadémia igazgatótanácsába is beválasztják. 1910-től a Természettudományi Társulat elnöke. Ő fordítja le magyarra Darwin „Fajok eredete" című munkát is, illetve összesen majd 200 tudományos közleménye jelenik meg. Ezekből csak néhány foglalkozik herpetológiával, amelyekből a legfontosabb az „Adalékok Erdély herpetológiájához" (1888) című munkája.

A XIX.-XX. század fordulóján, az országra jellemző általános felemelkedése idején lépett színre minden idők három legnagyobb magyar herpetológusa, Méhely Lajos, Bolkay István és báró Fejérváry Géza Gyula.

Közülük is a legkiemelkedőbb, de egyben legellentmondásosabb egyéniség **Méhely Lajos** (1862-1953), aki Kisfalud-Szögiben (ma Bodrogszegi) született. A Budapesti Műegyetem elvégzése után, korábbi tanárának, Kriesch Jánosnak asszisztenseként dolgozott, majd 1885 és 1896 között a brassói főreáliskola tanára lett. Itt születnek első nagy herpetológiai művei. Jellemző Méhely tehetségére, hogy több munkáját is gyönyörű, saját készítésű festményeivel illusztrálta, amelyeknek a legtöbbje élethű ábrázolásával a mai kor igényeinek is tökéletesen megfelel. 1896-tól 1915-ig a Nemzeti Múzeum Állattani Osztályának munkatársa, illetve az utolsó három évben már az Állattár igazgatója. Innentől kezdve egészen az 1932-es nyugdíjba vonulásáig a Pázmány Péter Tudományegyetem Állattani Tanszékén tanít általános zoológiát és összehasonlító anatómiát. 1899 és 1931 között a Magyar Tudományos Akadémia tagja. Az I. világháború után beállt a fajbiológusok közé, s tudományos munkásságát feladva egyre inkább ennek a téveszmének szentelte életét, amiért a II. világháború után börtönbe zárták, majd a Mosonyi úti rabkórházban halt meg 91 éves korában (*Dely* 1967). A sors furcsa fintora, hogy két herpetológiai főműve, a „Fajkép és fajbélyeg", amely a gyíkok származásával és törzsfejlődésével foglakozik, illetve a „Herpetologia Hungarica" című munkái máig kiadatlanok maradtak. Ez utóbbi közel 700 oldalas kéziratával Méhely 1896-ban elnyerte az Akadémia Bésán-díját is. Méhely hihetetlen szakmai tudását számos, a herpetológián kívül eső tárgykörben írt dolgozata is jelzi, amelyek a zoológia szinte minden területét érintik: „Adatok a Barczaság rovarvilágának ismeretéhez" (1889), „Magyarország denevéreinek monographiája" (1900), „A gerinczesek zsigervázának elsődleges elemeiről" (1906), „A földikutyák fajai származás és

rendszertani tekintetben" (1909), „Magyarország csíkos egerei" (1913), „Magyarország harmad- és negyedkori gyökeresfogú poczkai, különös tekintettel a fajformálódás tényezőire és időszakaira" (1914), „A Planáriák elterjedése a Magas-Tátrában és a Kőszegi-hegységben" (1918), „A rákok ősveséje" (1931), „Adatok az ecsetcsápú rákok anatómiájához" (1933), „Az ősméhek természetrajza" (1935). Ezen kívül ő fordította és rendezte sajtó alá a híres „Brehm" első magyar nyelvű köteteit is (*Korsós* 2003A). Legjelentősebb herpetológiai munkái a következők: „A magyar fauna Bombinatorjai (*B. igneus* és *B. pachypus*)" (1892), „Hazánk egy új Tritonja: *Tr.* (*Molge*) *montandoni*" (1892), A „Barczaság herpetológiai viszonyai" (1892), „Die Kreuzotter (*Vipera berus* L.) in Ungarn" (1893), „Magyarország barna békái (*Rana fuscae* Hungariae)" (1894), „Beiträge zur Herpetologie Transkaukasiens und Armeniens" (1894), „Magyarország kurta kígyói (*Vipera berus* és *Vipera ursinii*)" (1897), „Adatok az Új-Guineai szűkszájú békák (*Engystomatidae*) ismeretéhez" (1901), „A származástan mai állása" (1905), „Archeo- és Neolacerták" (1907), „A hazai viperákról" (1912).

A századforduló másik jelentős magyar herpetológusa, a tragikus sorsú, rimaszombati születésű **Bolkay István** (1887-1930), aki egyetemi tanulmányait a Pázmány Péter Tudományegyetemen végezte, és itt szerezett doktori címet is. Ezután néhány évig Méhely mellett dolgozik fizetés nélküli gyakornokként a Magyar Természettudományi Múzeum Herpetológiai Gyűjteményében. Az öreg tanár mély benyomást tett a fiatal kutatóra, ám ennek ellenére az idős professzor tekintélyelvű és ellentmondást nem tűrő vezetési módszerei, valamint Bolkay igazságkereső beállítottsága szakításhoz vezet kettőjük között. A fiatal herpetológusnak távoznia kell a Múzeumból, majd néhány éves hányódás után az I. világháborúban katonai szolgálat teljesítése közben találjuk Szerbiában és az orosz fronton. 1919-től haláláig a Bosznia-Hercegovinai Tartományi Múzeumban kap állást, ahol a gerinces gyűjtemény vezetője lesz. Ebben az utolsó időszakban fejti ki a legaktívabb tudományos tevékenységét, hiszen az összesen megjelent 108 publikációjából több mint 60 a boszniai tartózkodása alatt íródott. Az egész szarajevói múzeumra jellemző anyagi gondok azonban Bolkayt sem kerülik el. Előfordul az is, hogy anyagiak hiányában a cikkeit neki magának kell a nyomdában kiszednie ahhoz, hogy azok egyáltalán megjelenhessenek. Ízig-vérig magyarnak vallotta magát, és bár már több mint 10 éve élt Boszniában, mégis megtartotta magyar állampolgárságát. Végül azonban 1930-ban állampolgárságának elvesztése, valamint anyagi gondjai és az ebből adódó magánéleti válság felőrölte Bolkay lelkét és aznap este, amikor letette esküjét a Jugoszláv Királyságra, öngyilkosságot követett el dolgozószobájában. Főbb művei: „Adatok Gömör-Kishont vármegye herpetológiájához" (1907), „A magyarországi békák lárvái" (1909), „Adatok Magyarország pannoniai és praeglaciális herpetológiájához" (1913), „On the Phylogenetical Series *Vipera gedulyi* By. – *Vipera ammodytes* L. – *Vipera meridionalis* Blgr." (1920), „A list of the Amphibians and Reptiles, preserved in the Bosnian-Hercegovinian Land-Museum, with morphological, biological and zoogeographical Notes" (1924), „Die Amphibien und Reptilien von Sarajevo und Umgebung" (1929), „With an Appendix on the probable Origin of the Anurous Batrachians and a Sketch of their Naturae system" (1933) (FEJÉRVÁRY 1930).

A kor harmadik nagy alakja báró **Fejérváry Géza Gyula** (1894-1932), aki a Méhely-féle iskola egyik legismertebb képviselője. Egyetemi tanulmányait Budapesten végzi, ahol zoológiát és egy rövid ideig orvostudományt hallgat. 15 éves korában jelenik meg az első publikációja, amely Rhône völgyének herpetofaunisztikai viszonyait tárgyalja, német nyelven és több mint 40 oldalnyi terjedelemben. 1913-tól a Magyar Nemzeti Múzeumban dolgozik, majd rövid ideig a Pesti Egyetemen találjuk. 1916-ban visszatér a múzeumhoz, majd egy évvel később ő lesz a herpetológiai gyűjtemény vezetője. A Columbia Egyetemen már 1920-ban instruktori állást ajánlanak neki, majd néhány évvel később a Kalkuttai Egyetem kínál számára katedrát. Ő

azonban egyik meghívást sem fogadja el, és Magyarországon marad. 1930-ban a Pécsi Egyetemen nyilvános rendkívüli tanári kinevezést kap. Fejérváry meggyőződéses lamarckista, az élet és a biológia nagy problémáival foglalkozó oknyomozó, filozofikus beállítottságú tudós. Foglalkozik a filogenetika, az evolúció, a származástan, a zoogeográfia és a bionómia különböző kérdéseivel. Nagy elismerést hoz számára a fosszilis varánuszokról írt két monográfiája is, habár a második rész megjelenését már nem érte meg. Mindezek mellet a máltai kormány megbízásából tanulmányozza a sziget herpetológiai és paleoherpetológiai viszonyait is. Számos külföldi tudományos társaság tagja, az Állattani Közlemények szerkesztője. Sikerei csúcsára ér, amikor egy epehólyag műtét következtében fellépő komplikációkban váratlanul meghal. Néhány félbemaradt művét felesége fejezi be és adja ki a rendelkezésre álló jegyzetek alapján.
Főbb munkái: „Adatok a *Rana Méhelyi* By. ismeretéhez" (1915), „Fosszilis békák a püspökfürdői praeglaciális rétegekből különös tekintettel az Anurák sacrumának phyletikai fejlődésére" (1917), „Contributions to a monography on fossil *Varanidae* and on *Megalanidae*" (1918), „Bionomiai megfigyelések a barlangi gőtéről (*Proteus anguinus* Laur.). Különös tekintettel a Dollo-féle törvényre" (1919), „On the occurence of *Vipera berus* L. in the country of Zala S. Hungary" (1923), „On the Batrachians and Reptiles collected by Mr. E. Csiki in the Northern Parts of Central Albania in Servia" (1923), „Further Contributions to a Monograph of the *Megalanidae* and fossil *Varanidae* – with notes on recent Varanians" (1935) (DELY 1998; PONGRÁCZ 1932, VERSLUYS 1932).

Fejérváryné, szül. **Lángh Aranka Mária** (1898-1988) tanulmányait a Budapesti Pázmány Péter Egyetemen végzi a Bölcsésztudományi Karon. Itt ismerkedik meg férjével, aki asszisztensként dolgozik az egyetemen. Lángh Aranka 1916-ban kerül a Magyar Nemzeti Múzeumhoz, fizetés nélküli asszisztensként. 1917-ben ment férjhez Fejérváry Gézához, majd 1919-ben doktorált – főtárgyként paleontológiából. 1923-ban jelent meg főműve, amely a fosszilis Ophisauriákról szól. Egy évvel később a múzeumnál nagyobb elbocsátás történik, amelynek kapcsán önként lemondott állásáról és önkéntesként folytatja a munkát. Férje 1932-ben történt váratlan halála után ismét a múzeum tényleges szolgálatába lép és a herpetológiai gyűjtemény vezetője lesz. Ekkor rendezi sajtó alá Fejérváry 5 befejezetlen munkáját a rendelkezésre álló jegyzetek alapján. 1945-ben a lakását bombatámadás éri és mindene elpusztul. Ettől kezdve kénytelen a Múzeumban lakni. 1956-ban a zaklatások, és kilátástalanság elől kivándorol a lányához Svájcba, majd Venezuelában telepedik le, és itt is hal meg 90 éves korában. Főbb herpetológiai művei: „A békák csökevényes bordáiról" (1918), „Einige Bemerkungen über die Variation von *Molge cristata*" (1923), „Beiträge zu einer Monographie der fossilen Ophisaurier" (1923), „Beiträge und Berichtigungen zum Reptilien-Teil des ungarischen Faunenkataloges" (1943), „Adatok Erdély herpetológiájához" (1944).

Vasvári Miklós (1898-1945) nevét, aki bár ornitológus volt, főleg doktori disszertációjának témája miatt illő e helyütt megemlíteni, amelynek az „Adatok a zöldgyík formakör ismeretéhez" (1926) címet adta. Ebben írja le a zöld gyík egy új alfaját, a *Lacerta viridis fejérváryi*-t (ma *Lacerta bilineata fejérváry*). Pályájának kezdetén mind Méhely, mind Fejérváry támogatja a fiatal kutatót, és igyekeznek a herpetológia irányába terelni érdeklődését, amelynek köszönhetően 1923-ban ő fedezte fel Délnyugat-Magyarországon a keresztesviperát (*Vipera berus*), illetve annak fekete színváltozatát. Később azonban sajnos teljesen felhagyott herpetológiai munkásságával, hiszen a Madártani Intézet kutatójaként számos, a tudására féltékeny ornitológustársától kapta meg azt a kritikát, hogy nem is ornitológus, hiszen a disszertációját is herpetológiai témából írta. Kétszer is megjárja Kis-Ázsiát, ahonnan elsősorban gazdag ornitológiai, de jelentős herpetológiai anyagot is hoz magával, amelynek nagy része sajnos elpusztult a II. világháború viharaiban. Nemzetközi elismertsége és nagy szakmai tudása

ellenére a megpróbáltatások egész életén át elkísérték, és végül meg kellett érnie azt is, hogy származása miatt kitiltják szeretett munkahelyéről, a Madártani Intézetből is. A legrosszabb azonban még hátra volt: elviszik munkaszolgálatra, de gyenge fizikuma miatt kondíciója teljesen leromlik, és életének az SS golyói vetnek véget (KEVE 1944).

Fejérváry-né mellet a másik Dél-Amerikához kötődő kutatónk **Klobusitzky Dénes** (1900-1974), aki tulajdonképpen nem is herpetológus, hanem orvos. Egyetemi tanulmányait a Budapesti és a Pécsi Orvosi Egyetemen végzi. Azonban munkásságának 3 fő területéből az egyik a dél-amerikai kígyók és főleg a *Bothrops*-fajok mérgének vizsgálatát öleli fel. Még egyetemi hallgató, amikor már önkéntesként dolgozik az Állatorvosi Főiskola Természettudományi, valamint Fiziológiai Intézetében is, és már ebben az időben munkáival több díjat nyer. 1926-ban Pécsen doktorál, majd több ízben kap hosszabb-rövidebb időre munkát Németországban és Ausztriában. 1930-ban kapja meg a privát docensi kinevezését a Pécsi Egyetem Orvosi karán. Nem sokkal ezután, Sao Paulo állam kormánya meghívja a világhírű Butantan Intézetbe, egy fizikakémiai és biokémiai kutató részleget megszervezése és vezetése céljából. Ettől kezdve egy rövid időszak kivételével Dél-Amerikában, és főképp Brazíliában él. Az 50-es évektől már Sao Paulo állam egyetemén tanít (az anyanyelvén kívül összesen 5 nyelven beszél) egészen 1964-ig, a nyugalomba vonulásáig. 1952-ben kapja meg a brazil állampolgárságot, és tagja lesz a Brazil Orvosi Akadémiának is. Főbb herpetológiát is érintő művei: „Biochemische Studien über die Gifte der Schlangengattung *Bothrops*. I.-VI." (1935-1938), „Immunologische Eigenschaften der Schlangengifte" (1941), „Giftschlangen und Schlangengifte" (1960) (*Dely* 1975).

A közelebbi múlt herpetológusai közül meg kell emlékeznünk **Szabó István** (1913-2000) munkásságáról, akinek életútja nem a szokásos kutatói életpálya. Kezdetben banktisztviselőként szabadidejében botanikával foglalkozik, de a második világháború bombázásaiban porig ég lakása, és benne értékes herbáriuma valamint könyvei is. Két év szovjet hadifogság után, 1947-ben kerül haza, és ekkor kezd el foglalkozni a kétéltűekkel és hüllőkkel. Főképp a Pilis, a Visegrádi-hegység és a Börzsöny herpetofaunáját kutatja. Később a Természettudományi Múzeumhoz kerül, ahol létrehozza a parazitológiai gyűjteményt. Összesen majd 30 ismeretterjesztő és tudományos herpetológiai publikációt írt, melyek a hazai herpetofauna kutatása mellett, természetvédelmi kérdésekkel is foglalkoznak (*Matskási* 1993).

A kor másik jelentős kutatója a szegedi születésű **Marián Miklós** (1914-2011), aki a gimnázium elvégzése után 1937-ben szerzett tanári diplomát. Majd másfél évtizedes tanári pályafutása után 1951-ben lett a Kaposvári Múzeum külső munkatársa, majd 3 évvel később ugyanitt már főállású szakmuzeológusként dolgozik. Doktori disszertációját 1959-ben írja meg a Baláta-tó állatvilágáról. Évtizedeken át, a II. világháború utáni korszak egyetlen igazi terepherpetológusa, aki feldolgozza a Belső-Somogy, a Barcsi Ősborókás, a Zselic, a Bakony, a Fehér-tó, a Kunfehér-tó, a Dél-alföld, a Fenyőfői Ősfenyves, a Soproni-hegység, valamint a Tisza majdnem teljes hazai szakaszának herpetofaunáját. Összesen több mint 230 tudományos és ismeretterjesztő dolgozata látott napvilágot, a zoológia és botanika különböző területeiről, amelyből közel 50 munka foglakozik a kétéltűek és hüllők világával (*Ábrahám* et al. 1998, *Tóth* 2004).

Janisch Miklós (1922-2002) az egykori Állatorvos-tudományi Egyetem (ma Szent István Egyetem) Állattani és Parazitológiai tanszékének munkatársa volt, de közismert volt herpetológiai érdeklődése is, hiszen kicsiny dolgozószobáját számtalan mérgeskígyóval osztotta meg. Nemcsak az egyetlen hivatalos „állami mérgeskígyó szakértő", de neves vadász is. Elsősorban a hazai viperákkal foglalkozott, és senki nem ismerte nála jobban a ma már kihalóban lévő rákosi vipera (*Vipera ursinii rakosiensis*) egykori és jelenlegi lelőhelyeit. Mind

herpetológusként, mind vadászként bejárta Kanadát és Tanzániát is. Herpetológiai munkái közül három, a rákosi viperáról írt dolgozata emelkedik ki (Korsós 2002).

Dely Olivér György (1927-2003) muzeológusként és herpetológusként vált ismertté. Erdélyben született, de 1946-ban már Magyarországon érettségizett és itt szerzett diplomát is. 1951-től nyugdíjba vonulásáig a Magyar Természettudományi Múzeum Állatárában, a herpetológiai gyűjtemény munkatársaként dolgozik, 1956-ig Fejérváryné vezetése alatt. 1956-ban a herpetológiai gyűjtemény szinte teljesen elpusztult és Dely Olivérre várt a feladat, hogy átvegye a gyűjtemény vezetését és újrateremtse azt. Kutatóként és gyűjtőként megjárta Egyiptomot, Algériát és Észak-Koreát is. Algériai útján súlyos balesetet szenved, amikor egy véletlen puskalövés a combját éri, és amely sérülés egy életen át elkísérte. Ő szervezi meg az 1981-ben Budapesten rendezett herpetológiai konferenciát, de tiszteletbeli elnöke 10 évvel később a Societas Europaea Herpetologica (SEH) konferenciájának is. Összesen 83 tudományos publikációja jelent meg, amelybe beletartoznak a hazai herpetofauna első részletes feldolgozását adó „faunafüzetek" is. Szerkesztője a „Vertebrata Hungarica" című tudományos folyóiratnak, de a magyar herpetofauna feldolgozásán túl számos távoli vidék kétéltű- és hüllőcsoportjáról is nagy átfogó munkákat tesz közzé. Több tanulmányában feldolgozza Méhely, Bolkay Fejérváry, Fejérváryné és Klobusitzky életét, de számos paleontológiai cikket is ír. Főbb művei a következők: „Examen du Triton alpestre (*Triturus alpestris* Laurenti) spécialement en vue des populations de la Hongrie et des Carpathes" (1959), „Examen Biométrique, Ethologique et Oecologique du Triton alpestre (*Triturus alpestris* Laurenti) des Populations du Bassin des Carpathes" (1960), „Contribution a l'étude systématique, zoogéographique et génétique de *Rana arvalis arvalis* et *Rana arvalis wolterstorffi*" (1964), „Kétéltűek – Amphibia. – Magyarország Állatvilága" (1967), „Schildkrötenreste (*Emys orbicularis* L.) aus Awaren- und Longobarden-Gräbern" (1965), „Adatok a kárpát-medencei törékeny gyík (*Anguis fragilis* Linnaeus) rendszertanához és elterjedéséhez" (1972), „Hüllők – Reptilia. – Magyarország Állatvilága" (1978), „Analyse der morphologischen Eigentümlichkeiten drei mongolischer *Eremias*-Arten" (1979), „Weitere Beiträge zur Kenntnis des *Vipera ursinii*-Formenkreises" (1984) (KORSÓS 2003B).

A kétéltűek és hüllők kutatásának folytonossága azonban a közelmúltban eltávozott herpetológusokkal nem szakadt meg, hiszen napjainkban már egy új szakembergárda irányítja a herpetológiai kutatásokat, akik ez elődökhöz hűen számos szép hazai és nemzetközi sikert könyvelhettek el. Azonban az ő megítélésük és ismertetésük majd egy későbbi kor feladata lesz.

Irodalomjegyzék

Ábrahám L., Juhász M., Nagy L. (1998): Dr. Marián Miklós a Somogy megyei természettudományi muzeológia megteremtője. – Som. Múz. Közl. 13: 305-313

Boros, I. & Dely, O. Gy. (1967): Einige Vertreter der ungarischen Zoologie an der Wende des 19.-20. Jahrhunderts und die wissenschaftshistorische Bedeutung ihrer Tätigkeit. I. Ludwig MÉHELY (1862-1952). – Vert. Hung. 9: 65-166

Boros, I. & Dely, O. Gy. (1968): Einige Vertreter der ungarischen Zoologie an der Wende des 19.-20. Jahrhunderts und die wissenschaftshistorische Bedeutung ihrer Tätigkeit. II. Géza Gyula FEJÉRVÁRY (1894-1932). – Vert. Hung. 10: 43-140

Boros, I. & Dely, O. Gy. (1969): Einige Vertreter der ungarischen Zoologie an der Wende des 19.-20. Jahrhunderts und die wissenschaftshistorische Bedeutung ihrer Tätigkeit. III. István (Stephan) BOLKAY (1887-1930). – Vert. Hung. 11: 33-126.

Dely O. Gy. (1975): Erinnerung an Prof. Dr. D. Klobusitzky (1900-1974). – Vert. Hun. 16: 3-5
Dely O. Gy. (1998): In commemoration of Mrs. Baron Géza Fejérváry, Dr. Aranka Mária Lángh (1898-1988). – Misc. Zool. Hung. 12: 121-126
Fejérváry G. Gy. (1930): Bolkay István nekrológja. – Állatt. Közl. 27 (3-4): 208-211
Keve A. (1944): Dr. Vasvári Miklós 1898-1945. – Aquila, 51/52: 45-51
Korsós Z. (2002): A magyar herpetológia "fenegyereke". Janisch Miklós (1922-2002). – Terrárium 4 (6): 12-14
Korsós Z. (2003a): Ötven éve hunyt el Méhely Lajos, a magyar herpetológia legnagyobb alakja. – Terrárium 5 (3): 14-15
Korsós Z. (2003b): In memoriam Dr. Olivér György Dely (1927-2003). – Bull. Soc. Herp. Fr. 107: 55-58
Matskási I. (1993): Szabó István 80 éves. – Parasit. Hung. 26: 59-66
Pongrácz S. (1932): Dr. báró Fejérváry Géza 1894-1932. – Állatt. Közl. 29: 199-204
Tóth T. (2004): Dr. Marián Miklós 90. születésnapjára. – Terrárium 6 (2): 37-38
Versluys, J. (1932): Baron Géza Gyula Imre Fejérváry von Komlós-Keresztes. – Verhandl. Zool.-Bot. Ges. 82. 29-33.

FENNTARTHATÓ AKVAKULTÚRA AZ EGÉSZSÉGES TÁPLÁLKOZÁSÉRT ÉS AZ EGÉSZSÉGES KÖRNYEZETÉRT

Váradi László

Magyar Akvakultúra Szövetség
5540 Szarvas, Anna-liget 8.
varadil@akvapark.hu

Összefoglalás

A világ népessége növekedésének és az egészséges táplálkozás fontossága egyre nagyobb felismerésének következtében a hal iránti igény folyamatosan növekszik. A természetes vízi fogások tovább nem növelhetők elsősorban a tengerek túlhalászottsága miatt, így a haligényt egyre nagyobb mértékben az akvakultúrnak kell kielégíteni. Az akvakultúra fejlesztése során alapvető szempontok az erőforrások fenntartható hasznosítása, a természeti értékek megőrzése, az élelmiszerbiztonság és az állatvédelem. Bár az európai halellátásban a tengeri fajok a meghatározóak, a hazákban meghatározóz édesvízi akvakultúra fontos szerepet játszik kisebb régiók friss, egészséges hallal történő ellátásában, a foglalkoztatás biztosításában, és a tógazdaságok révén a természeti értékek megőrzésében. Az utóbbi évek kutatási-fejlesztési programjainak eredményeképpen különböző környezetbarát és víztakarékos akvakultúra rendszerek és technológiák állnak rendelkezésre. Az édesvízi akvakultúrában a termelés negatív környezeti hatásokkal nem járó bővítésére jó lehetőséget kínálnak a recirkulációs akvakultúra rendszerek, illetve az új típusú tavi haltermelő rendszerek. Ez utóbbiak közül kiemelhető a kombinált intenzív-haltermelő rendszer, az „Integrált Multi Trofikus Akvakultúra, IMTA" rendszer, illetve a turisztikai és ökológiai szolgáltatásokat is biztosító multi-funkcionális tógazdálkodás. Magyarország európai viszonylatban is élenjár az új típusú tógazdasági rendszerek és technológiák fejlesztésében. Az Európai Tengerügyi és Halászati Alap (ETHA) nyújtotta lehetőségek jó kihasználásával elérhető a hazai haltermelés minőségi fejlesztése, amelynek fontos elemei a recirkulációs rendszerek és az új típusú tavi haltermelő rendszerek minél szélesebb körű alkalmazása. A rendszerek és technológiák fejlesztése azonban együtt kell, hogy járjon a halfeldolgozás és marketing fejlesztésével. A halellátás fejlesztése során fontos a termékválaszték bővítése, olyan termékek előállítása, amelyek magas minőségét, élelmiszerbiztonságát és környezetbarát termelési módját minősítés igazolja.
Kulcsszavak: fenntartható akvakultúra, akvakultúra rendszerek, halfeldolgozás, halellátás.

Sustainable aquaculture for healthy nutrition and healthy environment

Abstract

The need for fish is increasing continuously due to the growing population of the world and the increasing recognition of the importance of healthy nutrition. The catches from natural waters cannot be further increased mainly due to the overexploitation of the seas, thus the growing demand for fish should be met more and more by aquaculture. Basic criteria during the development of aquaculture are the sustainable use of resources, the conservation of the nature, food safety and animal welfare. Although marine species play major role in European fish supply, freshwater aquaculture is an important contributor to the supply of smaller regions with fresh fish, to employment and to nature conservation through the operation of traditional pond fish farms. As a result of R&D activities in the past years, various environment friendly and water efficient aquaculture systems and technologies are available. In freshwater aquaculture new opportunities are offered for the expansion of production without negative environmental impact by recirculating aquaculture systems (RAS) and new types of fish pond systems. In the later category the combined intensive-extensive (CIE) aquaculture system, the Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) and the multi-functional pond aquaculture may have high importance in the future. Hungary is a leading country in the development of new types of fish pond systems. The quality development of aquaculture in Hungary can be achieved by the efficient use of the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF), of which the wider application of RAS and new types of fish pond systems are important elements. The development of systems and technologies should be coupled with the development of processing and marketing. In the development of fish supply, the product diversification, the production of certified high quality and safe products that are produced in an environmentally friendly way have great importance.

Keywords: sustainable aquaculture, aquaculture systems, fish processing, fish supply

A SÓTARTALOM HATÁSA FÜSTÖLT HALFILÉK MINŐSÉGI TULAJDONSÁGAIRA

Varga Dániel, Kovács Alexandra

Kaposvári Egyetem, Agrár- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Halgazdálkodási Tanszék
7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.
varga.daniel@ke.hu

Összefoglalás

Kísérletünkben különböző sókoncentrációval (6, 9 és 12 %) pácolt, majd füstölt ponty (*Cyprinus carpio*), és busa (*Hypophthalmichthys molitrix)* filé minőségi tulajdonságait vizsgáltuk. A halak konyhatechnikai feldolgozása után, pácoláson, majd füstölésen estek át. Ezután vizsgáltuk a termék minőségi paramétereit úgymint: pácolási és füstölési veszteség; pH; szárazanyagtartalom; nedvességtartó képesség és vízaktivitás.
A kísérlet eredményeként az eltérő csoportok közt a pácolási veszteség és a vízaktivitás tekintetében volt szignifikáns különbség egyik faj esetében sem. A pác sótartalma és a vizsgált tulajdonságok közti kapcsolat a pácolási veszteség, a pH és a vízaktivitás esetében volt statisztikailag igazolható.
A termék szélesebb körű jellemzéséhez a jövőben célszerű a sótartalom és a zsírtartalom mérése, illetve organoleptikus vizsgálat elvégzése is.
Kulcsszavak: sótartalom, füstölt halfilé, termékminőség

Effect of salt content on the quality parameters of smoked fish fillets

Abstract

The aim of our study was to analyse the quality parameters of brined (6, 9 and 12%) and subsequently smoked fillets of common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix)*. Fishes were filleted, brined and smoked. Quality parameters (brining and smoking loss, pH, dry matter content, liquid holding capacity and water activity) of smoked fillets were analyzed.
Significant differences were found between groups in brining loss and water activity in each species. Relationship between salt concentration and some parameters, such as brining loss, pH and water activity were significant, also.
It is indispensable to analyse the salt and fat content of the fillets and carry out an organoleptic analysis in further studies for a better charachterisation of the product.
Keywords: salt content, smoked fish fillet, product quality

Bevezetés

Magyarország halfogyasztása jelentősen elmarad az Európai Unió (EU 25) többi tagállamához képest. A fogyasztás mértéke 4,4 kg/fő/év körül alakul, míg az Uniós átlag 22,7 kg/fő/év (*Szűcs és Tikász*, 2008). Az étkezési és gasztronómiai szokásaink is elég egysíkúak és szegényesek a halételek tekintetében. A fő fogyasztási halunk a ponty, mely elsősorban élve kerül a piacra. A korábbi pontycentrikus fogyasztási szokás jelentősen eltolódott a busa, az afrikai harcsa és a pisztráng irányába. Az élőhal iránti kereslet is csökkent. A tíz éve regisztrált 55%-os részaránya mára 40%-ra zsugorodott. Az itthon előállított halnak jelentős vetélytársai az olcsó gyorsfagyasztott tengeri halak, melyek a magyar piacon versenyképesebbek az élő, édesvízi halakkal szemben. Az import halakkal szemben a hazánkban termelt halak a versenyt csak félkész- és késztermékek formájában tudják felvenni. Ilyen termékek a gyorsfagyasztott filék és szeletek, illetve különböző pástétomok, pácolt és füstölt áruk. A pácolás és füstölés jelentős értéknövekedést jelent a termék számára mind anyagi, mind minőségi szempontból. Egyrészt megfelelő szaktudással a fültölt halhús prémium kategórás termékké is válhat. Másrészt a füstölés alkalmas arra, hogy a kisebb minőségi hibákat (iszap íz, nem megfelelő vágási technológia) elfedje (*Roth és mtsai*, 2009).

A füstölt halnak a nyers halhoz hasonlóan magas a táplálkozás-élettani értéke: alacsony a zsírtartalma, könnyen emészthető fehérjeforrás és kiváló a zsírsavösszetétele is (*Stolyhwo és mtsai*. 2006). Azonban nem megfelelő feldolgozás mellett jelentős minőségi problémák is felléphetnek a füstölt hal tekintetében (*Nakamura és mtsai*. 2004).

Kísérletünkben két halfajt vizsgáltunk: elsőként a pontyot (*Cyprinus carpio*), mert bár csökken iránta a kereslet, még mindig a legnagyobb mértékben fogyasztott halfaj Magyarországon. Másodsorban a fehér busát (*Hypothalmithys molitrix*), olcsó és nagy tömegű előállíthatósága miatt és mert fogyasztása élettani szempontból előnyös az izomzatában található többszörösen telítetlen zsírsavak miatt.

A kísérlet célja eltérő koncentrációjú sóoldattal pácolt és füstölt ponty és busa filék előállítása és különböző minőségi paraméterek vizsgálata úgymint: előállítás soráni súlyvesztés, szárazanyagtartalom, pH, víztartó képesség és eltarthatóság (vízaktivitás).

Anyag és módszer

A kísérlet során ponty (*Cyprinus carpio* L.) és fehér busa (*Hypophthalmichthys motiltrix*) fajokat vizsgáltunk, melyek jól beillenek a Magyarországi halfogyasztási szokásokba. A feldogozásra szánt állatok átlagsúlya a ponty esetében 1100 g, a busánál pedig 1800 g volt.
A halakat a konyhatechnikai eljárásoknak megfelelően megtisztítottuk és feldolgoztuk. A filé leválasztása után megmértük annak súlyát és pH értékét (Testo 205 pH mérő), majd 12 óra időtartamra nedves pácba helyeztük őket. A kísérletben három féle töménységű (6, 9, 12%) konyhasóoldatot használtunk pácként mindkét fajnál. Páclevenként és fajonként 15 darab filét vontunk be a vizsgálatba ($N_{összes}$=90). A pácolás során a konyhasón kívül semmilyen más fűszert vagy anyagot nem alkalmaztunk.

A pácolás után a fileket újból megmértük. A füstölést Bastra 850 klimatizált, füstgenerátorral felszerelt érlelőkamrában (Bayha&Strackbein GmbH, Arnsberg, Németország) végeztük. A pácolt halfilék acélrácsra helyezve kerültek a kamrába.

A füstölés 40 és 55 ºC között történt 4 óra időtartamig. A füstölés után a filék egy napig pihentek, súlyukat megmértük, majd elvégeztük rajtuk a vizsgálatokat. A pH-t a nyers mintához hasonlóan Testo 205 pH mérővel mértük. A szárazanyag meghatározást mintánként három

ismétlésben végeztük, szárítószekrényben 105 °C-on súlyállandóságig szárítottuk, és a bemért nyers mintatömeg százalékában kerül megadásra..

A folyadéktartó képességet *Gómez-Guillén és mtsai* (2000) módszere alapján határoztuk meg. Ez alapján 15 g mintát (S) és megmért tömegű szűrőpapírt (V_1) tettünk centrifugacsőbe, majd 500 G-n 10 percig cenrifugáltuk. Centrifugálás után a szűrőpapírt újra megmértük (V_2), majd 50 ºC-on súlyállandóságig szárítottuk és ismét megmértük (V_3). A kapott adatokból számítottuk a veszteségi értékeket:

Folyadékvesztés: $100 \times (V_1 - V_2) \times S^{-1}$

Vízvesztés: $100 \times (V_2 - V_3) \times S^{-1}$

Zsírvesztés: $100 \times (V_3 - V_1) \times S^{-1}$

A veszteségértékeket a a nyers minta százalékában adtam meg.

A füstölt halfilék vízaktivitását Hygropalm AW1 mérőműszerrel, AW-DIO (Rotronic AG, Bassersdorf, Németország) kiegészítő egységgel végeztük.

A filéket a folyamat során több alkalommal mértük, az így kapott adatokból került kiszámításra a pácolás és a füstölés során fellépő veszteség. A veszteség értékeket minden esetben a nyers mintatömeghez viszonyítva adtuk meg.

Az alapadatokat SPSS 10 for Windows (1999) szoftverrel értékeltük. Varianciaanalízist (ANOVA, *post hoc* Tukey) alkalmaztunk a sótartalom minőségi paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatánál. A pác sótartalom és a minőségi tulajdonságok közti összefüggés leírására Pearson korrelációt alkalmaztunk.

Eredmények és értékelésük

Pácolási és füstölési veszteség

A feldolgozás során fellépő súlyváltozásokat az *1. táblázat* szemlélteti.

1. táblázat: **Eltérő sótartalommal pácolt busa-, és pontyfilék minőségi tulajdonságai**

	Busa (1)			Ponty (2)		
	6 (%)	9 (%)	12 (%)	6 (%)	9 (%)	12 (%)
	átlag ± szórás (3)	átlag ± szórás	átlag ± szórás	átlag ± szórás	átlag ± szórás	átlag ± szórás
Pácolási veszteség (%) (4)	$0,5 \pm 0,2^{a}$	$1,8 \pm 0,7^{b}$	$2,2 \pm 0,8^{b}$	$2,4 \pm 1,2^{a}$	$3,1 \pm 0,9^{a}$	$4,8 \pm 1,1^{b}$
Füstölési veszteség (%) (5)	$19,2 \pm 2,6^{a}$	$23,7 \pm 8,7^{a}$	$24,0 \pm 9,4^{a}$	$33,1 \pm 2,2^{a}$	$29,4 \pm 4,2^{b}$	$31,7 \pm 2,6^{ab}$
pH	$5,9 \pm 0,2^{a}$	$6,1 \pm 0,2^{b}$	$6,2 \pm 0,1^{b}$	$6,0 \pm 0,2^{a}$	$6,1 \pm 0,1^{a}$	$6,2 \pm 0,1^{a}$
Szárazanyagtartalom (%) (6)	$63,4 \pm 6,7^{a}$	$65,1 \pm 3,3^{a}$	$66,4 \pm 3,2^{a}$	$64,2 \pm 4,9^{a}$	$65,9 \pm 7,7^{a}$	$68,0 \pm 5,0^{a}$
Folyadékvesztés (%) (7)	$9,3 \pm 2,2^{a}$	$8,6 \pm 2,2^{a}$	$7,3 \pm 1,7^{a}$	$9,4 \pm 3,5^{a}$	$9,0 \pm 4,0^{a}$	$8,67 \pm 2,0^{a}$
Vízvesztés (%) (8)	$8,1 \pm 1,9^{a}$	$7,2 \pm 1,7^{a}$	$6,4 \pm 1,4^{a}$	$6,9 \pm 3,0^{a}$	$6,2 \pm 1,7^{a}$	$5,9 \pm 2,6^{a}$
Zsírvesztés (%) (9)	$1,2 \pm 0,9^{a}$	$1,4 \pm 1,4^{a}$	$0,9 \pm 0,5^{a}$	$2,5 \pm 1,2^{a}$	$3,2 \pm 3,2^{a}$	$2,0 \pm 1,3^{a}$
Vízaktivitás (10)	$0,8 \pm 0,1^{a}$	$0,78 \pm 0,1^{b}$	$0,75 \pm 0,1^{c}$	$0,83 \pm 0,1^{a}$	$0,80 \pm 0,0^{b}$	$0,77 \pm 0,1^{c}$

A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek (P<0,05)

Table 1: Quality parameters of smoked fish fillets brined different salt content

silver carp (1), common carp (2), mean±standard deviation (3), brining loss (4), smoking loss (5), dry matter content (6), liquid loss (7), water loss (8), fat loss (9), water activity (10)

Means bearing different small superscript letters are significantly different (P<0.05).

A pácolás során a sóoldat és a halfilé közti sűrűségkülönbség hatására diffúzió jön létre. *Szathmári és mtsai*. (2007) szerint ilyenkor a pácoldat sótartalma diffundál a halhúsba, és akár 11-13% súlygyarapodás is megfigyelhető. Kísérlet során ilyen jelenség nem volt tapasztalható, a pácolás során minden csoport veszített a súlyából, egyenes arányban a pácoldat töménységével. Ebből arra lehet következtetni, hogy a bár a só beívódik a halhúsba, a tömény oldat a diffundált só súlyánál nagyobb mennyiségű vizet von ki a halszeletből.

Megfigyelhető, hogy a ponty esetében jóval nagyobb a pácolási veszteség mértéke, mely a ponty alacsony víztartó képességére vezethető vissza (*Varga és mtsai*, 2010). *Hassan* (1988) 15%-os pácolásnál hasonló eredményt kapott vízvesztést illetően ponty esetében.

A nyers minta típusa, a feldolgozás módszere, a pácolás töménysége és időtartama és a füstölés paraméterei (hőmérséklet, nedvesség, szárítás) azok a fő összetevők, melyek meghatározzák a füstölés során fellépő súlyváltozást (*Rora és mtsai*, 1998).

A zsírtartalom összefüggésben van a veszteséggel, hiszen a feldolgozás során a halhús elsősorban vizet veszít, illetve a halakban (és minden élőlényben) a zsírtartalom és a víztartalom negatív korrelációban áll egymással. Ezért a magasabb zsírtartalmú egyedek pácolás és füstölés során kevesebb nedvességet veszítenek. Kísérletünk során a zsírtartalmat nem mértük, de a szárazanyagot igen. A szárazanyagból óvatos becsléssel következtethetünk a zsírtartalom és a vízvesztés kölcsönhatására, mivel a szárazanyag jelentősen összefügg a zsírtartalommal.

Mindkét fajt tekintve a pác sótartalma és a pácolási veszteség közti összefüggés nagyon erősnek bizonyult (*2. táblázat*), vagyis a sótartalom növekedésével a filék több vizet veszítettek a pácolás során. A pác töménységének a füstölés során fellépő veszteségre már nincs kimutatható hatása (*2. táblázat*).

2. táblázat: **A pác sótartalma és a minőségi tulajdonságok közti összefüggések**

	Busa (1)		**Ponty (2)**	
	r	**P**	**r**	**P**
pH	**0,49**	**0,007**	**0,38**	**0,04**
Vízaktivitás (3)	**-0,85**	**0,00**	**-0,86**	**0,00**
Szárazanyagtartalom (%) (4)	0,09	Ns	0,26	NS
Pácolási veszteség (%) (5)	**0,75**	**0,00**	**0,69**	**0,00**
Füstölési veszteség (%) (6)	0,26	NS	0,18	NS
Folyadékvesztés (%) (7)	0,39	NS	-0,05	NS
Vízvesztés (%) (8)	-0,4	NS	0,08	NS
Zsírvesztés (%) (9)	-0,85	NS	-0,08	NS

Table 2: Relationship between the salt content of brine and the quality parameters
silver carp (1), common carp (2), water activity (3), dry matter content (4), brining loss (5), smoking loss (6), liquid loss (7), water loss (8), fat loss (9)

pH

A halfilék átlag pH értéke a vágást követő 45. percben mérve a pontynál 6,4, a busánál pedig 6,3 volt. Az *1. táblázaton* látható, hogy a füstölés befejeztével minden esetben csökkent a halhús pH-ja. Bár látható különbség a csoportok között a pH értéket tekintve, statisztikailag nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni közöttük. A feldolgozás során fellépő pH csökkenés

két okra vezethető vissza. Az egyik folyamat az izom-hús átalakulás teljes végbemenetelének következménye, mely során az izom-glikogén tejsavvá alakul. Ez a csökkenés kismértékű (általában 0,1-0,2 érték), és halhúsban található kisebb mennyiségű glikogénnek tudható be.

A további pH változás a pácolás folyamán fellépő sótartalom változásnak köszönhető. Az izomfehérjék izoelektomos pontjának alaptartománya (pH> 5) kationok (Na^+) fehérjékhez kötődésével növekszik, anionok kötődésével (Cl^-) viszont csökken (*Hamm,* 1960). Az amino csoportok hasadása Cl^- által növeli a savas tulajdonságokat a karboxil csoportban, összefüggésben a pH csökkenésével (*Hassan*, 1988). Így a kísérletünkben is megfigyelhető, ahogy a sótartalom összefügg a pH értékkel. Pearson korrelációt alkalmazva szignifikáns kapcsolat mutatható ki a két változó között a ponty és a busa esetében is (*2. táblázat*).

Mindezek mellett a füstölés során különböző füst-savak abszorbeálódnak a húsba, illetve fenolok és polifenolok lépnek reakcióba az amino csoportokkal (*Krylova és mtsai*., 1962; *Hassan*, 1988), ami további enhye mértékű eltolódást eredményez savas irányban.

Szárazanyagtartalom

A füstölt halfilék szárazanyagtartalma csoportonként eltérő, de szignifikáns különbség nem mutatható ki közöttük (*1. táblázat*). A pác sókoncentrációjának növekedésével a szárazanyag tartalom emelkedése figyelhető meg mindkét fajnál. Ez annak tudható be, hogy a pácolás során a sósabb oldat több vizet vont ki a filékből.

Füstölt busa és ponty szárazanyag-tartalmát *Szathmári és Molnár* (2007) vizsgálta. Kísérletükben, három időpontban (március, június és november) lehalászott halak kétféle (hideg és forró) füstölési eljárással elkészített filéit vizsgálták. Szezonális változást tapasztaltak a szárazanyag tartalomban, mely a halak szezonális zsírtartalom-változásának köszönhető. A hidegen és forrón füstölt filék közt is találtak különbséget a szárazanyagtartalmat illetően. A forrón füstölt halhús minden tekintetben több szárazanyagot tartalmazott. Saját kísérletünkben ezeknél jóval magasabb értékek tapasztalhatóak (*1. táblázat*).

Folyadéktartó képesség

A kapott eredményekben a csoportok között egyik fajnál sem sikerült statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni (*1. táblázat*), illetve a pác sótartalma és a kapott értékek közt nem találtunk szoros kapcsolatot (*2. táblázat*).

Az azonban leolvasható, hogy a sótartalom növekedésével a folyadékvesztés csökken. Ez két okból lehetséges. Egyik, hogy a magasabb sótartalmú pácolás több vizet vont ki a halhúsból, így annak nedvességtartalma eleve kisebb, így kevesebb is tud távozni a centrifugálás során. Ez kevésbé valószínű, mivel a csoportok szárazanyagtartalma közt nem volt szignifikáns különbség és a sótartalom sem befolyásolta számottevően (*1.* és *2. táblázat*), illetve a szárazanyagtartalom és a folyadékvesztés közti kapcsolat Pearson-korrelációval vizsgálva igencsak gyengének bizonyult.

A második és egyben valószínűbb ok, hogy a töményebb oldatban pácolt fileknek magasabb a sótartalma, ami több vizet köt meg és így kevesebb nedvesség távozik indukció hatására.

A füstölt filék folyadék- és ezen belül a vízvesztése is mindkét fajnál lineárisan csökken a pác töménységének növekedésével. A zsírvesztés azonban mindkét fajnál a 9%-os pácolásnál érte el maximális értéket (*1. táblázat*), vagyis a 9%-os oldatban pácolt filék vesztették a legtöbb zsírt a centrifugálás során.

Vízaktivitás

A halfilék vízaktivitás értékeinél a csoportok közt szignifikáns különbséget sikerült kimutatni (*1. táblázat*), illetve erős kapcsolatot a pác sótartalmával összefüggésben (*2. táblázat*). A sótartalom és a vízaktivitás közti kapcsolat mindkét fajnál erős negatív korrelációként jelenik meg. Vagyis a pác sótartalmának emelkedésével a vízaktivitás értéke csökken. A nagyobb sótartalmú pác több vizet vont el a filéből, így annak eltarthatósága növekedett.

A filék vízaktivitás értékeiből kitűnik, hogy a mikrobák nagy része nem tud szaporodni a termékben, főleg a töményebb sóval pácolt filék esetében, kivéve a szárazság és sótűrő, illetve sókedvelő gomba- és baktérium fajokat.

Érdekes még, hogy az azonos töménységgel pácolt csoportoknál a ponty esetében mindig magasabb a vízaktivitás értéke. Ennek oka lehet, hogy a ponty húsának magasabb a víztartalma, mint a busáé, így a pácolás után is több nedvességet tartalmaz.

Következtetések

A vizsgálatok eredményeiből általánosan levonható következtetés, hogy a pác sótartalma hatással van a füstölt ponty és busafilé némely minőségi tulajdonságaira. Ezek a pácolási veszteség, a pH és a vízaktivitás. A 12%-os sótartalmú pác bizonyult a legsikeresebbnek eltarthatóság szempontjából.

Az elvégzett vizsgálatok koránt sem tekinthetők teljes körűnek. A továbbiakban mindenképp célszerű elvégezni a füstölt filék só- és zsírtartalmának mérését, melyek eredményei tovább bővítenék a vizsgált változók körét, így több összefüggést lehetne leírni a minőségi tulajdonságok között.

Ezek mellett elengedhetetlen még egy panel teszt vizsgálat, mely elvégzésével különbséget lehetne tenni az eltérő koncentrációval pácolt filék organoleptikus tulajdonságai között.

Irodalomjegyzék

Hassan, I.M. (1988): Processing of smoked common carp fish and its relation to some chemical, physical and organoleptic properties. Food Chemistry 27: 95-106.

Hamm, R. (1960): Biochemistry of meat hydration. in: *Chichester, C.O., Mark, E.M., Stewart, G.F.* (eds.) Advances in food research. Academic Press, New York-London, 356-436.

Krylova, N.N., Bazarova, K.I., Kaznetsova, V.V. (1962): Proc. 8th Meeting European Meat Res. Workers, Moscow. Paper No. 38.

Nakamura, H., Hatanaka, M., Ohci, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase T., Haruki, K., Nishikawa, Y. (2004): *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan

Rora, A.M.B., Kvale, A., Morkore, T., Rovik, K.A., Steinen, S.H., Thomassen, M.S. (1998): Process yield, colour and sensory quality of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) in relation to raw material characteristics. Food Res. Int. 31: 601-609.

Roth, B., Birkeland, S., Oyarzun, F. (2009): Stunning, preslaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets, Aquaculture, 289: 350–356.

SPSS 10 for Windows, (1999): Copyright SPSS Inc., 1989-1999.

Stolyhwo, A., Kolodzejska, I., Sikorski, Z.E. (2006): Long chain polyunsaturatedfatty acids in smoked Atlantic mackerel and Baltic sprats. Food Chemistry, 94: 589-595.

Szathmári L., Molnár E. (2007): Investigation of dry matter and fat content in carp species smoked by hot and cold methods. Aquacult Int. 15:331-336.

Szűcs I., Tikász I.E. (2008): A magyarországi fogyasztók halvásárlási és halfogyasztási szokásainak helyzete. XXXII. Halászati Tudományos Tanácskozás. Szarvas.

Varga, D., Szabó, A., Romvári, R., Hancz, Cs. (2010): Comparative study of the meat quality of common carp strains harvested from different fish ponds. Acta Agraria Kaposvariensis. 18th Symposium Animal Science Days.14.2: 301-306.

KÍGYÓTARTÁSI TECHNOLÓGIÁK ÉS RENDSZEREK ÉRTÉKELÉSE

Vincze Zoltán

Fővárosi Állat és Növénykert, Budapest
zoodr@freemail.hu , vincze@zoobudapest.com

Összefoglalás

Egyre népszerűbb világszerte, így hazánkban is a hüllők, azaz a különféle gekkók, agámák, teknősök, és természetesen kígyók tartása, gondozása is. Ezek az állatok fajtól függően tarthatóak szabadtéri vagy szobai tartórendszerekben. Magyarországi viszonyok között szerencsésebb őket kisebb példányszám esetén lakásban vagy nagyobb tenyészetekben külön állatházban, terráriumokban tartani.
A nagy gyűjtemények, tenyészetek megfelelő működésének az alapkritériuma a megfelelően átlátható, egységes, higiénikusan kialakított tartási rendszer. Kisebb és nagyobb gyűjtemények illetve tenyészetek általában egy adott fajra vagy fajcsoportra koncentrálnak, egy helység általában csak egyetlen, hasonló igényekkel bíró állatcsoport tartását teszi lehetővé gazdaságos módon. Ehhez kapcsolódóan előljáróban egy fogalom tisztázása szükséges, nevezetesen a "technológiai tűrés". Ez azt jelenti, hogy az adott faj milyen mértékben képes tolerálni az eredeti élőhelyétől jelentősen eltérő, intenzív mesterséges tartási környezetet, amihez fokozott zavarás (etetések, takarítás stb.) társul. Emellett a mesterséges szelekciós próbálkozásoknak megfelelően - aminek gyakori következménye a beltenyésztettségből adódó gyengébb konstitúció – gyakoriak a természetes élőhelyeken elő nem forduló tenyészformák (T+ és T- albínó, leucisztikus, scaleless, leatherback változatok), amelyek esetében a egyenkénti tartás, fokozott higiénia és ellenőrizhetőség/azonosíthatóság kiemelten fontos. A fentieknek megfelelően a kígyófajokat jó, közepes és gyenge kategóriákba lehet sorolni.
Nagyobb gyűjteményekben, ismerve az állatok alapigényeit és technológiatűrő képességét valamilyen rendszert kell választani, ami megfelel az előbbi szempontoknak.

Üvegterráriumok és –terráriumrendszerek
Nagyobb tenyészetek esetében a nehézkes kezelés miatt nem használatosak, csak speciális esetekben (hegyi fajok magas páratartalom igénnyel, bemutató terráriumsorok stb.).

Dobozrendszerrek állványzat nélkül (non-rack box system)
Erre a célra különböző, plasztik alapú, szellőző felülettel ellátott tároló dobozok alkalmasak. Ezek könnyen kezelhetők, de hátrányuk hogy, az állatok etetéséhez, itatásához minden egyes dobozt el kell mozdítani és a tetejét fel kell nyitni. Ebben az esetben fokozott a zavaró hatás a tenyészet minden egyedén.

"Hobby" rack-rendszerek
Laminált bútorlapokból készült állványok:
A laminált bútor lapok könnyen összeszerelhetőek polc rendszerekké, ahol az állatok tartására fiókszerűen kihúzható tároló dobozok szolgálnak. Ezek előnye az egységes felépítés és a könnyebb kezelhetőség. Egy-egy állat ellátásához nem kell átpakolni a felette levő tartó dobozokat felesleges stresszt okozva a többi kígyónak. Hátrányuk, hogy a dobozok kivételével nehéz a tartó rendszer megfelelő fertőtlenítése.

Üvegpolcos állvány:
Ennek felépítése az előzővel megegyező, annyi eltéréssel, hogy itt a polcok, melyek lezárják a helyükre tolt tartó dobozokat, üvegből készülnek. Itt a megfelelő üveg vastagságra és a rögzítésre kell nagy figyelmet fordítani. Előnyük a jobb fényáteresztés, tökéletes tisztíthatóság és fertőtleníthetőség, míg nagy hátrányuk a nehéz mozgatás, a törékenység és az ebből fakadó balesetveszélyek.

"Profi "rack-rendszerek
Fém vagy műanyagváz perforált fém- vagy műanyaglemezzel, L-profilban mozgó függeszett dobozrendszer:
Itt kerethez rögzített a perforált polcok zárják le a tartó dobozok tetejét és egyben adják a minél nagyobb szellőző felületet, szemben az előzőekkel, ahol minden esetben a tartó dobozok oldalfalain kell a szellőző részeket kialakítani. Ez utóbbi rendszer adja a legjobb átszellőzést. Előnyük a könnyű tisztíthatóság és fertőtleníthetőség, alumínium vagy műanyag alapanyag alkalmazása esetén még az egyszerű mozgathatóság is (kerekes állványzat). Nagy hátrányuk a magas szerelési költség.
Összegezve ki kell emelni, hogy bármely rendszer kerül alkalmazásra, törekedni kell a faj igényeit kielégítő, minimális stresszt jelentő tartóhely kialakítására, ahol az áttekinthetőség, a könnyű kezelhetőség és a higiéniai feltételek biztosítása is megoldható.
Kulcsszavak: kígyótartás, technológiai tűrés, tartórendszerek

Evaluation of different snake-keeping technologies and systems

Abstract

Keeping and looking after reptiles, such as geckoes, agamas, turtles and of course, snakes are becoming more and more popular over the world, and alos in Hungary, these reptiles based on their species can be kept either outside or indoor keeping systems. During Hungarian circumstances in smaller quantity it is adviced to keep them in room conditions, in bigger quantity in sepearte premises designed for keeping animals, in terrariums.
The main criteria of the sufficient operation of larger collections, breeding units is the uniform, hygienic, easyto overview housing system. The smaller and bigger collections and breeding units usually deal only with a species or a group of species, as one room makes the possibility of keeping only a group of animals having similar environmental needs. Technological tolerance defines to waht extent a certain species can bear artificial housing conditions – accompanied with enhanced disturbance (feeding, cleaning) – different to their natural environment. Due to artificial selection – which often leeds to inbreeding, and consequently weaker constituion – breeding forms not existing in the nature (T+ and T- albinism, leucistic, scaleless, leatherback forms) also appear, in case of which individual housing, increased hygienie and monitoring are extremly important. Based on the categories above, snake species can be categorised as good, average and weak/poor.
Housing system satisfying the basic demands and technological tolerance of the animals have to be chosen in bigger collections. The main goal is the best and longest life with minimal stress for keeping and breeding success. Considering larger snake collections and breeding stocks the most important is the easy-to-control, hygienic keeping system with easy maintanance.
Keywords: snake keeping, technological tolerance, housing systems

EGY LEHETSÉGES ALTERNATÍVA: TENYÉSZLUDAK TERMELÉSI PARAMÉTEREINEK JAVÍTÁSA GYÓGYNÖVÉNY-KIEGÉSZÍTÉSEKKEL

Weber Mária[1], Sidó Ilona[1], Apáti Nagy Gábor[2], Ábrahám Csaba[3], Szabó Rubina Tünde[1], Mézes Miklós[1], Erdélyi Márta[1]

[1]Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.
[2]NITAK Nagyszénási Takarmánykeverő Kft. 5931 Nagyszénás-Lajosszénás
[3] Food Analytica Kft. 5711 Gyula, Dancza u. 13.
weber.maria@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Gazdasági állataink közül a baromfi található meg világszerte a legnagyobb számban. A világ népesség növekedése, megköveteli a baromfiállomány és a napos állat előállítás növelését, mindezt úgy, hogy az kielégítse az egészséges táplálkozás iránti fokozódó igényeket és eleget tegyen az egyre szigorodó élelmiszeripari előírásoknak.
Két antioxidáns hatású gyógynövényőrlemény (rozmaring és kakukkfű) hatását vizsgáltuk az I. osztályú naposliba előállításra, a tojástermelés intenzitására, a termékenységre és a keltethetőségre.
A vizsgálati időszak alatt a kontroll csoporttal normál, piaci forgalomban kapható teljes értékű takarmánykeveréket, a kísérleti csoporttal a gyógynövényőrleménnyel kiegészített takarmányt etettünk. A kísérleti állományról elmondható, hogy összességében jobb eredményeket produkált, mint a kontroll állomány.
A gyógynövények kedvező hatása a tojások mennyiségében, a tojástermelési intenzitásban és a keltethetőségben, továbbá a keltetés alatti lámpázás eredményeiben nyilvánult meg. Minden vizsgált paraméterről elmondható, hogy a gyógynövényes takarmány hatására javulás figyelhető meg.
Kulcsszavak: gyógynövényőrlemény, baromfi, rozmaring, kakukkfű.

A possible alternative solution: improving production traits of breeding geese by herbal supplements

Abstract

Among livestock species poultry is the most numerous according population size worldwide. The increasing number of the human population claims for even higher poultry population and one-day-old poultry production while satisfying the needs of healthy food and food safety regulations getting stricter.
We studied the effect of two anti-oxidative ground herbs (rosemary and thyme) to the first class one-day-old geese production, to the intensity of egg production, to fertility and hatching.
During the study period normal, commercial, complete mixed feed was fed by the control group; while herb-supplemented was fed by the experimental group. In total, the experimental group showed better production traits than the control group.
The beneficial effects of the herbs were shown in the quantity of eggs, the intensity of egg productions and the candling results during hatching. There was an improvement in all of the traits studied as the result of herbal supplementation.
Keywords: ground herbs, poultry, rosemary, thyme.

Irodalmi áttekintés

A baromfi fajok közül a ludat háziasították legrégebben. Az ókori Indiában, Görögországban, Egyiptomban, a Római birodalomban és Germániában tartottak háziasított ludakat (*Horn et al*, 2000). A ma ismert házi lúd két ősre, a nyári lúdra és az ázsiai vadhattyú lúdra (*Anser Anser L., Anser Cygnoides L.*) vezethető vissza (*Mihók et al*, 2006).

A domesztikáció folyamata befolyásolja az állat igényét a tartástechnológiai módszerek iránt. Ebből adódóan, mivel a ludat a domesztikációja során mindvégig extenzív körülmények között tartották, ezért igényli az extenzív tartásmódot.

Tenyészállat- (törzspótlás-) nevelésre új törzs teleplétesítésekor és a meglévő törzstelepen az elhullás és a selejtezés miatt a kieső állatok pótlása céljából kerülhet sor. A tenyészállomány 4-6 évig termel és a 2-3. évben várhatjuk a termelés eredmények csúcsát. A rotáció megtervezése nagyon fontos a folyamatos termelés érdekében (*Kozák et al,* 2007).

A tenyészlúd értékmérő tulajdonságai közül a legfontosabbak az I. osztályú napos liba előállítást befolyásoló tényezők, így a tojástermelés intenzitása, a termékenység és a keltethetőség. Ezen tulajdonságok mindegyike elég rosszul öröklődő tulajdonság. Nehéz ezeket a tulajdonságokat tenyésztési módszerekkel javítani (*Bögenfürst*, 1998).

A ludak tojástermelése szezonális jellegű, melynek következtében nem alakítható ki egész éves tojástermelés. Ezt zárt tartási rendszerben, ha nem is egész éves időszakra, de az öt hónapos tojástermelés fényprogramok segítségével kibővíthető legalább 8 hónapos tojástermelésre, melynek köszönhetően a szülőpár állományokat nagyobb tojástermelésre lehet bírni.

A gyógynövények beltartalmi paramétereit kevés szerző vizsgálta (*Dmitriev-Fetisov*, 1990), pedig e növények jelenléte, előfordulása természetes.

Takarmányozástani szempontból különös jelentőségük van a Thymus-fajoknak (pl.: kakukkfű), mivel ezeknek a növényeknek erős íz – és illat anyaguk van. Kevésbé kutatott terület, de ugyanakkor feltételezhető, hogy az állati szervezetek olyan molekulaszerkezetekhez jutnak, amelyek az egyéb gyepalkotó növényekben előforduló illóolajok, alkaloidok, egyéb különleges vegyületek révén, amelyeket az állati sejt saját bioszintetikus folyamataiban nem tud előállítani, ezáltal a gyógynövényes takarmányokon nevelt és termelt állati termék íz- és aromaanyagokban gazdagabb lehet (*Schmidt,* 1993).

Anyag és módszer

A kísérlet a Gehl-Rak Kft. törzslúd telepén folytak. A takarmányokat (gyógynövényes és kontroll) a Nitak Nagyszénási Takarmánykeverő Kft. gyártotta.

Két állományon végeztük el vizsgálatainkat. Az egyik vizsgált állomány egy 2007 tavaszán kikelt Gourmaud állomány volt (kísérleti 1. állomány), míg a másik állomány a 2006 őszén kikelt babati szürke landeszi állomány volt. Mind a két állomány 450 tojóból és 145 gúnárból állt. A tojásokat napi nyolcszor gyűjtötték.

A kísérletnél az I. osztályú napos liba előállítás három legfontosabb összetevőjét (tojástermelés intenzitása, termékenység és keltethetőség) vizsgáltuk meg zárt tartási módban a következőképpen:

- A tojásokat napi nyolcszor szedtük
- Tojástermelés intenzitását az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

((a megtermelt tojások/állomány létszám)/7)*100

– Keltethetőségen beleül néztük az üres (nem termékeny) elhalt és termékeny tojások számát
– A termékeny tojásoknál vizsgáltuk még a kikelt I. osztályú napos libák számát is

Eredmények

Takarmány beltartalmi paraméterei

A takarmányok beltartalmi paramétereit hexanal vizsgálat (2. táblázat), Weendei-analízis, savszám és peroxidszám vizsgálat keretében mértük. A takarmányok beltartalmi paraméteréről elmondható, hogy mind a két csoport esetén (2-2 vizsgált időpontban) szinte azonos eredményeket kaptunk szárazanyag %, nyershamu %, nyersfehérje %, nyerszsír % meghatározásakor. A kísérleti csoportban adagolt takarmányok savszáma mind a hét vizsgálat során magasabb volt, mint a kontroll csoport takarmányában. Ugyanez mondható el a peroxidszám értékekről is.

Mind a két takarmányról (gyógynövényes, kontroll) elmondható, hogy bár a minta vétel nem az előírt minta vételi mód alapján történ és ennek következtében kaphatunk a vizsgálat során ennyire magas eredményeket, ez nem befolyásolta az állatok termelését.

Az etetési vizsgálatokban alkalmazott premixek esetében A- és E-vitamint, továbbá BHT (butil-hidroxi-toluol) tartalmat mértünk, az antioxidánsok mennyiségének detektálása, érdekében (1. ábra).

***1. ábra*: A premixekben mért antioxidánsok mennyisége**

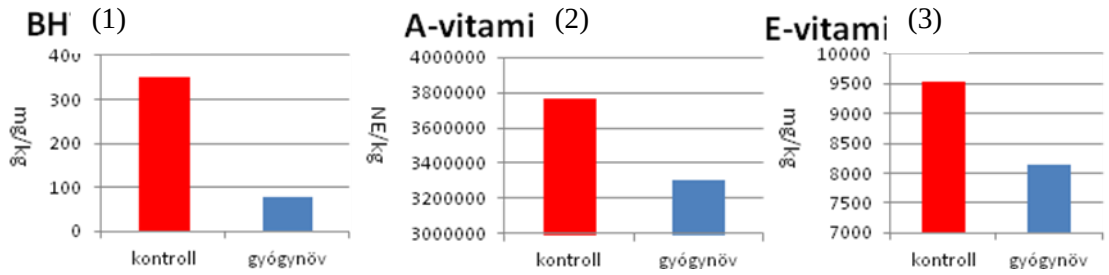


Figure 1: Amount of antioxidant in the premixs
(1) butyl-hydroxy-toloul (2) vitamin A (3) tocoferol

***1. táblázat*: A takarmányok hexanal tartalma**

	Kontroll (1)		Kísérleti (2)	
	2012.05.17	2012.08.16	2012.05.17	2012.08.16
Hexanal	32,44	412	71,08	348

Table 1: Hexanal content of forages
(1) controll (2) experimental

Tojástermelés intenzitása

Az első hetekben mindkét állomány termelése ugrásszerű növekedést mutatott. A kísérleti állomány tojástermelésének intenzitása az első 4 hét kivételével magasabb volt, mint a kontroll állományé, amely az új takarmány megszokásának tudható be. A magasabb tojástermelési mutatót a kísérleti állomány egészen a végéig megtartotta. Mégis a két állomány tojástermelése között szignifikáns különbség nem figyelhető meg. A rendes tojástermelési görbére mind a kísérleti és mind a kontroll állománytermelési görbéje hasonlít. Mind két görbében van egy csúcs és a csúcs elérése után egy fokozatos csökkenés. A termelés 15. hététől kezdve a kontroll állomány termelésében egy jelentősebb visszaesés következett be. A kísérleti állomány termelésében is ekkor magasabb szintű csökkenés volt megfigyelhető, amely a tojástermelési ciklus végének közeledtét jelzi.

2. ábra: A kontroll és kísérleti állomány tojástermelésének alakulása

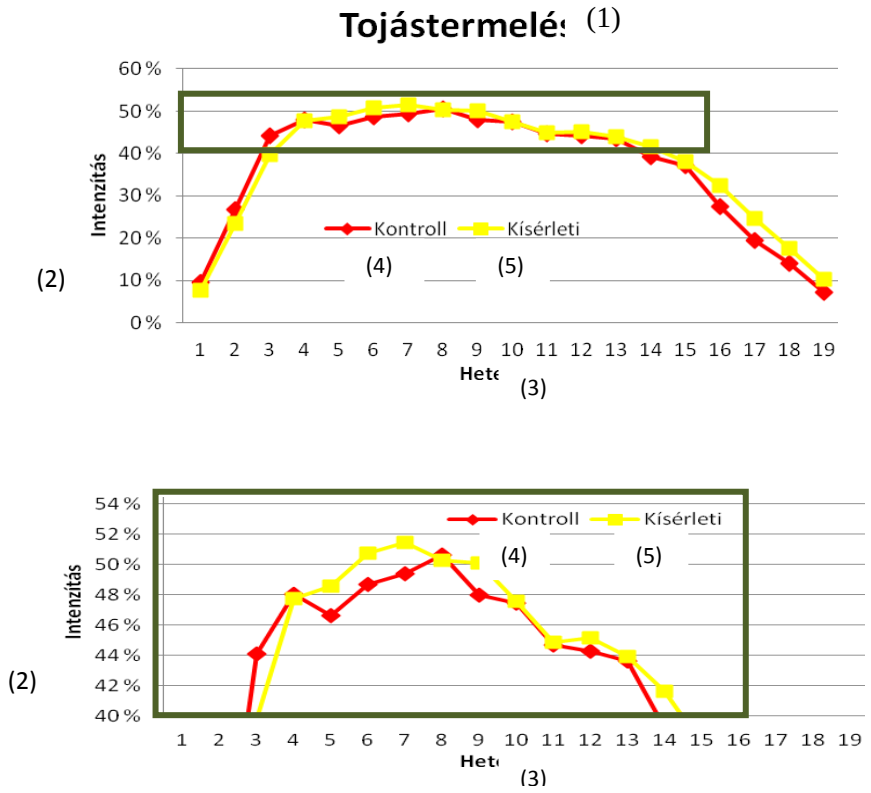


Figure 2: Egg products of the controll and experimental group
(1) egg productinon (2) intensity (3) weeks (4) control (5) experimental

Termékenység

A kontroll és kísérleti állomány termékenységi mutatójában jelentős eltérések nincsenek. Összességében azt lehet mondani, hogy a kontroll állomány termékenysége pár tized százalékkal (0.8 %) ugyan, de jobb volt, mint a kísérleti állományé. A kontroll állomány termékenysége a termelés folyamán egyszer sem volt 70% alatt, míg a kísérleti állomány 66,7% keltethetőséggel kezdte a termelését. Ugyanakkor a kontroll állománynak pedig nem volt 90% fölötti

termékenysége a termelés során. A kontroll állomány átlag termékenysége 81,95% volt. A kísérleti állomány átlag termékenysége 81,10% volt. Bár ez nem jelentős különbség, de hosszabb távon jövedelmezhetőbb.

3. ábra: A kontroll és kísérleti állomány termékenységének alakulása

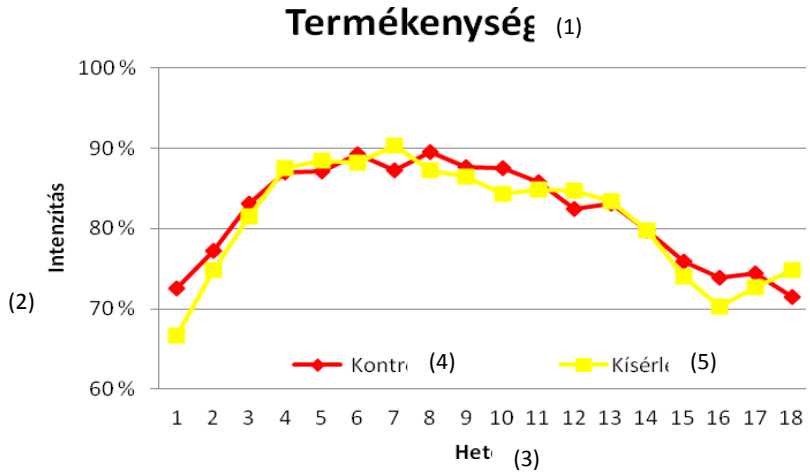


Figure 3: Fertility of the controll and the experimental group
(1) fertility (2) intensity (3) weeks (4) control (5) experimental

Keltehetőség

A keltehetőség vizsgálatánál a kísérleti állomány meglepően magas eredményeket produkált ahhoz képpest, hogy a termékenysége gyengébb lett, mint a kontroll állományé. A kísérleti állomány keltehetősége a termelés eljén kisebb volt, mint a kontroll állományé. Mind a két állomány keltetthetőségénél a 11. héten szignifikáns csökkenés jelentkezett, ez körülbelül 8-9% volt Ezt az esést követően mind a két állomány keltethetősége elkezdett javulni. A kontroll állomány a 13.hétig növekedett mjd egy kismértékű esés volt megfigyelhető. A kísérleti állomány viszont a 14. hétig növekedett,majd egy ki hullámzás mutatkozott a keltethetőségben. Az utolsó heti keltethetőségi eredménye a két állománynak majdnem ugyan annyi volt. Az eltérés 0,3% volt.

4. ábra: A kontroll és kísérleti állomány keltethetőségének alakulása

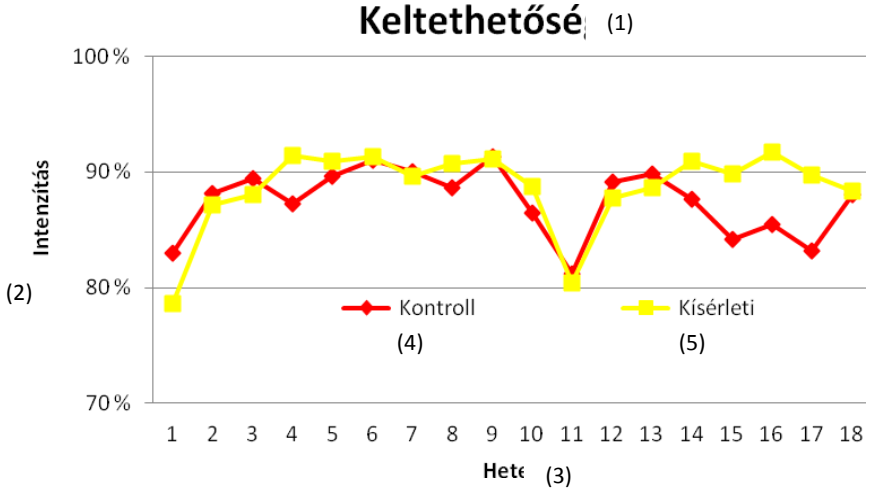


Figure 4: Hatchability of the control and the experimental group
(1) hatchability (2) intensity (3) weeks (4) control (5) experimental

Összességében elmondható, hogy a gyógynövényes takarmány következtében biztosabb és magasabb termelési eredményeket produkáltak a ludak, amely nagyon fontos az I. osztályú napos liba előállításánál. Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a termékenységi mutatókat nem befolyásolta kísérleti takarmány, ebből az következik, hogy ebben a mennyiségben adagolt rozmaring és kakukkfű nem befolyásolja a termékenységet.

Következtetések

A kísérlet során bebizonyosodott, hogy a gyógynövények nem csak képesek helyettesíteni az antioxidánsokat, de a gyógynövényes takarmánnyal etet állatok jobb termelési eredményeket produkáltak a kísérlet során. Ez meglátszót a napos állatok felnevelésében is, hiszen a felnevelési költségeik csökkentek. Ennek következtében, ha az adott gyógynövény mennyiségét növelnénk a takarmányokban, akkor bekövetkezhet egy olyan mértékű változás is akár, amelynek köszönhetően biztosabban és nagyobb mennyiségben állítható elő napos liba.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a NITAK Kft.-nek, különösen Apáti Nagy Gábornak és Tóthné Apáti Nagy Mónikának, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódjunk a GOP-1.3.1-10/A-2010-0044 azonosító számú „Növényi eredetű természetes antioxidánsok hatása a keveréktakarmányok oxidációra érzékeny táplálóanyagainak stabilitására, valamint a termék minőségére ” című pályázatuk vizsgálataiba.

A munkáinkat a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence-17586-4/2013/TUDPOL, az NTP-SZKOLL-12-P-0043 számú pályázat, illetve *TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003* azonosító számú, *„Az oktatás és kutatásszínvonalának emelése a Szent István Egyetemen”* című pályázat is támogatta.

Irodalomjegyzék

Bögenfürst. F. (1998): Keltetés, Gazda Könyvkiadó, 55-59, 74-78.

Dmitriev S., Fetisov A. (1990): Wild medicinal plant resources in the western parts of the Moscow region. Rast. Resursv. 26/1. 47-51.

Horn P. szerk., (2000): Állattenyésztés 2.; Baromfi, haszongalamb; Mezőgazda Kiadó, Budapest, 235-250.

Kozák et al. (2007): Állattenyésztés, Debrecen

Mihók. szerk., (2006): Tyúk, gyöngytyúk, pulyka, kacsa, pézsmaréce, lúd; Mezőgazda Kiadó, 165-167.

Schmidt J. (1993): Takarmányozástan. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.

INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC RADIATION ON SELECTED ORGANS IN RATS

Viera Almášiová[1], Katarína Holovská[1], Viera Cigánková[1], Enikö Račeková[2]

[1]Department of Anatomy, Histology and Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovak Republic
[2]Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Kosice, Slovak Republic

Abstract
The immediate whole body electromagnetic radiation was used to investigate testicular and kidney structure of the Wistar rats. Sexually mature (48 days old) rats were subjected to pulsed electromagnetic fields at frequency of 2.45 GHz and mean power density 2.8 mW/cm^2 daily applications of 3 h per 3 weeks. Histological structure of the testicular and kidney parenchyma was evaluated in 3 hours after the last irradiation. The light microscopy revealed diffuse degenerative changes in both examined organs in experimental animals. The testes contained irregular seminiferous tubules, the seminiferous epithelium showed the signs of cellular sloughing, and sex cells were often degenerative or even necrotizing. The kidney parenchyma manifested degenerative changes within all nephron components as well as collecting tubules. The necrotizations were extremely intensive mainly within the medullary region. The interstitium showed the signs of inflammation. These findings confirmed an adverse effect of EMR, and the evidence that the testes and kidneys are amongst the most susceptible organs to the EMR.

Key words: electromagnetic radiation, testes, kidney, rats

Introduction

Nowadays, human population is unavoidably influenced to the constant electromagnetic fields produced from variety of different sources. Frequencies between 30 kHz and 300 GHz are commonly used for telecommunication, including broadcast radio and television, and involve the radio frequency band which can be classified to as non-ionizing radiation in the microwave range. Mobile telephone systems exactly operate at radiofrequency electromagnetic waves, RF-EMW 900MHz and 1800MHz. Such the levels are far below the high frequency EMW of X-rays and gamma rays ionizing radiation. Although the low level of energy of non-ionizing radiation cannot break the covalent bonds in biological molecules, the human body due its electrical properties such the permittivity and conductivity is able to receive and induce electrical fields and currents inside the tissues (Sysoev et al., 2013). Thermal and non-thermal effects are the main mediators of EMW interaction with biological systems. The tissue damage in this case is caused due to tissue´s inability to eliminate the excessive heat. Non-thermal or direct effect is not completely understood, and comprises a wide range of various metabolic pathways. It is often associated with the plasma membrane injury, cellular signal transduction effects, nervous system excitability perturbation, neuroendocrine and immune system injury (Bhat, 2013, Zecca et al., 2006). However the testis and kidneys depend chiefly on surface admittance rather than blood flowage for temperature regulation, which performs an interesting aspect of thermal effect of RF-EMW, the mode of action of RF-EMW will be probably a combination of the thermal and nontermal effects. However many works showed that RF-EMR from a mobile phones, Wi-Fi, microwaves or other devices affected negatively male fertility (Lukac et al., 2011, Hales et al., 2005),or general health (Braune et al., 2002), a number of studies in contrast did not note any abnormalities (Dasdag et al.,2003; Chung et al., 2005).
This study investigated the possible effect of immediate whole body irradiation by pulsed EMF on testis and kidney structure of rats.

Materials and methods

The research material consisted of 40 male albino rats strain Wistar. At the begining of the experiment, animals were randomly divided into two groups – the control and experimental (20 rats

in each). Animals were kept in ordinary cages under controlled temperature of 21±1ºC, and had *ad libitum* access to food and water. The lighting was turned off or on under a 12 h cycle. Experimental rats were irradiated by a pulse-wave EMF of 2.45 GHz, at mean power density 2.8 mW/cm^2 in a purpose-designed chamber (Orendac et al., 2005), in 3 h daily applications per 3 weeks. Uniformity of the EMF was analysed with a spectral analyser to determine the optimal placement of animals. 3 hours after the last irradiation the animals from experimental and control groups were anesthetized by i.p. injection of xylazine+ketamine, and subsequently perfused with 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3). The tissue excisions of size 1 mm^3 were fixed by immersion in 3% glutaraldehyde and postfixed in 1% osmium tetraoxide (both in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.3). After dehydration in acetone they were transferred to propylene oxide and embedded in Durcupan ACM. Semi-thin sections of specimen were cut using an ultramicrotome LKB Nova, stained with toluidine blue and examined under a light microscope Zeiss Axio Lab A1, and documented with camera Axio Cam ERc 5. The use and care of animals were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences.

Results and discussion

Histopathological evaluation of the testicular parenchyma

The testicular parenchyma of experimental rats exibited various degenerative changes. Seminiferous tubules had irregular shape, and the seminiferous epithelium contained many empty spaces as the sign of the cellular sloughing. Sloughed cells were found within the lumina of the tubules (Fig. 1).

At a higher magnification, the Sertoli cells appeared to be normal in their structure, but the individual cells of different developmental stages of the spermatozoa were often affected. Many spermatogonia were shrunk and they possessed very dark cytoplasm. The spermatocytes were mostly normal, but some possessed vacuolar cytoplasm. Rarely, the spermatocytes were completely destroyed. Elongated spermatids had normal structure, however their amount was decreased. Many empty spaces within the seminiferous epithelium may be considered to as sign of cellular sloughing (Fig. 2).

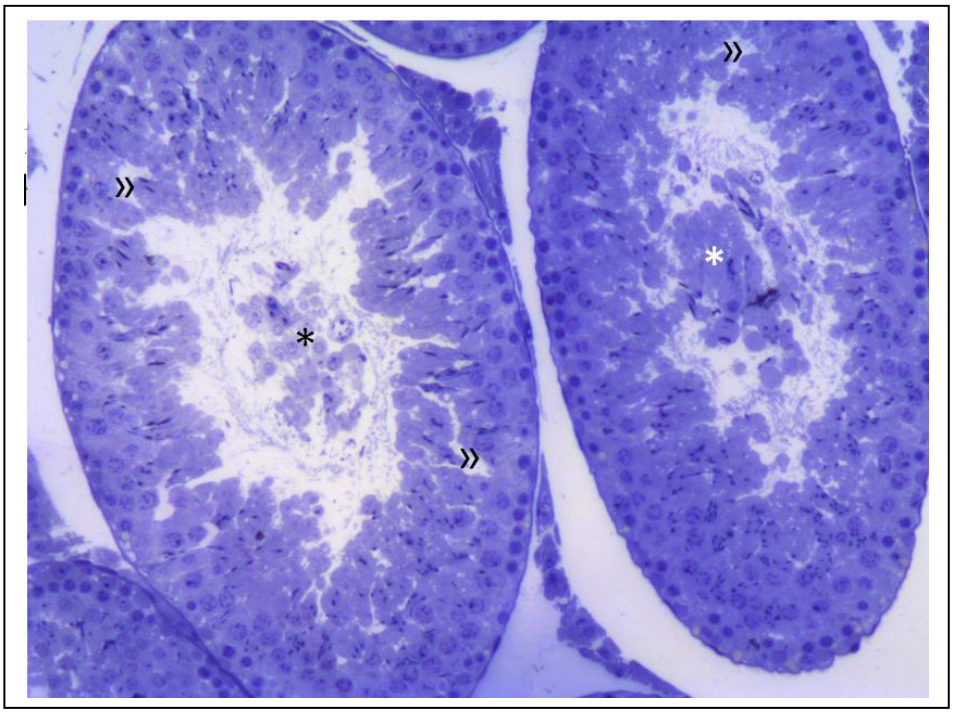


Fig. 1.

Seminiferous tubules after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 100x; » - empty space, * - sloughed cells

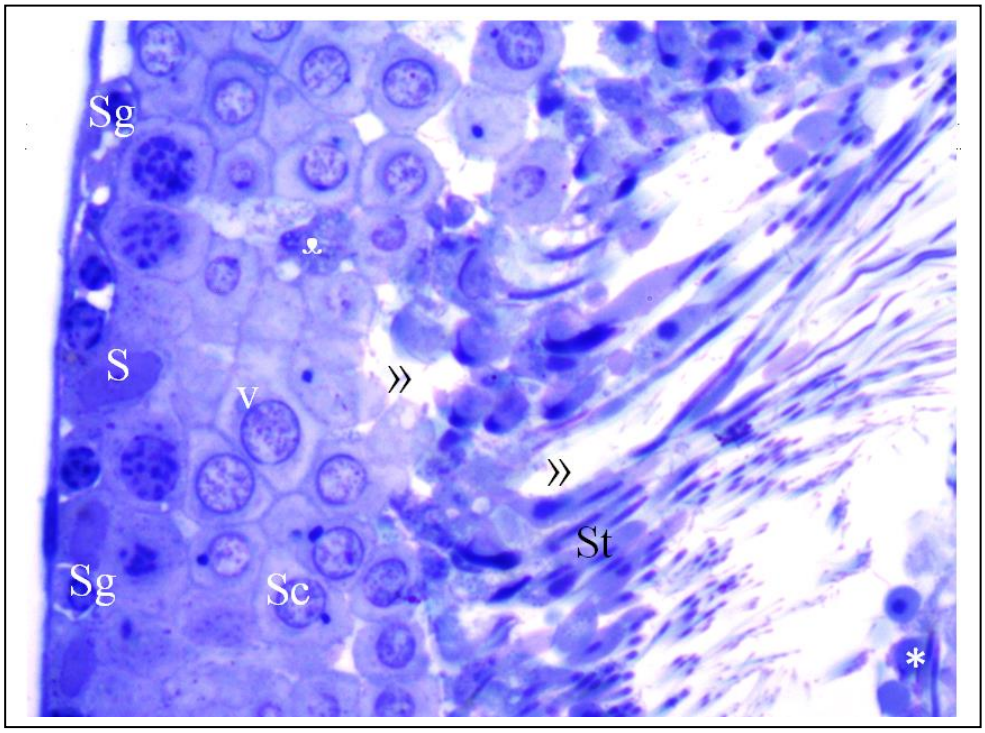


Fig. 2.

Seminiferous epithelium after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 400x; » - empty space, * - sloughed material, * - destroyed cell, S – Sertoli cell, Sg – spermatogonium, Sc – spermatocyte, St – spermatid, v - vacuole

The peritubular myoid cells as well as interstitial spaces had characteristic structure. The Leydig cells appeared to be unaffected, and the adjeacent blood vessels had continuous endothelial lining (Fig. 3).

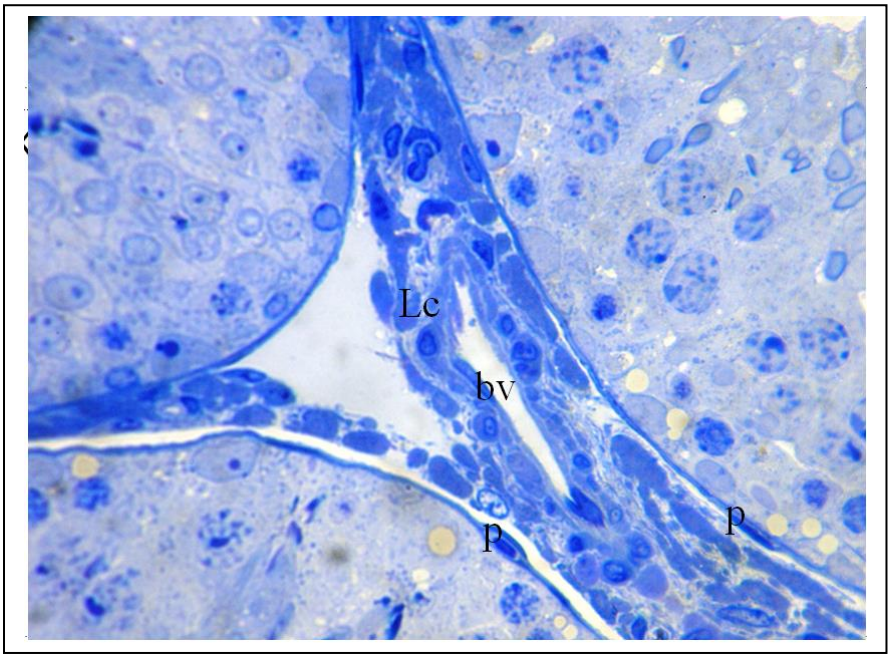


Fig. 3.

Interstitium after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 400x; Lc – Leydig cells, bv – blood vessels, p – peritubular cels

Our examination have proved an adverse effect of EMR on testicular structure in rats, which is highly consistent with observations of many authors who described similar degenerative changes of the testicular parenchyma often accompanied with altered sex hormones production after exposition to different forms and intensities of EMR (Lukac et al., 2011; Roychoudhury et al., 2009; Liu et al., 2006; Ribeiro et al.,2007; Salama et al., 2009).

Histopathological evaluation of the kidney parenchyma

After 3 weeks of the experiment the kidney parenchyma contained diffuse changes within the cortical as well as the medullary portion. The renal corpuscles, renal tubules and the cortical collecting ducts were constantly changed. The renal corpuscles had irregular shape, and their urinary spaces were often enlarged (Fig. 4). Cells of the proximal tubules showed high content of small vacuoles scattered within the cytoplasm, and their brush border was often altered (Figs. 4 and 5).

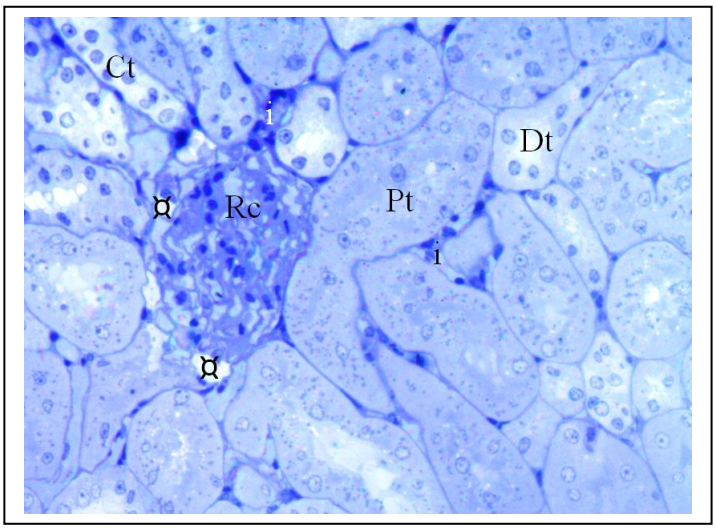


Fig. 4.

Renal cortex after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 100x; Rc – renal corpuscle, ¤ – enlarged urinary space, Pt – proximal tubule, Dt – distal tubule, Ct – collecting tubule, i – interstitium

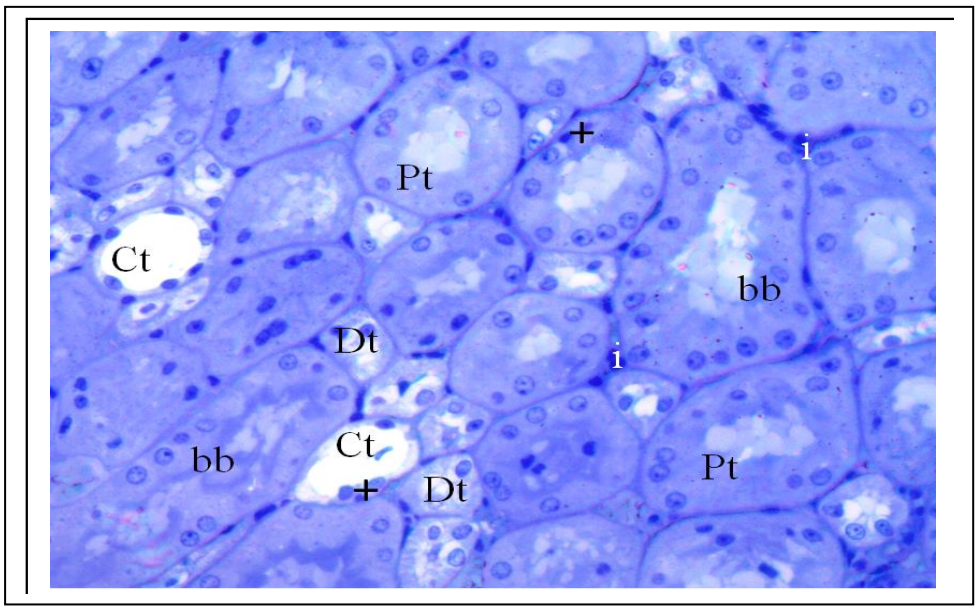


Fig. 5

Renal cortex after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 100x; Pt – proximal tubule, Dt – distal tubule, Ct – collecting tubule, i – interstitium, bb – brush border, + - necrotizing cell

The medullary region comprised of medullary collecting ducts, straight portions of the proximal as well as distal tubules and thin limbs of the loop of Henles with changed histological structure. The cells lining the over mentioned tubules possessed many vacuoles inside their cytoplasm and cellular necrotizations were much more obvious compared to the cortical portion in experimental animals (Fig. 6). Both cortical and medullary portions revealed high cellularity of the interstitial space as the sign of its inflammatory response, however the blood vessels appeared to as unchanged (Figs. 4, 5 and 6).

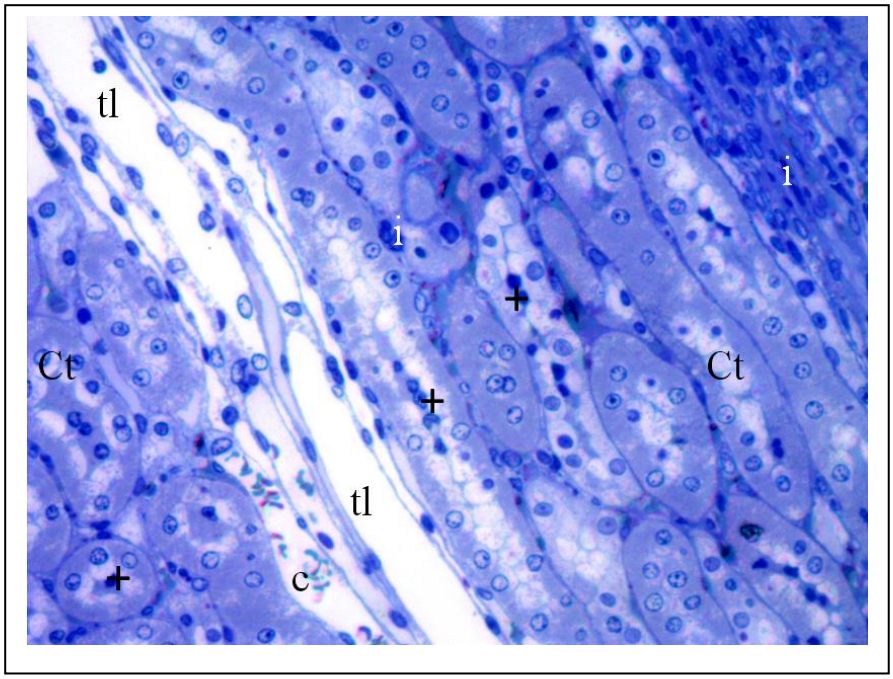


Fig. 6.

Renal medulla after 3 weeks exposure to EMF (semi-thin section, toluidine blue).

Magn. 100x; Ct – collecting tubule, tl . thin limb of the loop of Henle, i – interstitium, c – blood capillary, + - necrotizing cell

An adverse effect of EMR on the kidney is described in many works which have recorded intertubular inflammation, glomerular atrophy, cytoplasmic vacuolation of the renal tubules, pycnotic nuclei (Khayyat, 2011; Ozturk et al., 2003; Zare et al., 2007; Semra et al., 2007).

Conclusion

The immediate whole body pulsed electromagnetic radiation at frequency of 2.45 GHz and mean power density 2.8 mW/cm^2 in daily applications of 3 h per 3 weeks had clear adverse effect on testicular and renal structure in rats. Both examined parenchymatous organs revealed diffuse degenerative changes probably as the consequence of a combination of thermal and nontermal effect of electromagnetic radiation. The testicular parenchyma consisted of irregular seminiferous tubules, and the seminiferous epithelium contained many small irregular empty spaces as the sign of cellular sloughing. Spermatogonia and spermatocytes were often degenerative. The spermatids were less numerous compared to the control ones. Many individual developing sex cells were necrotizing. Interstitium was unchanged.

The kidney parenchyma possessed degenerative and irregular renal corpuscles with enlarged urinary spaces. The main degenerative feature of the uriniferous tubules was the presence of vacuoles within the cytoplasm of cells, reduced or even totally destroyed brush border in proximal tubules as well as presence of nectotizing cells predominantly within the medullary portion of the kidney. The

collecting tubules within the cortex and medulla contained cells with vacuolar cytoplasm. The necrotization within the collecting tubules was evident especially within the medullary region. The interstitium contained rich infiltrations with blood formed elements as the sign of inflammation.

Acknowledgements
This study was supported by VEGA Projects 1/0037/12

References

Bhat MA, 2013. Effects of Electromagnetic Waves Emitted by Mobile Phones on Male Fertility. Comp Engineering and Intelligent Systems, 4(3)

Braune S, Riedel A, Schulte-Monting J, 2002. Influence of a radiofrequency electromagnetic field on cardiovascular and hormonal parameters of the autonomic nervous system in healthy individuals. Radiation Res. 158: 352-356

Dasdag S, Zulkuf AM, Aksen F, 2003. Whole body exposure of rats to microwavws emitted from a cell phone does not affect the testes. Bioelectromagnetics (24): 182-188

Hales DB, Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, 2005. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. Ann NY Acad. Sci 1061: 120-134

Chung MK, Lee SJ, Kim YB, Park SC, Shin DH, Kim SH, Kim JC, 2005. Evaluation of spermatogenesis and fertility in F1 male rats after in utero and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. Asian J Androl. 7 (2): 189-194

Khayyat Latifa Ishaq, 2011. The histopathological effects of an electromagnetic field on the kidney and testis of mice. Eurasia J Biosci, 5: 103-109

Liu GW, Gong PS, Zhao HG, Wang ZC, Gong SL, Cai L, 2006. Effect of low level radiation on the death of male germ cells. Radiat.Res., 165:379-389

Lukac N, Massanyi P, Roychoudhury S, Capcarova M, Tvrda E, Knazicka Z, Kolesarova A, Danko J, 2011. J Envir Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 46(12): 1417-1423

Orendac M, Fenik A, Mojzis M, Orendacova J, 2005. Biological effects of electromagnetic radiation on living systems with respect to the brain. Psychiatrie (2): 83-85

Ozturk A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Oztekin E, 2003. Zinc prevention of electromagnetically induced damage to rat testicle and kidney tissues. Biol Trace Elem res. 96 (1-3): 247-254

Ribeiro EP, Rhoden EL, Horn MM, Rhoden C, Lima LP, Toniolo, 2007. Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. J Urol.177(1): 395-399

Roychoudhury S, Jedlicka J, Parkanyi V, Rafay J, Ondruska L, Massanyi P, Bulla J, 2009

Semra E, 2007. The effect of electromagnetic field (50Hz, 6 mT) on rat liver and kidney. Journal of Adnan Menderes Medical Faculty 8(1): 5-11.

Sysoev VN, Lukyanov GN, Serov IN, 2013. Electromagnetic Radiation Influence on Human Health. http://www.aires.spb.ru/docs/eng/36-1-eng.pdf

Zare S, Alivandi S, Ebadi AG, 2007. Histological studies of the low frequency electromagnetic fields effect on liver, testes and kidney in quinea pig. World Applied Sciences Journal 2 (5): 509-511

Zecca L, Mantegazza C, Margonato V, Cerretelli P, Caniatti M, Piva F, 2006. Biological effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats. Bioelectromagnetics 19(1): 57-66

CYTOCHROME P450 1A INDUCTION IN CHICKEN OVARIAN FOLLICLES EXPOSED TO 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN

Antos P., Sechman A.*

University of Agriculture in Krakow,
Department of Animal Physiology & Endocrinology,
Poland
*piotr.antos@interia.pl

Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) comprise a large family of proteins that are involved in catalyzing the oxidation of wide variety of xenobiotics, including dioxins and dioxin-like compounds. Chickens have two CYP1A isoforms (CYP1A4 and CYP1A5) which are orthologous to mammalian CYP1A1 and CYP1A2, respectively. It is well-known that the chicken liver expresses both CYP1As, and dioxins induce CYP1A4 and A5 activities in this organ. Recently, we have found that chicken ovarian follicles express *CYP1A4* and *CYP1A5* mRNA. The aim of the present experiment was to measure *in vitro* CYP1A activity in control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposed ovarian follicles of the laying hen.

The experiment was performed on Hy-Line Brown hens at the age of 25 weeks. Birds were fed *ad libitum* and kept in individual cages at a neutral temperature (18-20°C), and under a photoperiodic regime of 14L:10D. Hens were decapitated 2 h after ovulation. Small (1-4 mm) and large (4-8 mm) white follicles and 3 the largest preovulatory follicles (20-36 mm; F3-F1; F3<F2<F1) were isolated from the ovary. In respect to the preovulatory follicles, the granulosa layer was separated from the theca one by Gilbert's method. The white follicles and fragments of granulosa and theca layers were incubated for 24 h at 39°C in 1 ml Eagle's medium supplemented with TCDD (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany) at concentrations of 0 (control) or 10 nM, ovine LH (oLH; 10 ng/ml) and combination of oLH (10 ng/ml) with TCDD (10 nM). After incubation, tissues were collected and kept at -80°C till the measurement of the CYP1A enzyme activity. CYP1A activity was determined by fluorometric MROD assay using 7-methoxyresorufin as a substrate. The methoxyresorufin metabolite, resorufin, was measured using the excitation wavelength of 530 nm and the emission wavelength of 590 nm. Protein concentration was measured using fluorescamine at the excitation wavelength of 400 nm and the emission wavelength of 460 nm. The measurements were done in triplicates using 96-well plates with BioTek FLx-800TBI microplate reader. MROD activity was expressed as nmol resorufin/mg protein/min. The statistical analysis of the results was performed by ANOVA for repeated measures followed by Tukey test. Significance of differences was considered at the level of $P<0.05$.

The MROD activity was detected in all investigated ovarian follicles. The basal MROD activity ranged from 0.18 in the granulosa layer of the F3 follicle to 2.5 nmol resorufin/mg protein/min in the theca layer of the F1 preovulatory one ($P<0.01$). In comparison to control group, TCDD or oLH significantly ($P<0.05$-0.01) increased the MROD activity in all investigated follicles and tissues. The highest MROD activity following TCDD exposure was found in the granulosa layer of F3 preovulatory follicle (14.0 nmol resorufin/mg protein/min; $P<0.01$) while following oLH treatment in the granulosa layer of the F2 follicle (11.2 nmol resorufin/mg protein/min; $P<0.01$). Incubation of these follicles in medium supplemented with both oLH and TCDD revealed that TCDD did not affect oLH stimulated MROD activity.

In conclusion, the basal and TCDD inducible CYP1A activity in ovarian follicles suggest that the chicken ovary is involved in the process of xenobiotic detoxication.

Supported by grant N N303 561 339 (2010-2013) & BM-4224/2013.

Mercury concentrations in the digestive tract of muskrat from southern Poland

Łukasz J. Binkowski, Sylwia Marek, Joanna Banaś, Tomasz Łaciak, Włodzimierz Wojtaś, Bartłomiej Zyśk, Marek Guzik, Lucjan Schimscheiner and Robert Stawarz

Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow, PolandPodbrzezie 3, 31-054 Cracow, Poland
Corresponding author: Łukasz J. Binkowski (ljbinkowski@gmail.com)

Mercury is a xenobiotic metal which occurs in the environment in its most toxic form (methylmercury) mostly in sediments. The transfer level from the environment to living organism depends on many factors and is different in various environments. The aim of our study was to inquire the concentrations of total mercury in chosen parts of the digestive tract of muskrat *Ondatra zibetrhicus* L. from Zator fishponds area in southern Poland.

Animals were shot in April 2012, weighed, skinned and frozen (-18°C). Age was determined on the basis of molar wear. During the section in the laboratory of the Institute of Biology (Pedagogical University of Cracow) animals were sexed (5 females and 6 males) and samples of liver, stomach, large intestine, cecum and their content were taken. Concentrations of mercury were measured with CV-AA spectrometer (NIC MA-2; limit of quantification 0.2 ng) in the wet weight of samples. The differences in mercury concentrations between sexes were tested with T test. All analyses were performed with MS Excel 2010 PL and Statistica 10 EN.

All individuals were 24 ± 3 months old. The statistical differences in mercury concentrations between sexes were not statistically significant so the results of both groups were combined. The highest mean mercury concentrations in tissues was noted in caecum (0.0221 μg/g), the lowest one in liver (0.0105 μg/g). The concentrations in the content of the digestive tract fitted into the range from 0.0034 (caecum content) to 0.0096 μg/g (large intestine content). These results show that mercury is available in the studied ecosystem. In comparison of the found concentrations in liver to the literature data they can be evaluated as comparable to ones found in other mammals in Poland and Slovakia region.

THE EFFECT OF BEE POLLEN ON MACROSCOPIC STRUCTURE OF FEMORA IN ADULT FEMALE RATS AFTER AN EXPERIMENTAL ADDITION IN DIET

Ivana BOBOŇOVÁ[1], Monika MARTINIAKOVÁ[1], Hana CHOVANCOVÁ[1], Radoslav OMELKA[2], Róbert TOMAN[3], Zuzana HÁJKOVÁ[3], Robert STAWARZ[4]*

[1]Constantine the Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology and Antropology, Nabrezie Mladeze 91, 949 76 Nitra, Slovakia, phone number: +421 37 64 08 720
[2]Constantine the Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Department of Botany and Genetics, Nabrezie Mladeze 91, 949 76 Nitra, Slovakia
[3]Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia
[4]Pedagogical University, Department of Vertebrate Zoology and Human Biology, Podbrzezie 3, 310 54 Krakow, Poland
*Corresponding author: ivana.bobonova@gmail.com

ABSTRACT

Bee pollen is considered a super food because it contains proteins and is rich in vitamins, minerals and phytochemicals. According to these benefits is bee pollen often used as a dietary additive, but its role on growth characteristics and bone metabolism is still poorly understood. Therefore the objective of this study was to determine the effect of diet supplementation with bee pollen on selected growth characteristics (body weight, femoral weight and femoral length) in adult female rats. One-month-old female Wistar rats were randomly divided into four groups of 5 animals each. In the control group (1), rats were fed a commercial diet throughout the experiment (90 days). Rats of three other experimental groups received standard diets with a different content of bee pollen: group 2 – 0.2%, group 3 – 0.5% and group 4 – 0.75% of bee pollen for 90 days. The statistical analysis of obtained data showed a statistically significant decrease of femoral weight in rats from experimental group 4 as compared to control one (1) and also relevant differences were found between rats from the experimental groups 2 and 4 ($P<0.05$). The results produced by the current study allow better understanding of the role of bee pollen on growth and bone metabolism in rats.

Keywords: Bee pollen. Body weight. Femoral weight. Femoral length. Rats.

INTRODUCTION

Bee pollen is composed of flower pollen mixed with nectar and bee secretions **(Silva *et al*., 2006)**. Bee pollen is one of the widely used natural supplements. It contains many essential nutritional elements important for growth and development of animals and humans **(Bell *et al*., 1983; Orzaez Villanueva *et al*., 2002; Haščík *et al*., 2011; Capcárová *et al*., 2012; Petruška *et al.*, 2012)**. Bees use pollen as their nutritional source of proteins (25-30%), carbohydrates (30-55%), lipids, including fatty acids and sterols (1-20%), vitamins and minerals. Futhermore, bee pollen is rich in carotenoids, flavonoids, phytosterols, polyphenols and other beneficial compounds **(Baltrušaityté *et al*., 2007; Moreira *et al*., 2008)**. This natural product is recognized to be a valuable apitherapeutic product with potential for medical and nutritional applications **(Almeida-Muradian *et al*., 2005)**. Bee pollen is promoted as a health food with a wide range of nutritional and therapeutic properties **(Yamaguchi *et al*., 2006)**, triggering beneficial effects to human health and the prevention of prostate problems **(Shoskes, 2002)**, allergy desensitization **(Mizrahi and Lensky, 1997)**, arteriosclerosis **(Wojcicki *et al*., 1986)** and

tumors **(Zhang *et al*., 1995)**. Its important physiological functions have already been widely praised. It has been reported that bee pollen accelerates mitotic rate, promotes tissue repair, enhances greater toxic elimination and reduces excessive cholesterol levels **(Morais *et al*., 2011)**. Its radical scavenging activity has already been reported **(Baltrušaityté *et al*., 2007)**. Moreover **Yamaguchi *et al*. (2004)** demonstrated that the water-solubilized extract of bee pollen (*Cistus ladaniferus*) has an anabolic effect on several bone components in rats. The extract of bee pollen has a stimulatory effect on bone formation and an inhibitory effect on bone resorption *in vitro* **(Yamaguchi *et al*., 2004; Hamamoto *et al*., 2006)** and also stimulates bone caltification **(Yamaguchi *et al*., 2004)**.

Growth and development of animals and humans is affected by numerous factors, including nutritional regime, genetic factors, sex, age, management conditions and production system. Recent years have witnessed an increasing interest in the use of various feed additives and dietary supplements believed to improve growth characteristics of animals. Therefore the aim of this study was to determine the effect of bee pollen as alternative feed additive on selected growth characteristics (body weight, femoral weight and femoral length) in adult female rats.

MATERIAL AND METHODS

Our study was carried out on twenty one-month-old female Wistar rats. The animals were housed individually in plastic containers (Techniplast, Italy) under the same laboratory conditions of temperature (20-24°C) and relative humidity (55±10%) with acces to food (feed mixture M3, Bonagro, Czek Republic) and drinking water *ad libitum*. All experiments were provided in accordance with accepted standards of animal care in accredited laboratory (SK PC 50004) of the Slovak University of Agriculture in Nitra.

At the age of four weeks the young rats were divided into 4 groups, of 5 animals each. The control group (1) was fed with feed mixture without bee pollen additive. Experimental group 2 was fed with the bee pollen addition in concentration of 0.2%, group 3 with addition of bee pollen in concentration of 0.5% and group 4 with addition of bee pollen in concentration of 0.75% for 90 days. All procedures were approved by the Animal Experimental Committee of the Slovak Republic.

At the end of the experiment, all animals were killed, weighed and their femora were used for macroscopic analysis. Femora were weighed by analytical scales and their length was measured by a sliding instrument. Values for macroscopic analysis were expressed as mean ± standard deviation. Comparisons between experimental and control groups were assessed by the one-way analysis of variance (ANOVA) and Post Hoc Tukey's test. The significance level was accepted at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Our results demonstrate no significant effect of bee pollen application on body weight and femoral length in adult female rats. Statistically significant differences were found only for femoral weight in rats from experimental group 4 in comparison with those from the control one (1) and also relevant differences were observed between rats from the experimental groups 2 and 4 (Table 1).

In general, bee pollen contains a wide spectrum of amino acids, vitamins, hormones, and minerals, as well as enzymes and co-enzymes necessary for good digestion and growth. Our study revealed a non-significant effect of bee pollen administration (in concentrations of 0.2%, 0.5% and 0.75%) on body weight in adult female rats. In the contrary **Haro *et al*. (2000)** reported that male rats fed with multifloral bee pollen ($10 g.kg^{-1}$ of diet for 10 days) had increased body weight. Significantly increased body weight was also observed in chicken fed

Table 1 Average body weight, femoral weight and femoral length in the control (1) and experimental groups (2, 3, 4) of rats.

Rat's group	N	Body weight (g)	Femoral weight (g)	Femoral length (cm)
Control (1)	5	246±15.57	0.8185±0.05	3.3840±0.11
0.2% of bee pollen (2)	5	241±12.92	0.7780±0.04	3.4180±0.03
0.5% of bee pollen (3)	5	237±18.24	0.7535±0.09	3.4120±0.09
0.75% of bee pollen (4)	5	245±20.00	0.5832±0.05	3.4360±0.08
Tukey's test		NS	$1{:}4^{+}$; $2{:}4^{+}$	NS

N: number of rats, NS: non-significant changes, $P < 0.05$ (+)

with a basic diet supplemented with 1.5% of bee pollen over a period of 6 weeks **(Wang *et al*., 2007)** and also in male rabbits received bee pollen as water suspension at 100, 200 and 300 $mg.kg^{-1}$ of body weight for 10 weeks **(Attia *et al*., 2011)**. These differences, however, could be caused by different concentrations of bee pollen used in the mentioned studies. In addition, it is known that differences of bee pollen application on growing characteristics depend on animal species and also sex. The data observed by **Kolesárová *et al*. (2011, 212)** indicate a significant decrease in the secretion of insulin like growth factor I (IGF-I) and subsequent stimulation of reproductive female hormones after unifloral rape seed bee pollen addition in dose $5g.kg^{-1}$of diet for 90 days. In accordance with results obtained by **Haščík *et al.* (2012)** we suppose that some energy are therefore channelled to the reproductive system and don't affect growing of female rats supplemented by bee pollen.

Weights of femora were significantly decreased in female rats from experimental group 4 as compared to control group and also between rats from the experimental groups 2 and 4. In general, steroid hormones play the important role in bone cell development and in the maintenance of normal bone architecture. We assume, that changes in progesteron and estradiol production in female rats after bee pollen addition reported by **Kolesárová *et al*. (2011, 2012)**, could have an impact on activity of osteoblasts and bone mineralisation resulting in decreased femoral weight.

The femoral lengths did not differ between rats from all groups. The results by **Kleczek *et al*. (2012)** revealed that bee pollen (0.5% concentration) in the diet did not cause significant changes in the weight and length of tibial bones in broilers. However, the addition of bee pollen (*Cistus ladaniferus*) water-solubilized extract in the diet has shown to increase bone formation and decrease bone resorption **(Hamamoto *et al*., 2006; Yamaguchi *et al*., 2006)**, and had a preventive effect on the decrease of mineral content and mineral density in the femora of ovariectomized rats **(Yamaguchi *et al*., 2007)**. We suppose that a positive impact of bee pollen on bone metabolism could have concentration-dependent manner and further research is needed to determine the optimal dosage of bee pollen in the diet of rats with a stimulative effect on bones.

CONCLUSION

Out results revealed a significant effect of bee pollen administration on femoral weight in adult female rats. Statistically significant differences were found between rats receiving 0.75% of bee pollen in their diet and those from the control group. Also, relevant differences were observed in rats with 0.2% addition of bee pollen in the diet as compared to those with 0.75% of bee pollen supplementation. On the other hand, body weight and femoral length were non-significantly affected by the administration of different concentrations of bee pollen in female rats.

Acknowledgments: This study was supported by the grants KEGA 025UKF-4/2012 and VEGA 1/0790/11.

REFERENCES

ALMEIDA-MURADIAN, L.B., PAMPLONA, L.C., COIMBRA, S., BARTH, O.M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis,* 18, 105-111.

ATTIA, Y.A., ALL-HANOUN, A., BOVERA, F. 2011. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,* 95, 17-26.

BALTRUŠAITYTÉ, V., VENSKUTONIS, P.R., ČKSTARYTÉ, V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry,* 101, 502-514.

BELL, R.R., THRONBER, E.J., SEET, J.L., GROVES, M.T., HO, N.P., BELL, D.T. 1983. Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of Eucalyptus marginata and Eucalyptus calophylla. *Journal of Nutrition,* 113, 2479-2484.

CAPCÁROVÁ, M., SLAMEČKA, J., ABBAS, K., KOLESÁROVÁ, A., KALAFOVÁ, A., VÁLENT, M., FILIPEJOVÁ, T., CHRASTINOVÁ, L., ONDRUŠKA, L., MASSANYI, P. 2012. Effect of diatery inclusion of Rhuscoriaria on internal milieu of rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,* 96, 459-465.

HAMAMOTO, R., ISHIYAMA, K., YAMAGUCHI, M. 2006. Inhibitory effects of bee pollen cistus ladaniferus extract on bone resorption in femoral tissues and osteoclast-like cell formation in bone marrow cellsin vitro. *Journal of Health Science,* 52, 268-275.

HARO, A., LOPEZ-ALLIAGA, I., LISBONA, F., BARRIONUEVO, M., ALFEREZ, M.J.M., CAMPOS, M.S. 2000. Beneficial effect of pollen nad/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48, 5715-5722.

HAŠČÍK, P., ELIMAN, I.E., BOBKO, M., KAČÁNIOVÁ, M., POCHOP, J., GARLIK, J., KROČKO, M., ČUBOŇ, J., VAVRIŠÍNOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H., CAPCÁROVÁ, M., BENCZOVÁ, M. 2011. Oxidative stability of chicken meat after pollen extract application in their diet. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* 1, 70-82.

HAŠČÍK, P., ELIMAN, I.E., GARLIK, J., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., ABDULLA, H. 2012. Impact of bee pollen as feed suplements on the body weight of broiler Ross 308. *African Journal of Biotechnology,* 11, 15596-15599.

KOLESÁROVÁ, A., BAKOVÁ, Z., CAPCÁROVÁ, M., GARLIK, J., JURACEK, M., SIMKO, M., TOMAN, R., SIROTKIN, A.V. 2012. Consumption of bee pollen affects rat ovarian functions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,* 9, 1-7.

KOLESÁROVÁ, A., CAPCÁROVÁ, M., BAKOVÁ, Z., GÁLIK, B., JURÁČEK, M., ŠIMKO, M., SIROTKIN, A. 2011. The effect of bee pollen on secretion activity, markers of proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes,* 46, 207-212.

MIZRAHI, A., LENSKY, Y. 1997. Bee Products: Properties, Aplications and Apitherapy. Springer-Verlag: New York, USA.

MORAIS, M., MOREIRA, L., FEÁS, X., ESTEVINHO, L.M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology,* 39, 1096-1101.

MOREIRA, L., DIAS, G., PEREIRA, E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugam honey. *Food and Chemical Toxicology,* 46, 3774-3779.

ORZAEZ VILLANUEVA, M.T., DIAZ MARQUINA, A., BRAVO SERRANO, R., BLAZQUEZ ABELIAN, G. 2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. *International Journal of Food Sciences Nutrition,* 53, 217-224.

PETRUŠKA, P., TUŠIMOVÁ, E., KALAFOVÁ, A., HAŠČÍK, P., KOLESÁROVÁ, A., CAPCÁROVÁ, M. 2012. Effect of propolis in chicken diet on selected parameters of mineral profile. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* 1, 593-600.

SHOSKES, D.A. 2002. Phytotherapy in chronic prostatitis. *Urology,* 60, 35-37.

SILVA, T.M.S., CAMARA, C.A., LINS, A.C.S., BARBOSAFILHO, J.M., SILVA, E.M., FREITAS, B.M., SANTOS, F.A.R. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee Melipona subnitida Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis,* 19, 507-511.

WANG, J., LI, S., WANG, Q., XIN, B., WANG, H. 2007. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of Medicinal Food,* 10, 276-280.

WOJCICKI, J., SAMACHOWIEC, L., BARTLOMOWICZ, B., HINEK, A., JAWORSKA, M., GAWRONSKA-SZKLARZ, B. 1986. Effect of pollen extract on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis,* 62, 39-45.

YAMAGUCHI, M., HAMAMOTO, R., UCHIYAMA, S., ISHIYAMA, K., HASHIMOTO, K. 2006. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral diaphyseal and metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Health Science,* 52, 43-49.

YAMAGUCHI, M., IGARASHI, A., UCHIYAMA, S., MORITA, S., SUGAWARA, K., SUMIDA, T. 2004. Prolonged intake of juice (*Citrus unshiu*) reinforced with β-cryptoxanthin has an affect on circulating bone biochemical markers in normal individuals. *Journal of Health Science,* 50, 619-624.

YAMAGUCHI, M., UCHIYAMA, S., NAKAGAWA, T. 2007. Preventive effects of bee pollen *cistus ladaniferus* extract on bone loss in ovariectomized rats *in vivo*. *Journal of Health Science,* 53, 571-575.

ZHANG, X., HABIB, F.K., ROSS, M., BURGER, U., LEWENSTEIN, A., ROSE, K., JATON,J. 1995. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth *in vitro*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 735-738.

HEMATOLOGICAL ALTERATIONS IN COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) EXPOSED TO MANKOZEB

Bojarski B., Lutnicka H., Ludwikowska A.

University of Agriculture in Cracow, Faculty of Animal Science, Department of Poultry and Fur Animal Breeding and Animal Hygiene, Poland

ABSTRACT

In this study the influence of the fungicide mankozeb on hematological parameters of common carp was investigated. The study was conducted on fish weighing 60 (± 10) g in aquaria under controlled environmental conditions. Fish were exposed to the fungicide for 14 days at concentration of 1 mg L^{-1}. Next, aminals were transported to clean water for 30 days (recovery period).

It was determined that mankozeb caused a decrease in the values of hematocrit (HCT) and hemoglobin content (Hb) after 14 days of exposure. Increase in the mean corpuscular volume (MCV) and in white blood cell (WBC) number after the same time was observed. Increase in red blood cell (RBC) number was observed after 24 hours of exposure. The values of mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were decreased after recovery period.

Evaluation of hematological parameters in fish is useful in detection of environmental stressors such as fungicides.

This work has been financially supported by DS 3210/KHDZFiZ

Key words: fungicides, mankozeb, hematological parameters

COBALT-INDUCED ACTIVATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 AND ANTIOXIDANT STATUS IN OVARIAN FRAGMENTS OF RATS

Marcela Capcarová[1], Adriana Kolesarova[1], Branislav Galik[2], Milan Simko[2], Miroslav Juracek[2], Robert Toman[3], Alexander V. Sirtokin[4]

[1]Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, [2]Department of Animal Nutrition, Faculty of Agrobiology and Food Resources, [3]Department of Veterinary Disciplines, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic
[4]Department of Genetics and Reproduction, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecka 2, 949 01 Nitra, Slovak Republic

Abstract
The aim of this study was to determine the expression of heat shock protein 70 (Hsp70), activity of superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant status (TAS) of rat ovarian fragments exposed to cobalt sulphate (Co) *in vitro*. Fragments were incubated with Co administrations as follows: group E1 (0.09 mg.ml^{-1}), group E2 (0.17 mg.ml^{-1}), group E3 (0.33 mg.ml^{-1}), group E4 (0.5 mg.ml^{-1}), group E5 (1.0 mg.ml^{-1}) and the control group without any additions for 18 h. Co administration increase stress reaction by accumulation of Hsp70 what resulted in increasing activity of SOD. TAS of ovary fragments increased with higher doses of Co whereas low doses had no effect. Trace elements can adversely affect animal female reproductive system and its functions, through either direct or indirect effects on oxidative stress induction

Key words: cobalt, ovary, rats, antioxidants, HSP70

Introduction

Cobalt (Co) has important role in many processes, including reproduction (*Ashmead*, 1993), it is an essential element, but at high concentrations is toxic (*Kubrak et al*, 2011). However, Co can be also acutely toxic in larger doses, cytotoxic and induce apoptosis and at higher concentrations necrosis with inflammatory response. Cobalt metal and salts are also genotoxic, mainly cause oxidative DNA damage by reactive oxygen species, perhaps combined with inhibition of DNA repair (*Simonses et al,* 2012). Chronic overexposure to Co may result in neurotoxic effects and exposure of pregnant and lactating rats resulted in the development of oxidative stress and the impairment of defence systems (*Garoui et al*, 2013). Exposure of rats to Co during late pregnancy and early postnatal period affected antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation (*Garoui et al*, 2011). Co exposure of animal organism usually causes the activation of defence systems against reactive oxygen species (ROS) (*Kubrak et al*, 2012). In addition to its well-known function as an integral part of cobalamin (vitamin B_{12}), Co has recently been shown to be a mimetic of hypoxia and a stimulator of the production of ROS (*Kubrak et al*, 2011). In recent years, there has been growing interest in the roles of ROS in female reproduction. ROS are key signals in the initiation of apoptosis in antral follicles and granulosa cells of antral follicles by diverse stimuli, such as exposure to exogenous toxicants, and that antioxidants protect against these stimuli (*Devine et al*, 2012). When ROS are overproduced, oxidative stress may develop in the body (*Jones*, 2008). Superoxide dismutase (SOD) serves as front-line antioxidant defence (*Scandalios*, 2005), reacts with superoxide anion radicals to form oxygen and H_2O_2 (*Ho et al*, 1998). Total antioxidant status (TAS) represents the level of cumulative antioxidant reserve of the body and enables evaluation of the average antioxidant potential. Thus, the overall antioxidant status will give more relevant biological information compared to that obtained by the measurement of individual components (*Millet et al*, 1993).

Heat shock proteins (HSPs) belong to a large and diverse group of unrelated proteins known as chaperones that assist in correct non-covalent assembly and/or disassembly of other polypeptide-containing structure (*Ellis*, 1997). A variety of stressful situations including environmental stimuli

(heavy metals) induce a marked increase in HSP synthesis, known as the stress response (*Jaattela*, 1999; *Tsan and Gao*, 2004).
The aim of present study was to determinate dose-dependent changes in activity of SOD, TAS and expression of Hsp70 in ovarian fragments of rats exposed to Co *in vitro.*

Material and Methods

Preparation, culture and processing of ovary

Rats (Wister rats, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic) in age 150 days were kept under standard conditions at Slovak University of Agriculture in Nitra. Isolated ovaries were washed in a sterile physiological solution. Ovaries were cut by razor blade into fragments (totally 72 pieces) approximately 2 mm in size. Fragments of ovaries were washed in sterile DMEM/F12 1:1 medium (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) and incubated for 24 h in culture plates (Nunc™, Roskilde, Denmark, 1 ml/well) in the same medium with 10% fetal calf serum (BioWhittaker™, Verviers, Belgium), 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma, St. Louis, Mo, USA), with or without cobalt sulphate CoSO4.7H2O (Co) addition in various doses (Table 1). Culture media from plate wells were aspirated and stored at –20 ºC for further assay. Cells intended for SOD activity analyse and Western immunoblotting were lyzed in ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5% Igepal NP-40, 5mM EDTA, 20µg/mlphenylmethylsuphonyl fluoride, 10 µg/ml aprotonin, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin, 10mM sodium orthovanadate in phosphate-buffered saline, pH 7.5, all from Sigma, 50µg/well) **(Sirotkin and Bauer, 2011)**.

Table 1.

Cobalt concentrations used in the study

Group	$CoSO_4.7H_2O$ $mg.ml^{-1}$	Medium ml	Dilution rate	Concentration of $CoSO_4.7H_2O$ $(mg.ml^{-1})$
Control	0	1	0:1	0
E1	0.09	0.91	1:10	0.09
E2	0.17	0.83	1:5	0.17
E3	0.33	0.67	1:2	0.33
E4	0.5	0.5	1:1	0.5
E5	1	0	1:0	1.0

SOD and TAS analysis

The activity of SOD and TAS of ovarian fragments of rats was assayed by spectrophotometer Genesys 10 (using antioxidant RANDOX kits (Randox Labs., Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions.

Western blotting

The separation of HSP70 performed using SDS-PAGE and its subsequent visualization by Western immunoblotting using mouse monoclonal antibody against HSP70 and housekeeping protein GAPDH (1:250 dilution; all from Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), secondary HRP-conjugated anti-mouse IG antibodies (Sevac. Prague, Czech Republic), ECL detection reagents and ECL Hyper-film (Amersham International) was performed as described previously (**Sirotkin and Makarevich 1999; Sirotkin and Bauer, 2011**). The primary antisera against HSP70 and GAPDH were specific for mouse, rat, human, porcine and bovine cells. Incubation medium without cells, or samples processed in the absence of primary antibody, were used as negative controls. The molecular weights of fractions were evaluated using a molecular weight calibration set (18, 24, 45 and 67 kDa; ICN Biomedicals, Inc., Irvine, CA, USA). Band intensity was evaluated by densitometry analysis (not shown here).

Statistical analysis

Each experimental group was represented by four culture wells of cultured ovary fragments. Assays of substances in incubation medium were performed in duplicate. The data presented are means of values obtained in three separate experiments performed on separate days using separate pools of ovaries from 10 – 12 animals. Significant differences between the control and experimental groups were evaluated by one-way ANOVA test using statistical software Sigma Plot 11.0 (Jandel, Corte Madera, USA). The data are expressed as means±SD. Differences were compared for statistical significance at the level $P<0.05$.

Results and Discussion

Expression of HSP70 in ovary fragments of rats

Single fraction of HSP70 with approximately 70 kDa was spotted in lysates of all groups (control and experimental groups). Addition of Co to the ovary fragments modified the expression of HSP70. Increasing dose of Co administration subsequently elevated the accumulation of HSP (Figure 1) and acted as stress factor. Similarly results were reported by *Shukla et al.* (2009) in rat lungs after cobalt treatment. It was reported that there exists an interrelationship between Hsp70 and redox status. Oxidative stress and antioxidants seems to regulate Hsp70 expression (*Guo et al*, 2007). The data of this study confirmed our previous results on porcine granulosa cells (*Capcarova et al*, 2013).

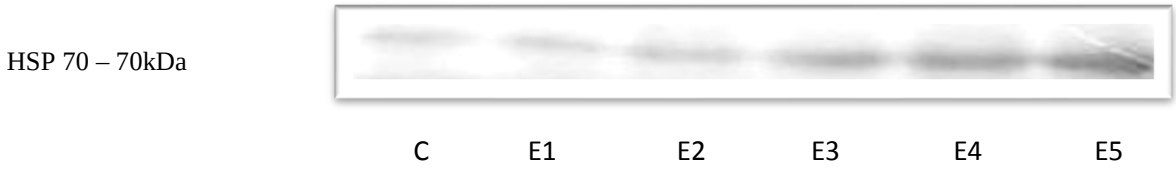


Figure 1.

Accumulation of Hsp 70 in ovary fragments of rats. Control represents culture medium without cobalt addition.

Groups E1-E5 - cobalt sulphate at various doses.

Activity of SOD in ovary fragments of rats

The results of the activity of SOD in ovary fragments of rats are shown in Figure 2. Activity of SOD was elevated in all experimental groups when compared to the control. The highest activity was determined in the groups with the highest doses of cobalt (E4 and E5). Statistical analysis revealed significant differences ($P<0.05$) between the control group and E4 group, and between the control and E5 group. Differences among other groups remained insignificant ($P>0.05$).

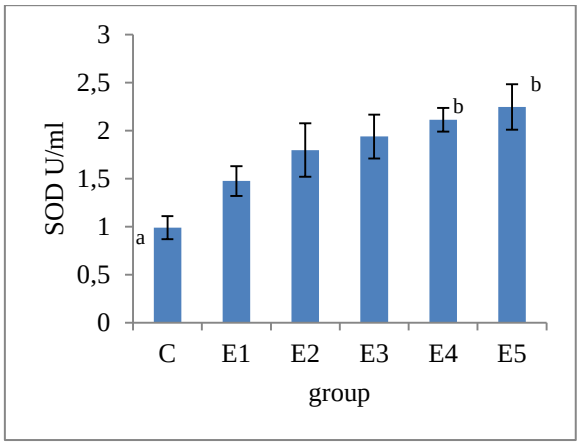


Figure 2.

Effect of cobalt on SOD activity in rat's ovarian fragments. Control represents culture medium without cobalt addition.

Groups E1-E5 - cobalt sulphate at various doses. Values are means±SD. *a,b* denotes values significantly different (*P*<0.05)

Similar results were achieved in our previous study with porcine granulosa cells (*Capcarova et al*, 2013). Likewise, exposure of goldfish to 50, 100 and 150 mg/l of Co for 96 h enhanced lipid peroxide levels and activities of SOD (*Kubrak et al*, 2012). Cobalt ions can enhance the generation of reactive oxygen species (ROS), which may be the reason for cobalt toxicity (*Kubrak et al,* 2012). The Co-induced stimulatory effect on SOD apparently resulted in H_2O_2 accumulation, overwhelming cell antioxidant defence (*Chandel et al*, 1998).

TAS of ovary fragments of rats

The results are presented in Figure 3. TAS of ovarian fragments of rats exposed to Co *in vitro* was insignificantly (P>0.05) reduced against the control in the groups with lower Co doses (E1, E2, and E3). Higher doses of Co (E4, and E5 groups) caused significant increase (P<0.05) of TAS in granulosa cells when compared to the control and E1, E2 and E3 groups. Similar results were found in our previous study with porcine granulosa (*Capcarova et al*, 2013) that could indicate the presence of oxidant/antioxidant imbalance due to various doses of Co addition in animal cells and involvement of antioxidant mechanisms.

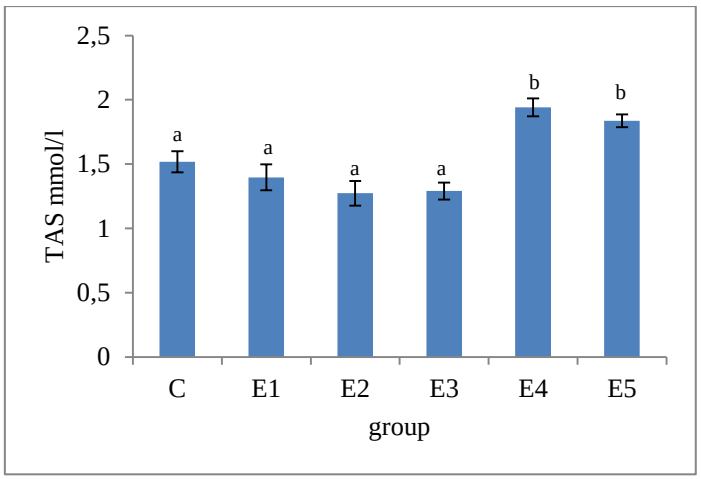


Figure 3.

Effect of cobalt on TAS in rat's ovarian fragments. Control represents culture medium without cobalt addition.

Groups E1-E5 - cobalt sulphate at various doses. Values are means±SD. *a,b* denotes values significantly different (*P*<0.05)

Conclusion

Our results demonstrated that Co administration developed stress reaction of rat ovarian fragments and promoted accumulation of HSP70 what resulted in increasing activity of SOD. TAS increased with higher doses of Co whereas low doses had no effect on this parameter. These results contribute towards the understanding of cellular stress and its response.

Acknowledgments: This work was financially supported by the VEGA project 1/0084/12.

References

Ashmead, H. D. (1993): Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic salts. Pages 47–75 in The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition. H. D. Ashmead, ed. Noyes Publ., Park Ridge, NJ.

Capcarova, M., Kolesarova, A., Sirotkin, A.V. (2013): Antioxidant status and expression of heat shock protein of cobalt-treated porcine ovarian granulosa cells. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, Special Issue 2(1). 1819-1828.

Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumaker, P.T. (1998): Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95. 11715-11720.

Devine, P.J., Perreault, S.D., Luderer, U., (2012): Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Biology of Reproduction, 86. 1-10.

Ellis, R.J. (1997): Do molecular chaperones have to be proteins? Biochemical and Biophysical Research Communications, 238. 687-692.

Garoui el M., Fetouri, H., Ayadi Makni F., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011): Cobalt chloride induces hepatotoxicity in adult rats and their suckling pups. Experiemntal and Toxicologic Pathology, 63. 9-15.

Garoui, E., Amara, I.B., Driss, D., Elwej, A., Chaabouni, S.E., Boudawara, T., Zeghal, N. (2013): Effects of Cobalt on Membrane ATPases, Oxidant, and Antioxidant Values in the Cerebrum and Cerebellum of Suckling Rats. Biological Trace Elements Research, in press.

Guo, S., Wharton, W., Moseley, P., Shi, H. (2007): Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. Cell Stress and Chaperones, 12. 245-254.

Ho Y-S, Cargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ, 1998. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutases. Journal of Biological Chemistry, 273. 7765-7769.

Jones DP, 2008. Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 295. C849-C868.

Jaattela, M. (1999): Heat shock proteins as cellular lifeguards. Annual Medicine, 31. 261-271.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2011): Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish Carassius auratus. Chemosphere, 85. 983-989.

Kubrak, O.I., Rovenko, B.M., Husak, V.V., Vasylkiv, O.Y., Storey, K.B., Storey, J.M., Lushchak, V.I. (2012): Goldfish exposure to cobalt enhances hemoglobin level and triggers tissue-specific elevation of antioxidant defenses in gills, heart and spleen. Comparative Biochemistry and Physiology C, 155. 325-332.

Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M.J. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84. 407-412.

Scandalios JG, 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38. 995-1014.

Shukla, D., Saxena, S., Jayamurthy, P., Sairam, M., Singh, M., Jain, S.K., Bansal, A., Ilavazagham, G. (2009): Hypoxic preconditioning with cobalt attenuates hypobaric hypoxia-induced oxidative damage in rat lungs. High Altitude Medicine and Biology, 10. 57-69.

Simonsen, L.O., Harbak, H., Bennekou, P. (2012): Cobalt metabolism and toxicology – a brief update. The Science of Total Environment, 432. 210-215.

Sirotkin, A.V., Makarevich, A.V. (1999): GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein dinase A system. Journal of Endocrinology, 163. 317–327.

Sirotkin, A.V., Bauer, M. (2011): Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. Cell Stress and Chaperons, 16. 379-387.

Tsan, M.F., Gao, B. (2004): Cytokine function of heat shock proteins. American Journal of Physiology – ZPI, 243 p. ISBN 80-85 120-37-2.

OSTEOTOXIC EFFECT OF SIMULTANEOUS ADMINISTRATION TO CADMIUM AND DIAZINON ON BONE IN ADULT MALE RATS

Hana CHOVANCOVÁ[1], Monika MARTINIAKOVÁ[1], Ivana BOBOŇOVÁ[1], Radoslav OMELKA[2], Mária ADAMKOVIČOVÁ[2], Robert STAWARZ[3], Róbert TOMAN[4]

[1]Department of Zoology and Anthropology, Constantine the Philosopher University, 949 74 Nitra, Slovakia
[2]Department of Botany and Genetics, Constantine the Philosopher University, 949 74 Nitra, Slovakia
[3]Institute of Biology, Krakow Pedagogical University, Krakow 31 054, Poland
[4]Department of Veterinary Sciences, Slovak University of Agriculture, 949 76 Nitra, Slovakia

Abstract
Bone is a metabolically active tissue which can be influenced by various toxicants presented in the environment. The study was aimed to investigate the osteotoxic effect of simultaneous peroral administration to heavy metal cadmium (Cd) and nonselective organophosphorous insecticide diazinon (DZN) on bone in adult male rats. A total of twenty 1-month-old male Wistar rats were randomized into two experimental groups. In the first group (A), young males were dosed with combination of 30 mg $CdCl_2$/L and 40 mg DZN/L in drinking water, for 90 days. Ten 1-month-old males without toxicant administration served as a control group (B). After treatment period, detailed histological analysis of compact bone was performed in each group. We found that rats from the group A displayed different microstructure in the middle part of the *substantia compacta* where primary vascular radial bone tissue appeared (due to radial extension of vascular canals from the endosteal surfaces). In some cases, vascular expansion was so enormous that canals were also present near the periost. On the other hand, they occurred only near the endosteal surfaces in rats from the group B. In Cd-DZN-exposed rats, a smaller number of primary and secondary osteons was also identified signalizing reduced bone mechanical properties. Our results suggest an adaptive response of bone to Cd-DZN-induced toxicity in rats in order to prevent osteonecrosis.

Key words: Bone. Osteotoxicology. Cadmium. Diazinon. Rats.

Introduction

Cadmium (Cd) is a toxic metal which still attracts the attention of researchers and the public because its level in food products often exceeds the maximum allowable limits (Toman *et al*., 2011). The diet is the major source (~ 99%) of Cd exposure in the general non-smoking population (Järup and Akesson, 2009). Concentrations of Cd were determined in various organs of experimental animals (Massányi *et al*., 2001; Kolesárová *et al*., 2008). In respect to bone, which is one of the important organs for Cd toxicity (WHO, 1992), exposure to Cd has been linked to bone loss, low bone mass, and osteoporosis and even to an increased incidence of bone fractures (Wilson *et al*., 1996; Wang *et al*., 2003). The results obtained by Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk (2005) have shown that chronic, even low-level exposure to Cd disturbs bone metabolism during skeletal development and maturity by affecting bone turnover most probably through a direct influence on bone formation and resorption, and indirectly via disorders in Ca metabolism.

Diazinon (DZN) is a contact organophosphate pesticide which is extensively used in agriculture (Salehi *et al*., 2009). Like other organophosphates (OPs), the main toxic action of DZN is inhibition of acetylcholinesterase activity (AChE) which results in accumulation of acetylcholine

(ACh) and associated neurotoxicity (Oruc and Usta, 2007). According to Garg *et al*. (2004), a potential target of pesticide toxicity is the skeletal system. Marked impairment in the development of the backbone in ducklings due to OPs toxicity has been observed in the study by Ludle *et al*. (1979). Higher amounts of DZN caused additional defects in quail and chicken including folding of the spinal chord, shortening of the neck (Wyttenbach and Hwang, 1984), fusing and twisting of vertebrae, abnormal development of ribs and breastbone (Meneely and Wyttenbach, 1989), curled claws, reduced growth of leg and wing bones (Cho and Lee, 1990), and reduced bone calcification (Cho and Lee, 1991). In addition, OPs cause a significant reduction in bone mass and density in individuals following chronic low-level intoxication (Compston *et al*., 1999). Results by Lari *et al*. (2011) indicate that DZN exposure is associated with decrease in trabecular and cortical bone density and might be one of the causes for worldwide increasing prevalence of osteoporosis.
The aim of current study was to investigate the osteotoxic effect of peroral Cd-DZN co-administration on bone in adult male rats.

Materials and methods
Our experiment was conducted on twenty 1-month-old male Wistar rats obtained from the accredited experimental laboratory (number SK PC 50004) of the Slovak University of Agriculture in Nitra. Clinically healthy rats were randomly divided into two groups, of 10 animals each. In the first group (A), young males were dosed with a daily intake of 30 mg $CdCl_2$/L in combination with 40 mg DZN/L in drinking water for 90 days. The second group without Cd and DZN supplementation served as a control (group B). The xenobiotics used in our experiment were chosen on the basis of their possible occurrence in the human and animal food (Toman *et al*., 2011). Indeed, correlation coefficients found between Cd and DZN in men (0.70) and women (0.69) indicate high probability of exposure to both compounds (Toman *et al*., 2012). The doses of Cd and DZN were high enough to reach a toxicity level but also safe enough to prevent animal mortality. All procedures were approved by the Animal Experimental Committee of the Slovak Republic. At the end of the experiment, all animals were killed and their right femora were used for microscopic analysis. Each right femur was sectioned at the midshaft of its diaphysis. The obtained segments were placed in HistoChoice fixative (Amresco, USA). Specimens were then dehydrated in ascending grades of ethanol and embedded in epoxy resin Biodur (Günter von Hagens, Heidelberg, Germany) according to Martiniaková *et al*. (2007). Transverse thin sections (70-80 µm) were prepared with a sawing microtome (Leitz 1600, Leica, Wetzlar, Germany) and affixed to glass slides by Eukitt (Merck, Darmstadt, Germany) as previously described (Martiniaková *et al*., 2008). The qualitative histological characteristics of the compact bone were determined according to the internationally accepted classification systems of Enlow and Brown (1956) and Ricqlés *et al*. (1991), who classified bone into three main categories: primary vascular tissue, non-vascular tissue and Haversian bone tissue. Various patterns of vascularization can occur in primary vascular bone: longitudinal, radial, reticular, plexiform, laminar, lepidosteoid, acellular, fibriform and protohaversian. There are three subcategories indentified in Haversian bone tissue: irregular, endosteal and dense.

Results
Femoral diaphyses of rats from the control group had the following microstructure in common. The internal layer surrounding the medullary cavity (i.e. endosteal border) was formed by non-vascular bone tissue in all views of the thin sections. The bone tissue contained cellular lamellae and osteocytes. Primary and/or secondary osteons were not present. Additionally, there were also identified some areas of primary vascular radial bone tissue in anterior, posterior and lateral views. This type of bone tissue was created by branching or non-

branching vascular canals radiating from the bone marrow cavity. Some primary and secondary osteons were also found especially in the anterior and posterior views near the endosteal surfaces. In the middle part of the compact bone, a few primary and secondary osteons were identified. However, dense Haversian bone tissue characterized by dense concentration of secondary osteons was not observed. Finally, the periosteal border of analysed bones was again composed of non-vascular bone tissue, mainly in the anterior and posterior views (Fig. 1). The rats simultaneously exposed to Cd and DZN displayed a similar microstructure to rats from the control group, except for the middle part of the compact bone where primary vascular radial bone tissue was observed. Vascular canals got shown to have expanded into the central area of the bones from endosteal surface. The canal expansion was in some cases so enormous that the canals also occurred near periosteal surfaces. As a result of this process, a smaller number of primary and secondary osteons was identified in the Cd-DZN-intoxicated rats (Fig. 2).

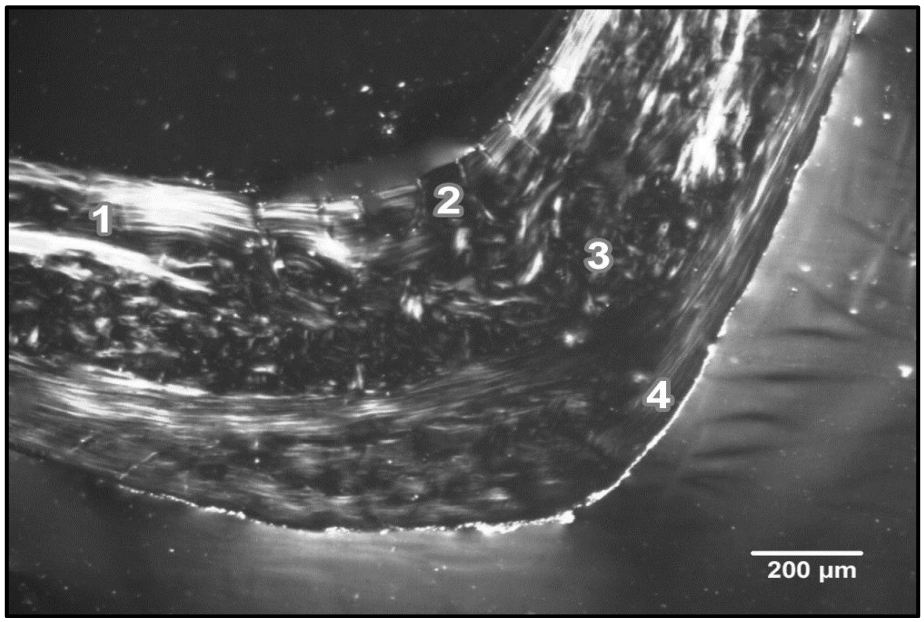


Fig. 1 Microscopic structure of compact bone in rat from the control group:
1 non-vascular bone tissue. 2 vascular canals radiating from marrow cavity. 3 primary and secondary osteons in middle part of compact bone. 4 non-vascular bone tissue

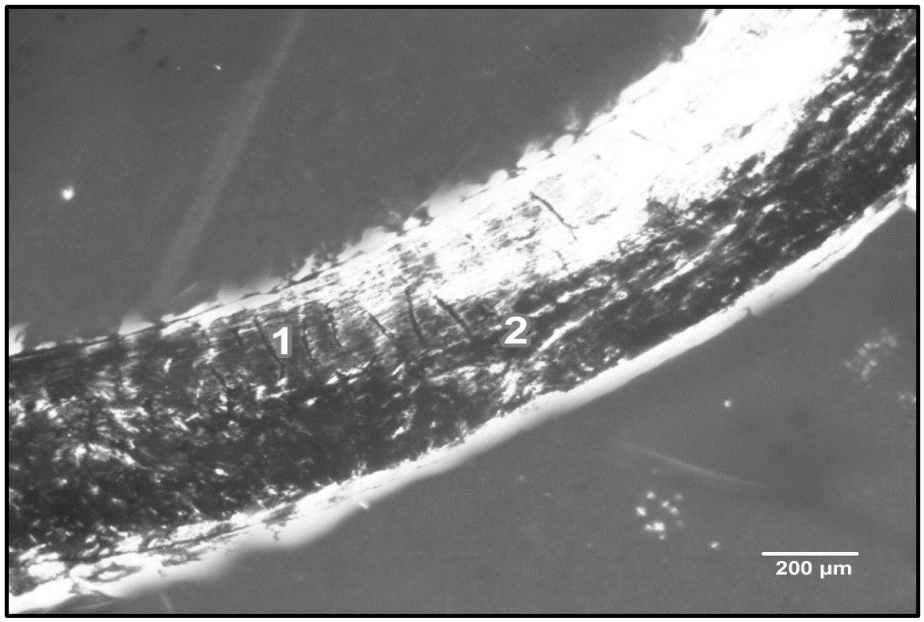


Fig. 2 Microscopic structure of compact bone in Cd-DZN-exposed rats:
1 Enormous vascular canals radiating from marrow cavity. 2 Smaller number of primary and secondary osteons in middle part of compact bone.

Discussion

The results of the qualitative histological analysis of femurs from the control rats correspond with previous works (Enlow a Brown, 1958; Martiniaková *et al*., 2005; Reim *et al*., 2008; Martiniaková *et al*., 2009). The basic structural pattern of compact bone tissue was non-vascular. In addition, there were some areas of primary vascular radial and/or irregular Haversian bone tissues. However, there was no evidence of true Haversian intracortical bone remodeling. It is generally known that aged rats and mice lack true Haversian cortical bone remodeling but not cancellous bone remodeling (Erben *et al*., 1996; Reim *et al*., 2008). Therefore, some secondary osteons can be observed in the long bones (near the endosteal border). In our study, the newly formed remodeling units within compact bone originated from the endocortical surface and extended deep into the underlying compact bone. The same findings have also been documented in the study of Reim *et al*. (2008) in 13 month-old male rats. Prolonged intake of Cd and DZN mixture resulted in induction of demonstrable changes in the middle part of compact bone where vascular canals expanded from endosteal border and led to the formation of primary vascular radial bone tissue. In some cases, vascular canals were also present near periosteal surfaces. The final result of this process was a smaller number of primary and secondary osteons indicating the reduced bone mechanical properties. In general, bone is dynamic tissue that is continuously remodeled to remove microfractures, to adapt to changing mechanical strains and metabolic demands (Hofstetter, 2007; Chen *et al*., 2009). Disappearance of the Haversian canal system, which was replaced by a large quantity of degenerated, necrotic, and restorative tissues have been demonstrated in the study by Li *et al*. (1997) for ovariectomized rats after a long-term Cd administration. Also, Cd-induced apoptosis of bone cells was documented in many studies (Chen *et al*., 2009; Smith *et al*., 2009; Arbon *et al*., 2012; Brama *et al*., 2012). Furthermore, decreased number of active osteons in broiler chicks was found after exposure to OP pesticides (Garg *et al*., 2004). In general, DZN exerts its toxicity through inhibition of AChE. According to Genever *et al*. (1999) and Inkson *et al*. (2004), this enzyme is also expressed by osteoblasts suggesting a role for AChE (i.e. bone matrix protein) in bone tissue. Thus, the expression of high levels of AChE in bone-forming osteoblasts

and their progenitors supports a toxic effect of AChE inhibitors (including DZN) on these cells (Genever *et al*., 1999; Grisaru *et al*., 1999; Inkson *et al*., 2004; Hoogduijn *et al*., 2006). On the basis of all mentioned findings we propose that the formation of primary vascular bone tissue, mainly in the central area of the femur, could be explained as an adaptive response of bone to Cd-DZN toxicity, in order to protect the tissue against death of cells and subsequent necrosis.

Conclusions

Simultaneous peroral exposure to Cd and DZN had the osteotoxic effect on femurs in adult male rats. Co-administration to Cd and DZN affected mainly the middle part of rats' bones where primary vascular radial bone tissue was identified as a result of adaptive response to xenobiotic-induced osteonecrosis. On the other hand, the vascular canal expansion into central area of *substantia compacta* led to a smaller number of primary and secondary osteons signalizing weakened mechanical properties of the bones.

Acknowledgments: This study was supported by the grants KEGA 035UKF-4/2013, VEGA 1/0790/11 and UGA VII/28/2013

References

ARBON, K. S., C. M. CHRISTENSEN, W. A. HARVEY a S. J. HEGGLAND, 2012. Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. In: *Food Chem. Toxicol*. Vol. 50, pp. 198-205.

BRAMA, M., L. POLITI, P. SANTINI, S. MIGLIACCIO a R. SCANDURRA, 2012. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. In: *J. Endocrinol. Invest*. Vol. 35, pp. 198-208.

BRZÓSKA, M. M. a J. MONIUSZKO-JAKONIUK, 2005. Disorders in bone metabolism of female rats chronically exposed to cadmium. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol*. Vol. 202, pp. 68–83.

CHEN, X., G. ZHU, S. GU, T. JIN a C. SHAO, 2009. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts *in vitro*. In: *Environ. Toxicol. Pharmacol*. Vol. 28, pp. 232–236.

CHO, J. a C. LEE, 1990. Effects of diazinon on the anatomical and embryological changes in the developing chick embryo. In: *Res. Rep. RDA(V)*. Vol. 32, pp. 35-47.

CHO, J. a C. LEE, 1991. Studies on diazinon induced inhibition of skeletal mineralization in chick embryo. In: *Res. Rep. RDA(V)*. Vol. 33, pp. 41-60.

COMPSTON, J. E., S. VEDI, A. B. STEPHEN, S. BORD, A. R. LYONS, S. J. HODGES a B. E. SCAMMELL, 1999. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. In: *Lancet*. Vol. 354, pp. 1791–1792.

ENLOW, D. H. a S. O. BROWN, 1956. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part I. In: *Texas J. Sci*. Vol. 8, pp. 405-412.

ENLOW, D. H. a S. O. BROWN, 1958. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part III. In: *Texas J. Sci*. Vol. 10, pp. 187-230.

ERBEN, R. G., 1996. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? In: *Anat. Rec.* Vol. 246, pp. 39–46.

GARG, U. K., A. K. PAL, G. J. JHA a S. B. JADHAO, 2004. Pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides on bone health of broiler chicks. In: *Toxicologic. Pathol*. Vol. 32, pp. 364–369.

GENEVER, P. G., M. A. BIRCH, E. BROWN a T. M. SKERRY, 1999. Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone? In: *Bone*. Vol. 24, pp. 297–304.

GRISARU, D., E. LEV-LEHMAN, M. SCHAPIRA, E. CHAIKIN, J. B. LESSING, A. ELDOR, F. ECKSTEIN a H. SOREQ, 1999. Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenically active 39 alternative splicing variant of acetylcholinesterase. In: *Mol. Cell Biol*. Vol. 19, pp. 788-795.

HOFSTETTER, W., 2007. Bone remodeling. In: *Eur. Cell. Mater*. Vol. 14, p. 31.

HOOGDUIJN, M. J., Z. RAKONCZAY a P. G. GENEVER, 2006. The effects of anticholinergic insecticides on human mesenchymal stem cells. In: *Toxicol. Sci*. Vol. 94, pp. 342–350.

INKSON, C. A., A. C. BRABBS, T. S. GREWAL, T. M. SKERRY a P. G. GENEVER, 2004. Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation. In: *Bone*. Vol. 35, pp. 819–827.

JÄRUP, L. a A. ÁKESSON, 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol*. Vol. 238, pp. 201–208.

KOLESÁROVÁ, A., J. SLAMEČKA, R. JURČÍK, F. TATARUCH, N. LUKÁČ, J. KOVÁČIK, M. CAPCAROVÁ, M. VALENT a P. MASSÁNYI. 2008. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. In: J. Envir. Sci. Health A, Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. Vol. 43, pp. 646-650.

LARI, R., M. H. ELAHI a P. LARI, 2011. Diazinon exposure reduces trabecular and cortical bone mineral density. In: *„Promoting Health Through Sustainable Chemical and Drug Safety Initiatives": 10th Scientific Congress of the Asia Pacific Association of Medical Toxicology*. Penang, Malaysia: Universiti Sains Malaysia, s. P85.

LI, J. P., T. AKIBA a F. MARUMO, 1997. Long-term, low-dose, cadmium-induced nephropathy with renal osteopathy in ovariectomized rats. In: *J. Toxicol. Sci*. Vol. 22, pp. 185-198.

LUDLE, J. L., M. P. MEHRLE, L. M. FOSTER a T. EARLKAISER, 1979. Bone development in black ducks as affected by dietarytoxophene. In: *Pestic. Biochem. Physiol.* Vol. 10, pp. 168–173.

MARTINIAKOVÁ, M., B. GROSSKOPF, M. VONDRÁKOVÁ, R. OMELKA a M. FABIŠ, 2005. Observation of the microstructure of rat cortical bone tissue. In: *Scripta Med*. Vol. 78, pp. 45-50.

MARTINIAKOVÁ, M., B. GROSSKOPF, R. OMELKA, K. DAMMERS, M. VONDRÁKOVÁ a M. BAUEROVÁ, 2007. Histological study of compact bone tissue in some mammals: a method for species determination. In: *Int. J. Osteoarch*. Vol. 17, pp. 82-90.

MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, B. GROSSKOPF, A. V. SIROTKIN a P. CHRENEK, 2008. Sex-related variation in compact bone microstructure of the femoral diaphysis in juvenile rabbits. In: *Acta Vet. Scand*. Vol. 50, p. 15.

MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, B. GROSSKOPF, Z. MOKOŠOVÁ a R. TOMAN, 2009. Histological analysis of compact bone tissue in adult laboratory rats. In: *Slovak J. Anim. Sci*. Vol. 42, pp. 56-59.

MASSÁNYI, P., P. NAĎ, R. TOMAN a J. KOVÁČIK, 2001. Concentration of cadmium, lead, nickel, copper and zinc in various muscles of sheep. In: *Die Bodenkultur*. Vol. 52, pp. 255-258. ISSN 0006-5471.

MENEELY, G. A. a C. R. WYTTENBACH, 1989. Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bobwhite quail embryos: Skeletal defects and acetylcholinesterase embryos: Skeletal defects and acetylcholinesterase activity. In: *J. Exp. Zool.* Vol. 252, pp. 60-70.

ORUC, Ö. E. a D. USTA, 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. In: *Environ. Toxicol. Pharmacol*. Vol. 23, pp. 48–55.

REIM, N. S., B. BREIG, K. STAHR, J. EBERLE, A. HOEFLICH, E. WOLF a R. G. ERBEN, 2008. Cortical bone loss in androgen-deficient aged male rats is mainly caused by increased endocortical bone remodeling. In: *J. Bone Miner. Res*. Vol. 23, pp. 694-704.

RICQLÉS, A. J. de, F. J. MEUNIER, J. CASTANET a H. FRANCILLON–VIEILLOT, 1991. Comparative microstructure of bone. In: B. K. Hall, (ed.): *Bone 3, Bone Matrix and Bone Specific Products*. Boca Raton: CRC Press, s. 1-78. ISBN 0-8493-8823-6.

SALEHI, M., M. JAFARI, M. S. MOQADAM, M. SALIMIAN, A. R. ASGHARI, M. NATEGHI, M. ABASNEJAD a M. HAGGHOLAMALI, 2009. The effect of diazinon on rat brain antioxidant system. In: *Toxicol. Lett*. Vol. 189S, p. 123S.

SMITH, S. S., J. R. REYES, K. S. ARBON, W. A. HARVEY, L. M. HUNT a S. J. HEGGLAND, 2009. Cadmium-induced decrease in RUNX2 mRNA expression and recovery by the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) in the human osteoblast-like cell line, Saos-2. In: *Toxicol. In Vitro*. Vol. 23, pp. 60–66.

TOMAN, R., M. ADAMKOVIČOVÁ, S. HLUCHÝ, M. CABAJ a J. GOLIAN, 2011. Quantitative analysis of the rat testes after an acute cadmium and diazinon administration. In: *Animal Sci. Biotech*. Vol. 44, pp. 188-191.

TOMAN, R., S. HLUCHÝ, J. GOLIAN, M. CABAJ a M. ADAMKOVIČOVÁ, 2012. Diazinon and cadmium neurotoxicity in rats after an experimental administration. In: *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 45, pp. 137-141.

WANG H., G. ZHU, Y. SHI, S. WENG, T. JIN, Q. KONG a G. F. NORDBERG, 2003. Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. In: *J. Bone Miner. Res*. Vol. 18, pp. 553–560.

WHO: Environmental Health Criteria 134, *Cadmium.* Geneva: IPCS; 1992.

WILSON, A. K., E. A. CERNY, B. D. SMITH, A. WAGH a M. H. BHATTACHARYYA, 1996. Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 140, pp. 451–460.

WYTTENBACH, C. R. a J. D. HWANG, 1984. Relationship between insecticide-induced short and wry neck and cervical defects visible histologically shortly after treatment of chick embryos. In: *J. Exp. Zool.* Vol. 229, pp. 437-446.

USE OF SISTER CHROMATID EXCHANGES AND COMET ASSAY IN GENETIC RISK ASSESMENT

Monika DRÁŽOVSKÁ, Katarína ŠIVIKOVÁ, Ján DIANOVSKÝ, Beáta HOLEČKOVÁ, Martina GALDÍKOVÁ

Department of Biology and Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice
Corresponding author: drazovska@gmail.com

ABSRACT

Sister chromatid exchanges (SCEs) and comet assay (SCGE) are considered as sensitive bioindicators for detection of genotoxic activity of chemicals agents. Both methods, SCEs and SCGE were used for evaluation of genotoxic/cytotoxic effects after treatment of cultured bovine peripheral lymphocytes with neonicotinoid insecticide Calypso 480 SC (active ingredient: thiacloprid). Frequency of SCEs, proliferation indices (PI) and % DNA in tail were evaluated. For 24h, a weak statistical significance increase of SCEs was observed at the concentration of 240 and 480 $\mu g.ml^{-1}$ in donor 2. Reduction of PI was obtained only at the highest concentration. For 48h statistical significant elevation in the SCE frequency was found at concentrations ranging from 120 to 480 $\mu g.ml^{-1}$ in each donor. Reduction of the PI was recorded at these concentrations too, but most significantly at highest dose (480 $\mu g.ml^{-1}$) in both donors. A statistical significance in the increase of DNA strand breaks was seen at the concentration ranged from 60 to 480 $\mu g.ml^{-1}$ for 1h with the same compound by comet assay.

Keywords: sister chromatid exchanges, comet assay, genotoxicity, cytotoxicity, thiacloprid

INTRODUCTION

SCEs belong to the most frequently employed cytogenetic biomarkers. Despite the lack of specificity in the detection of mutagenic activity of chemical agents they remain very attractive in short term assays **(Tucker** and **Preston, 1996)** *in vivo* and also *in vitro* **(Tucker et al., 1993)**. Most studies that involve SCEs analysis have been carried out in humans and rodents **(Arruga et al., 1992)**. As the basic component of the feed of ruminants is of plant origin, they represent the first consumers exposed to environmental mutagens. Thus biomonitoring studies using farm animals could be very useful and sensitive indicator to evaluate the genotoxic effect chemical substances with predictive value for human health risks **(Parada** and **Jaszczak, 1993)**.

SCEs represent the cytological manifestation of interchanges between DNA replication products at apparently homologous loci **(Tucker et al., 1993)**. The mechanism of SCE formation is still not known, though they appear to be a consequence of errors of DNA replication, possibly at the replication fork itself **(Painter, 1980)**. There is no direct association between SCE induction and an adverse health outcome. Thus, the analysis of SCEs has limited value in risk assessment; however, they are except as a biomarker of exposure **(Tucker** and **Preston, 1996)**.

The comet assay or single cell gel electrophoresis (SCGE) is a simple and frequently used method for measuring DNA strand breaks in eukaryotic cells. The assay attracts adherents except its simplicity also by its sensitivity, versatility, speed and economy. This assay has become one of standard methods for assessing DNA damage, with applications in genotoxicity testing, ecogenotoxicology, human biomonitoring as well as fundamental research in DNA damage and repair **(Collins, 2004)**. At present, two basic modifications of the comet assay are used – alkaline SCGE, and neutral SCGE. Both methods were developed by

Östling and **Johanson (1984)**. Alkaline SCGE is applied for detection single strand breaks; neutral SCGE is applied for detection double strand breaks **(Dvořák and Matejovičová, 2008)**.

The principle of alkaline SCGE is that cells embedded in agarose on a microscope slide are lysed with detergent and high salt to form nucleoids containing supercoiled loops of DNA. Loops containing a break lose their supercoiling and become free to extend toward the anode therefore they escape from the nucleoid comet head to form a tail. Finally, electrophoresis at high pH result in structures resembling comets, which can be observed by fluorescence microscopy **(Collins, 2004; Horváthová et al., 2004)**.

In this study, SCE analysis and SCGE were used for assessing of genotoxic/cytotoxic effects of commercial neonicotinoid insecticide Calypso 480 SC (active ingredient: thiacloprid) in bovine peripheral lymphocyte. As additional endpoints, the proliferation indices (PI) were evaluated to detect cytotoxic activity of the insecticide. Neonicotinoids represent a new class of synthetic insecticides that are widely used to control sucking insects. They act as agonist at the insect nicotinic acetylcholine receptor **(Tomizawa and Casida, 2003)**. Genotoxic effects are considered as most serious of the possible potential side effects of agricultural agents **(Anwar, 1997)**. The genotoxic effect of the thiacloprid insecticide was reported by **Kocaman et al. (in press)** in human peripheral blood lymphocytes using chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei. In another study Comet assay was applied to detect the genotoxic and cytotoxic effects of neonicotinoid insecticides in human peripheral lymphocytes *in vitro* **Calderón-Segura et al. (in press)**.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed with peripheral blood obtained from two healthy bull donors (Slovak spotted cattle, 6 months old). Calypso 480 SC (with active component thiacloprid) was used as toxic substance. The agent was dissolved in purified water and applied into culture flasks at concentration of 30, 60, 120, 240 and 480 $\mu g.ml^{-1}$. For the SCEs analysis, mitomycin C (MMC, Sigma, St. Louis, MO, USA; 0.4 $\mu g.ml^{-1}$) and for the comet assay, hydrogen peroxide (H_2O_2, Mikrochem, SR; 300 µM) were used as positive control agents.

Sister chromatid exchanges test

Whole blood (0.5 ml) was cultivated for 72 h at 38°C in 5 ml of RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine and HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 15% foetal calf serum, antibiotics (streptomycin 250 $\mu g.ml^{-1}$ and penicillin 250 $U.ml^{-1}$) and phytohaemagglutinine (PHA, Welcome, Dartford, England; 180 $\mu g.ml^{-1}$).

Chromosome preparations were obtained by the standard cytogenetic method. Bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma, St. Louis, MO, USA; 8 $\mu g.ml^{-1}$) was supplemented to all groups 24 h after the initial divisions. Experimental lymphocyte cultures were exposed to the insecticide Calypso 480 SC for the last 24 h and 48 h. 2 h before harvest, colchicine (Merck, Darmstadt, Germany; 5 $\mu g.ml^{-1}$) was added to control and also to experimental cultures. The slides were prepared by an air-dried method and stained with the fluorescence plus Giemsa (FPG) technique to differentiate sister chromatids and cell cycles.

Comet assay

Whole blood was diluted with PBS buffer (1:1) and subsequently suspension was layered at separation medium (Histopaque). After centrifugation at 1000 rpm for 15 min according to **Singh** and **Stephens (1997)** lymphocyte were harvested and suspended with PBS buffer in total volume of 1 ml.

Bovine peripheral lymphocytes (0,3 ml) were incubated with insecticide Calypso 480 SC at each concentration in 4,7 ml of 1640 RPMI medium supplemented with L-glutamine and

HEPES (Sigma) including 15% fetal calf serum, 2% phytohemagglutinin (PHA, Welcome, Dartford, England; 180 μg.ml^{-1}) and antibiotics (streptomycin 250 μg.ml^{-1} and penicillin 250 U.ml^{-1}) at 37°C for 1 h according to **Chen et al. (2008)**. After treatments, the cells were centrifuged at 1800 rpm for 3 min and then were mixed with low melting point agarose for the alkaline comet assay.

Each concentration was represented by three microscope slides or gels. Plain glass microscope slides were pre-coated by dipping in a solution of 1% normal melting point agarose (NMP, Serva, Germany) in distilled water and drying at room temperature. This pre-coating ensures adhesion of agarose gels that has been used subsequently. 100 μl 1% NMP diluted in PBS buffer and 85 μl cells suspension mixed in 0.75 % low melting point agarose by Serva were placed on microscope slide. Each layer was left to set at 4°C and cover-slips were removed. Microscope slides were placed into lysis solution (2.5 M NaCl, 0.1 M Na_2EDTA, 10 mM Tris, plus 1% Triton X-100) for 1 h at 4°C. Slides were then placed in horizontal gel electrophoresis tank and immersed in 0.3 M NaOH, 1 mM Na_2EDTA for 40 min, before electrophoresis at 25 V (300 mA) for 30 min at 4°C. After electrophoresis, slides were neutralized by washing three times for 5 min with 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5. Finely slides were stained with 20 μl ethidium bromide (5 μg/ml) and covered with cover-slip. Comets were analyzed by NIKON Labophot 2A fluorescence microscope, equipped with single band pass filter Texas Red.

For SCEs frequencies, fifty differentially stained well-spread metaphases (Figure 1a) per donor and at the different concentrations were examined and 100 metaphases were analyzed for determination of M_1, M_2 and M_3 mitotic divisions and subsequent calculation of the proliferation index according to **Lamberti et al. (1983)**.

A total of 100 comets on each slide were classified visually into five categories (Figure 1b, 1c); based on the DNA fluorescence intensity in proportion comet tail and head, and an overall score for each gel of between 0 (all undamaged) and 400 (all maximally damaged) was calculated.

Statistical analysis of results was performed using simple analysis of variance (ANOVA), and then the Student's t test was applied to evaluate SCE occurrence and DNA breaks between treated and untreated groups. Chi square test (χ^2) was applied for estimation of the cell cycle delay too.

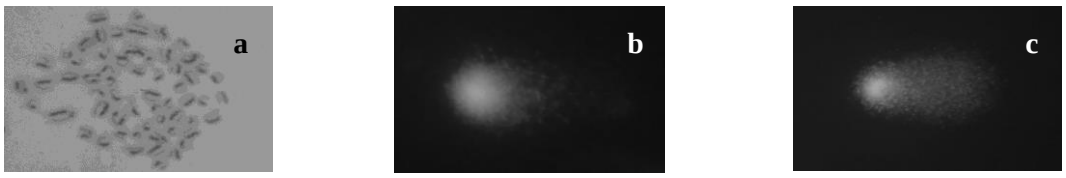


Figure 1

a – metaphases in M_2 mitotic division; b, c – different categories of comets

RESULTS and DISCUSSION

The results obtained from the SCE studies and lymphocyte proliferation kinetics after exposure to thiacloprid-based insecticide for 24 and 48 h are summarized in Figure 2 and 3.

For 24h no significant elevation in the SCE frequency was obtained in donor 1. A weak statistical significance in the increase of SCEs was observed in donor 2 after exposure to the insecticide at the concentration of 240 and 480 μg.ml^{-1}. The highest concentration also reflected in a reduction of the PI ($p < 0.05$, ANOVA, Student's *t* test, and χ^2 test, respectively, Fig. 2).

In the experiments for 48h a statistical significance in the increase of frequency SCEs was found after the treatment with the neonicotinoid insecticide Calypso 480 SC at

concentrations ranging from 120 to 480 µg.ml^{-1} in each donor ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively, by ANOVA and Student's *t* test, Figure 3). These results were reflected in the reduction of the PI most significantly at highest dose (480 µg.ml^{-1}, $p < 0.01$, χ^2 test) in both donors (Fig. 3)

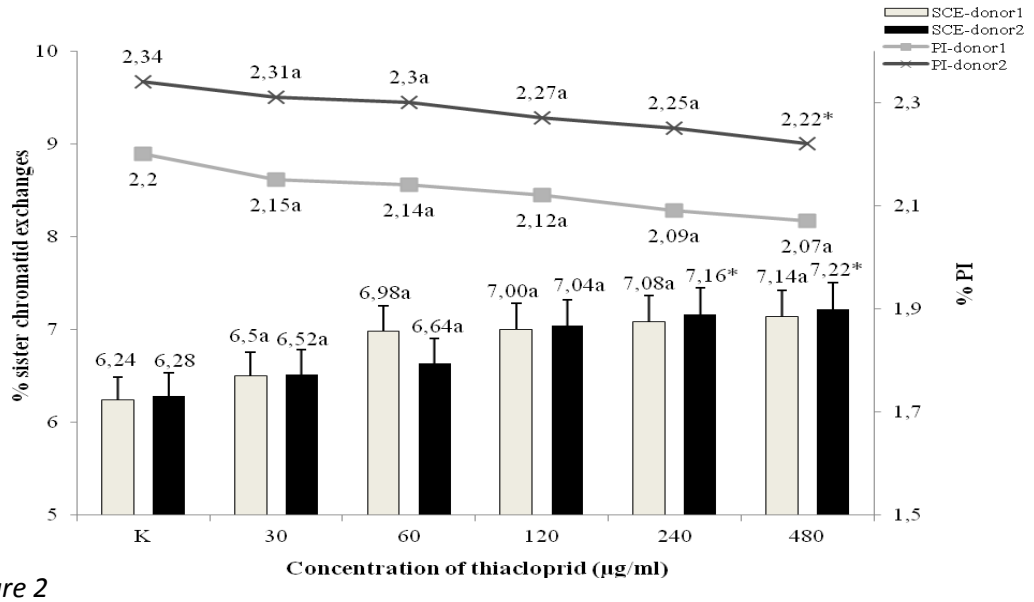


Figure 2

Frequency of SCEs and proliferation indices in cultured peripheral lymphocytes exposed to the insecticide thiacloprid for 24h

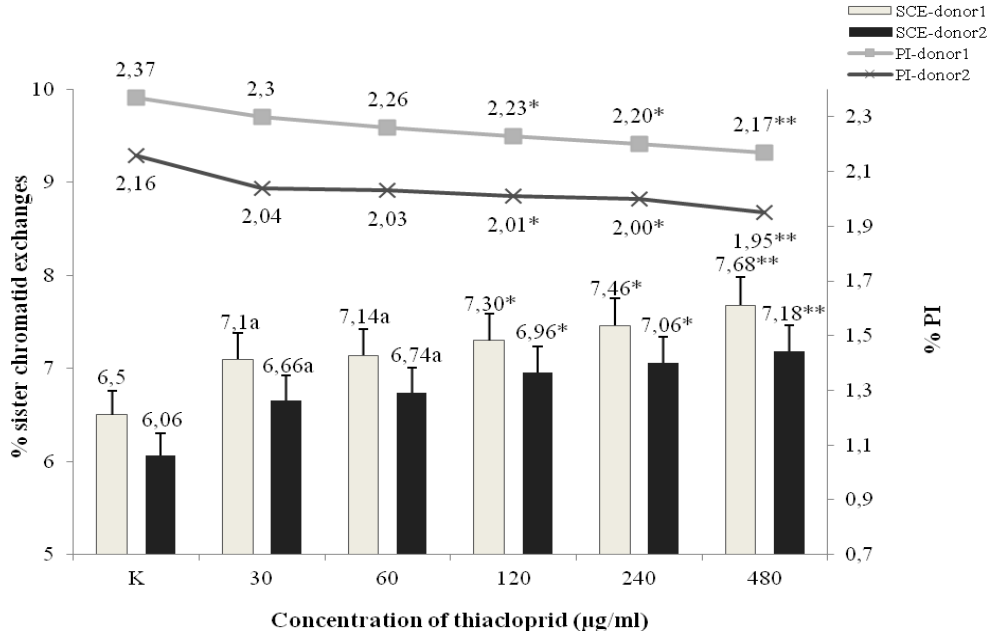


Figure 3

Frequency of SCEs and proliferation indices in cultured peripheral lymphocytes exposed to the insecticide thiacloprid for 48h

A total of 50 second - division metaphases of each group were analysed for SCE
* (P<0.05), ** (P<0.01), *** (P<0.001) - statistical significant data, ANOVA, Student`s t test was used for SCE and χ^2 test for the PI a - no statistical significance.

The results of DNA strand breaks after treatment with various concentrations of the insecticide tested in bovine peripheral lymphocytes are shown in Figure 4. After treatment of the bovine peripheral lymphocytes with the insecticide for 1h an increase in DNA damage was found. A dose dependence in elevations of DNA strand breaks was seen at the concentrations ranged from 60 $\mu g.ml^{-1}$ ($p < 0.05$) to 480 $\mu g.ml^{-1}$ ($p < 0.01$).

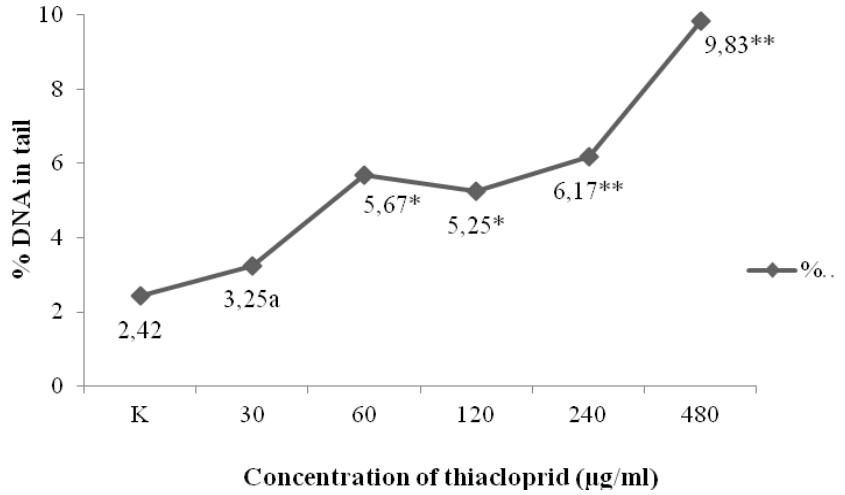


Figure 4

DNA damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to different doses of insecticide thiacloprid for 1h

SCEs are widely used in cytogenetic studies and they are considered as very sensitive bioindicators for the assessment genotoxic agents **(Šiviková and Dianovský, 2006)**. The ratio of induced SCEs is different for each compound, suggesting that each type of lesion formed is processed by the cell to form either an SCE, an aberration, or a mutation (Carrano and Natarajan, 1988). The reduction of PI represents an additional check on the chemical agent potency that can be interpreted as cell cycle delays and/or in terms of induced cytotoxicity. A more expressive cytotoxic effect was found with the prolonged time sampling of insecticide incubation. With respect to found cell proliferation delay, treatment for 48h incubation was provided to confirm evidence of insecticide genotoxicity.

The alkaline comet assay is an excellent and sensitive test for the detection of DNA damage induced by chemicals agents, such as pesticides **(Calderón-Segura, in press)**. According to **Tice et al. (2000),** comet assay, in comparison with other cytogenetic tests, such as sister chromatid exchanges, micronuclei formation and chromosomal aberration assays, is the most rapid and sensitive method to evaluate the genotoxic agents. Also **Feng et al. (2005)** indicates that the comet assay was more sensitive than SCEs test. On the other hand **Hartmann et al. (1995)** reported that comet assay was 100 times less sensitive than the SCEs test. Our study indicated genotoxic/and cytotoxic effect of insecticide Calypso 480 SC in bovine peripheral lymphocytes *in vitro*.

Aknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic through contract no. VEGA1/0125/11 and VEGA 1/0117/13.

REFERENCES

ANWAR, W.A. 1997. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 105 (4), 801-806.

ARRUGA, M.V., CATALÁN, J., MORENO, C. 1992. The effect of chloramphenicol on sister chromatid exchange (SCE) in bovine fibroblasts. *Research in Veterinary Science*, 52, 256-259.

COLLINS, A.R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*, 26 (3), 249-261.

CALDERÓN-SEGURA, M.E., GÓMEZ-ARROYO, S., VILLALOBOS-PIETRINI, R., MARTÍNEZ-VALENZUELA, C., CARBAJAL-LÓPEZ, Y., CALDERÓN-ESQUERRO, M.C., CORTÉS-ESLAVA, J., GARCÍA-MARTINÉZ, R., FLORES-RAMÍREZ, D., RODRÍGUEZ- ROMERO, M.I., MÉNDEZ-PÉREZ, P., BAÑUELOS-RUÍZ, E. 2012. Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed *In Vitro* to Neonicotinoid Insecticides News. *Journal of Toxicology*, in press doi:10.1155/2012/612647

CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic technics. *Mutation Research*, 204, 379–406.

DVOŘÁK, M., MATEJOVIČOVÁ, M. 2008. Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chemické listy*, 102, 977-983.

GARCIA-REPETTO, R., MARTÍNEZ, M., REPETTO, M. 1997. Biodisposition study of the organophosphorus pesticide, methyl-parathion, Bull. *Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 901-908.

HARTMANN, A., HERKOMMER, K., GLUCK, M., SPEIT, G. 1995. DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single.cell gel test (comet assay). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25, 180-187.

HORVÁTHOVÁ, E., DUŠINSKÁ, M., SHAPOSHNIKOV, S., COLLINS, A.R. 2004. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, 19 (4), 269-276.

CHEN, C.S., HSEU, Y.C., LIANG, S.H., KUO, J-Y., CHEN, S.C. 2008. Assessment of genotoxicity of methyl-*tert*-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *Journal of Hazardeous Materials*, 153, 351-356.

KOCAMAN A. Y., RENCŸZOĞULLARI E., TOPAKTAŞ M. 2012. *In Vitro* Investigation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Thiacloprid in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environmental Toxicology*, in press, DOI 10.1002/tox.21790.

LAMBERTI, L., PONZETTO, B.P., ARDITO, G. 1983. Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research*, 319, 193-199.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.

PARADA, R., JASZCZAK, K. 1993. A cytogenetic study of cows from a highly industrial or an agricultural region. *Mutation Research*, 300, 259-263.

SINGH, N.P., STEPHENS, R.E. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Research*, 383, 167-175.

ŠIVIKOVÁ, K., DIANOVSKÝ, J. 2006. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, 15-20.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.-C., SSAKI, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.

TOMIZAWA, M., CASIDA, J.E. 2003. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.

TUCKER, J.D., AULETTA, A., CIMINO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R., CARRANO, A.V. 1993. Sister-chromatid exchange: Second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research*, 297, 101-180.

TUCKER, J.D., PRESTON, R.J., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*, 365, 147-159.

Ultrastructural changes in kidneys of newly hatched chicks exposed to cadmium during embryogenesis

Dżugan M.[1], Lutnicka H.[2], Lis M.[2], Droba M.[1], Niedziółka J.[2]

[1]Department of Chemistry and Food Toxicology, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, Poland, e-mail: mdzugan@univ.rzeszow.pl
[2]Department of Poultry and Fur Animals Breeding and Animal Hygiene, University of Agriculture in Kraków, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Poland

Cadmium, an important environmental toxic agent has the kidney as its most important target organ. It is concentrated mainly in the renal cortex. In humans, excessive renal accumulation of cadmium causes well defined morphological and ultrastructural, pathological changes in the proximal tubules. In this study, the effect of cadmium (Cd) injected *in ovo* on ultrastructural alterations of kidney of chicken embryos were studied using transmission electron microscopy. Cadmium (3 and 6 µg per egg) was injected, on the 4th day of incubation, to broilers eggs (n=50 per group) with live embryos whereas control group (n=50) was injected with saline solution. After hatching, kidneys were taken and fixed in glutaraldehyde solution for electron microscopic observations.

Ultrastructural changes in kidney of chicks exposed to cadmium were observed in all organelle and cytoplasm of the epithelial cells in renal tubules. Moreover strong adverse effect with increasing cadmium dose was observed. The most advanced ultrastructural changes were observed in mitochondria. Part of them was completely destroyed. Many of them were swollen. Their external and internal membranes were locally destroyed. Mitochondrial inner structure was partially damaged. The most characteristic pathological change in mitochondria was dilation of the space between mitochondrial crests and these places had lower electron density in relation to other matrix. The membranes of other organelle were locally destroyed. The rough endoplasmic reticulum (RER) was observed rarely as well as its ribosomes. The strong process of RER fragmentation was observed. The ends of the cisterns of Golgi apparatus were dilated. The structure of brush border of the epithelial cells was slightly and locally destroyed. Some lysosomes were observed. The nuclear membranes of the epithelial cells of the renal tubules were locally damaged. The lysis of cytoplasm of some cells was seen.

It was established that cadmium was toxic for kidney and caused structural damage. Cadmium injected *in ovo* resulted mainly in severe damage of mitochondria, but other organelle and cytoplasm were damaged too. The pathological alterations were depended on Cd dose.

***Key words**:* cadmium, chicken embryos, kidney, pathological alterations, electron microscopy

PATULIN – INDUCED CHANGES IN HAEMATOLOGICAL PARAMETERS OF RABBITS FED BY STRAWBERRY LEAVES AFTER CHRONIC EXPOSURE

Jana Emrichova[1], Anna Kalafova[1] Katarina Zbynovska[1], Peter Petruska[1], Lubomir Ondruska[2], Rastislav Jurcik[2], Lubica Chrastinova[2], Anton Kovacik[1], Monika Schneidgenova[1], Peter Cupka[1], Marcela Capcarova[1]*

[1]Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

[2]Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecka 2, 949 01 Nitra, Slovak Republic

***** Corresponding author: e-mail: Jana Emrichova <emrichova@gmail.com>

INTRODUCTION

The flavonoids are a large group of naturally occurring compounds that are found in plants and are frequently consumed as part of the human diet. Flavonoids seem to play an important role in human health and to possess beneficial effects in the prevention of human diseases (*Deepshikha et al.,* 2008; *Mareš et al.,* 2008). Strawberry leaves have higher oxygen radical absorbance capacity (ORAC) than fruits (*Shiow et al*., 2000). This leaves as phytogenic feed additive can improve welfare (*Mareš et al.,* 2008), restrict growth of fungi (*Marcinčák et al.,* 2010).

LITERATURE SURVEY

The strawberry leaves contain a wide range of phenolic compound (*Hanhineva et al.,* 2009), quercitrin, quercetin (*Dreyer et al.,* 2010; *Oberbeil et al.,* 2005), myricetin, kaempferol and epikatechin (*Minárik,* 2009).

Phytogenic feed additives are defined as a herbal substances included in the feed mixure for the purpose of enhancing production performance, improving performance feed and increase of quality animal products (*Václavková et al.,* 2010). Natural substances contained in these phytogenic feed additives affect (can improve) the sensory quality of feed (*Mareš et al.,* 2008). The use of plants in feed production can be restrict growth of fungi and production of mycotoxins in animals feed. They reduce the need of use drugs. Their feeding does not require of adherence to any withdrawal periods (*Marcinčák et al.,* 2010).

Mycotoxins are secondary metabolites of fungal origin (*Painter et al.,* 2003; *Šimůnek,* 2004; *Serra et al.,* 2005; *Frisvad et al.,* 2006). Patulin is produced by various species of *Aspergillus* and *Penicillium* (*Polster,* 1984; *Betina,* 1990; *Malíř et al.*, 2003; *Frisvad et al.,* 2007; *González et al.,* 2007). Patulin has bacteriostatic, bactericidal and fungicidal effects. It is toxic to plants and animals cells (*Toman et al.,* 2003; *Sabater-Vilar,* 2004), exhibits carcinogenic (*Herzig,* 2002; *Sabater-Vilar,* 2004), mutagenic and teratogenic activity (*Sugiyanto et al.,* 1993; *Schumacher et al.,* 2005), activate gastrointestinal disorders, anaemia, swelling and haemorrhage of various organs (*Jesenská,* 1987; *Rimárová*, 2002; *Sabater-Vilar,* 2004).

The aim of present study was to determinate the effect strawberry leaves inclusion to the feed mixture and single dose of patulin on haematological parameters of rabbits.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diet

Fifteen adult male rabbits of Californian broiler line were used in experiment. Rabbits were obtained from an experimental farm of the Animal Production Research Centre in Nitra, Slovak Republic. Rabbits (in the age of 4 months, weighing 3.5 – 4.0 kg) were housed in individual flat-deck wire cages (area 0.34 m^2). The animals were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Animals were kept in cages, at standard conditions (temperature

20 – 22°C, 14 h light period). Drinking water and feeding mixture for all animals was provided on an *ad libitum* basis. Animals were divided into four groups, one control group C (n =3) and three experimental groups E1, E2 and E3 (n = 4 in each group). Rabbits were fed with a granular feed mixture (FM) with strawberry leaves in various doses and all groups received patulin in injectable form at 10 μg.kg^{-1} for 28 days 2 times a week (Table1).

Table 1.

Concentration of strawberry leaves and patulin of the experimental diet

Group	Concentration of strawberry leaves	Concentration of patulin (μg.kg^{-1})
Control (n = 3)	0 %	10
E1 (n = 4)	0.5 %	10
E2 (n = 4)	1.0 %	10
E3 (n = 4)	1.5 %	10

Blood sampling and analyses

Blood samples from *vena auricularis* were taken from all animals. In whole blood, selected haematological parameters as total white blood cell count (WBC), lymphocytes count (LYM), medium size cell count (MID), granulocytes count (GRA), lymphocyte percentage (LYM%), medium size cell percentage (MI%), granulocytes percentage (GRA%), red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDWc), platelet count (PLT), platelet percentage (PCT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDWc) were measured using haematology analyzer Abacus junior VET (Diatron®, Vienna, Austria).

Statistical analyses

To compare the results, one-way ANOVA test was applied to calculate basic statistic characteristics and to determine significant differences between experimental and control groups. Statistical software SIGMA PLOT 11.0 (Jandel, Corte Madera, CA, USA) was used. Differences were compared for statistical significance at the level $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of blood haematological parameters are summarized in Table 2. Addition of strawberry leaves and patulin influenced some haematological parameters in blood of rabbits. Statistical evaluation showed significant decrease of MCHC ($P < 0.05$) in E2 and E3 group in comparison with the experimental group E1. We observed significant lower values in HGB in E3 group in comparison with the control group. In contrast with results observed by *Petruška et al.* (2012), the values of HGB and MCHC were not influenced ($P > 0.05$) after quercetin/T-2 toxin treatment. Treatment with phytoadditives had no significant effect on HGB of male laboratory mice (*Singh et al.,* 2008) and rats (*Babayi et al.,* 2007; *Chinnadurai et al.,* 2013).

Decrease of HGB and MCHC in our study can related with absence of iron and starting of anaemia (*Rolinec et al.,* 2010; *Bačovský,* 2013). Patulin caused the anaemia in study of *Camguilhem et al.* (1976) in sheep**.** The results of our study showed no significant differences in LYM, MID, RBC, HGB, HTC, MCH, PLT, PTC and MPV after long term application of patulin in combination with strawberry leaves. Selected haematological parameters were not influenced by quercetin and T-2 toxin in another study of *Petruška et al.* (2012).

Table 2.

Haematological parameters of rabbits after strawberry leaves and patulin treatment

Parameter	C	E1	E2	E3
WBC	12.97±1.21	13.53±2.58	13.61±2.25	10.39±2.28
LYM	8.22±2.52	7.39±4.72	7.48±1.98	6.82±1.3
MID	0.58±0.15	0.44±0.27	0.50±0.18	0.54±0.29
GRA	4.17±1.92	5.71±2.45	5.63±0.80	3.03±1.79
LY%	63.03±16.02	51.93±22.37	54.25±6.83	66.27±9.64
MI%	4.53±1.42	3.48±2.32	3.65±1.06	5.33±3.14
GR%	32.47±14.74	44.58±21.40	42.05±7.70	28.43±12.79
RBC	6.39±0.39	6.15±0.58	6.15±0.28	5.91±0.41
HGB	154.94±5.75[a]	148.22±4.78	146.07±6.21	138.17±8.76[b]
HCT	34.29±1.91	32.48±1.34	33.16±1.57	31.59±2.19
MCV	53.72±0.30	53.97±2.74	53.88±0.90	53.46±0.83
MCH	24.27±0.60	24.2±1.42	23.73±0.51	23.37±0.47
MCHC	452.13±8.80	456.46±4.35[a]	440.7±12.67[b]	437.53±3.54[b]
RDWc	18.47±0.57	18.60±0.67	19.2±0.88	18.93±1.10
PLT	256.6±67.09	209.9±68.45	185.9±138.31	183.49±40.79
PCT	0.19±0.05	0.13±0.05	0.12±0.08	0.12±0.03
MPV	7.37±1.15	6.08±0.39	6.98±1.24	6.77±0.70
PDWc	33.27±0.61	30.08±2.10	33.85±4.87	32.57±3.27

[a,b] – means in the same line with the different letters are different at the level $P < 0.05$

WBC - total white blood cell count (10^9/l); LYM - lymphocytes count (10^9/l); MID - medium-size cell count; GRA - granulocytes count (10^9/l); LYM% - lymphocyte percentage; MID% - medium-size cell percentage; GRA% - granulocytes percentage; RBC - red blood cell count (10^{12}/l); HGB - haemoglobin (g/l); HCT - haematocrit (%); MCV - mean corpuscular volume (fl); MCH - mean corpuscular haemoglobin (pg); MCHC - mean corpuscular haemoglobin concentration (g/l); RDWc - red cell distribution width (%); PLT - platelet count (10^9/l); PCT - platelet percentage; MPV - mean platelet volume (fl); PDWc - platelet distribution width (%), C – control group, E1 , E2, E3 – experimental groups. The values shown are the mean ± SD (standard deviation).

CONCLUSIONS

Significant decrease of HGB and MCHC was probably caused by long term exposure of patulin, which can lead to anaemia. Selected concentrations of strawberry leaves in individual doses did not cause protection of the homeostasis. Higher concentrations could act as an antioxidant as we expected. Further experimental studies with strawberry leaves are needed to define the specific mechanisms of action.

Keywords: haematological parameters, strawberry leaves, patulin, rabbit, chronic exposure

Acknowledgments: This work was financially supported by VEGA scientific grant 1/0084/12, 1/0790/11, and KEGA grant 030SPU-4/2012.

REFERENCES

Babayi, H. M., Udeme, J. J., Abalaka, J. A., Okogun, J. I., Salawu, O. A., Akumka, D. D., Adamu Zarma, S. S., Adzu, B. B., Abdulmumuni, S. S., Ibrahime, K., Elisha, B. B., Zakariys, S. S., Inyang, U. S. 2007. Effect of oral administration of aqueous whole extract of Cassytha filiformis on haematograms and plasma biochemical parameters in rats. In *Journal of Medical Toxicology*. 2007, vol. 3, p. 146–151.

Bačovský, J. (2013): Blood count interpretation. [online 5.8. 2013]. http://public.fnol.cz/www/3ik/vyuka/education_english/bacovsky/blood_count_interpretation_1.pdf

Camguilhem, R., Escoula, L., Henry, M. (1976): Toxins of Byssochlamys nivea Westling. I. Preliminary study of toxicity in sheep. Ann Rech Vet. 1976;7(2):177-83.

Chinnadurai, K., Kanwal, H.K., Tyagi, A.K., Stanton, C., Ross, P. (2013): High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. Lipids Health Dis. 2013 Aug 7;12(1):121.

Deepshikha, M., Flora, S. J. S. (2008): Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. In *Biological Trace Element Research.* 2008, vol. 122, p. 137-147.

Dreyer, E.M., Dreyer, W. (2010): Bylinky, plody a houby. Víkend, Český Těšín.

Frisvad, J.C., Thrane, U. (2006): *Mycotoxin production by common filamentous fungi* [online 10.10. 2012]. <http://www.cbs.knaw.nl/food/index.htm>

Gonzáles, J., Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mafles, J. (2007): Exposure assessment to patulin from the consuption of Apple-based products. In *Food additives and Contaminants*. no.24, p.11.

Hanhineva, K., Soininen, P., Anttonen, J.M., Kokko, H., Rogachev, I., Aharoni, A., Laatikainena, R., Kärenlampia, S. (2009): NMR and UPLC-qTOF-MS/MS Characterisation of Novel Phenylethanol Derivatives of Phenylpropanoid Glucosides from the Leaves of Strawberry (*Fragaria* Ą *ananassa* cv. Jonsok). In *Phytochem. Anal.*, vol. 20, p.353–364.

Herzig, I. (2002): Mykotoxiny, jejich výskyt a vliv na zdraví. In *Krmivářství*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně. no. 3, 2002, p. 11-12.

Jesenská, Z. (1987): *Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách*. Bratislava : Alfa, p. 60-320. MHV 063-018-87.

Malíř, F., Ostrý, V. (2003): *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxíny a zdraví člověka.* Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařskych zdravotníckych oboru, p. *25*-349. ISBN 80-7013-395-3.

Marcinčák, S., Popelka, P., Martonová, M., Šimková, J. (2010): Vplyv rastlinných aditív na rastové parametre brojlerových kurčiat. In *Krmivářství,* vol. 6, p. 11 – 12.

Mareš, P., Zeman, L., Večerek, M. (2008): Využití fytogenních přípravku ve výživě zvírat. In *Krmivářství,* vol. 1, p. 21 -23.

Rolinec, M., Bíro, D., Šťastný, P., Kanka, T. (2010): Analyzis of haematological profile of piglets. *In Acta fytotechnica et zootechnica.* Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, p. 40-43.

Minárik, P. (2009): Flavonoidy. Bedeker zdravia, vol. 2, p.70 -71.

Oberbeil, K., Lentzová, CH. (2005): Ovocie a zelenina ako liek. Fortuna Print. Bratislava.

Petruška, P., Capcarová, M. (2012): Effect of chronic application of quercetin and acute dose of T-2 toxin on haematological parameters of rabbits : Vplyv chronickej aplikácie kvarcetínu a akútnej dávky T-2 toxínu na hematologické parametre králika. In *MendelNet 2012.* Brno: Mendelova univerzita, 2012, p. 981--988. ISBN 978-80-7375-563-8.

Rimárová, K. (2002): Karcinogénne látky v životnom prostredí a potravinovom reťazci. In *Životné prostredie*, vol. 36, no. 3, p. 129-132.

Sabater-Vilar, M. (2004): Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. In *Mycopathologia*, vol. 158, no. 4, p. 419-426.

Schumacher, D.M., Metzler, M., Lehmann, L. (2005): Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. In *Arch Toxicol*, vol. 79, p.110–121.

Serra, R., Braga, A., Venancio, A. (2005): Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. In *Research in Microbiology,* vol. 156, 2005, no. 4, p. 515 – 521.

Shiow Y. Wang, Hsin-Shan Lin. (2000): Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 2, p. 140–146.

Šimůnek, J. (2004): *Plísně a mykotoxiny*. Brno. 2004. [cit. 2012-10-10] http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf>.

Singh, A., Singh, S. K. (2008): Reversible antifertility effect of aqueous leaf extract of *Allamanda cathartica* L. in male laboratory mice. In *Andrologia*, vol. 40, 2008, p. 337–345.

Sugiyanto, J., Inouye, M., Oda, S.I., Takagishi, Y., Yamamura, H. (1993): Teratogenicity of patulin, a mycotoxin, in mice. In Environ. Med. 37, p. 43–46.

Toman, R., Golian, J., Massányi, P. (2003): *Toxikológia potravín*. Nitra : SPU v NITRE, p. 62-65. ISBN 80-8069-166-5.

Václavková, E., Lustyková, A. (2010): Fytogénní krmná aditiva ve výživě monogastru. In *Krmivářství,*vol. 6, p. 9 – 10.

SURVEY OF THE MYCOTOXIN CONTAMINATION OF FEED COMMODITIES IN DIFFERENT REGIONS OF HUNGARY

Márta Erdélyi,Zsolt Ancsin, Andrea Bócsai, Krisztián Balogh, Miklós Mézes*

Szent István University, Department of Nutrition, H-2103 Gödöllő, Hungary
*erdelyi.marta@mkk.szie.hu

Introduction

Feed supply is important for animal production and any factor that affects the security of the feed supply is a significant constraint to production. Feed spoilage by moulds may result in heating, reduced palatability and the loss of nutritive value (Christensen, 1974). In addition, the affected commodity may become contaminated with mycotoxins. The biological reactions following ingestion of one or a combination of mycotoxins vary from acute, overt disease with high morbidity and death to chronic, insidious disorders with reduced animal productivity. Fortunately, mycotoxin contamination levels in animal feedstuffs are usually not high enough to cause an overt disease, but may result in economical loss due to changes in growth, production and immunosuppression (Richard, 2007).

It has been estimated that some 30% of the world's grain crops is affected annually by fungal invasion and mycotoxin contamination, and with global warming, the threat from fungal invasion of crops is likely to increase (Garrett et al., 2006).

The accumulation of mycotoxins, both before and after harvest, largely reflects climatic conditions. Fusarium toxins (e.g. DON, ZEN, T-2 and HT-2 toxin) are produced in cereal grains in high moisture conditions around harvest (Munkvold and Desjardins, 1997), whereas pre-harvest aflatoxin contamination of maize (Payne, 1998) is associated with high temperatures, insect damage and prolonged drought conditions. During the last decade, aflatoxin producing *Aspegillus* moulds were found even in the field of different regions in Hungary (Dobolyi et al., 2011). Moreover, because *Aspergillus* can tolerate lower water activity than *Fusarium*, it is more likely to contaminate commodities both pre- and post-harvest, whereas *Fusarium* is more likely to be found as a pre-harvest contaminant (Abramson, 1998). The quantity of mycotoxins changes only moderately during fermentation (e.g. silage production); thus, if a batch of maize was contaminated with mycotoxins already at the time of being loaded into the silo, the quantity of mycotoxins will moderately decrease as a result of partial detoxification that occurs during the ensiling process (Bodra and Morgavi, 2009; Richard et al., 2007). Feed manufacturing processes do not substantially decrease the mycotoxin content of feedstuffs, and the efficiency of different chemical and/or heat treatments is questionable (Tóth et al., 2012).

Among aflatoxins, the occurrence of AFB_1 or AFG_1 is the highest in feed plants. Those are extremely toxic mycotoxins, LD_{50} in farm animals varies between 0.3 to 20 µg/kg b.w, depending on species, age and sex. Those toxins have mainly hepatotoxic effects, but also inhibit protein synthesis, therefore decrease immune response, as well. In human, International Agency for Research on Cancer (1993) has defined AFB_1, as human 1A carcinogen, and also its hydroxylated metabolites, such as AFM_1 in milk or AFB_2 in egg are potential human carcinogen.

Fusarium moulds produce trichothecene mycotoxins (e.g. DON, T-2 and HT-2 toxin) which have protein synthesis inhibitory activity, and zearalenone which has estrogenic properties, therefore this latter one is genotoxic (Steyn, 1995).

Materials and methods

Feed samples – cereal grains, extracted oil seeds (e.g. soybean meal and sunflower meal) and forages (corn, alfalfa and grass silage) were taken from farms located at different regions of Hungary, and the plants cultivated in the same region in the years 2012 and 2013, except imported soybean meal.

Analyses of mycotoxins determined in the present study were carried out with HPLC method after immunoaffinity cleanup using relevant AOAC methods for AFB_1 and zearalenone, according to Czerwiecki and Wilczyńska (2003) for DON, and Trebstein et al (2008) for T-2 and HT-2 toxin.

Results and discussion

Results of the survey are shown in Table 1. It has been revealed that proportion of positive samples was different in the different regions. It was the highest in the Southern part of the country, possibly because of the higher average temperature and the lowest rainfall during the summer season..

Table 1.

Mycotoxin contamination of feedingstuffs from different regions of Hungary
(mean; minimum-maximum values)

Region	number of positive samples	positive samples (%)	AFB_1 µg/kg	DON mg/kg	ZEN mg/kg	T-2 toxin mg/kg	HT-2 toxin mg/kg
Northern	4	31,2	5,93 (1,38-16,86)	0,57 (0,12-1,16)	n.d.	n.d.	n.d.
North Eastern	18	46,8	9,77 (1,71-7,38)	2,23 (0,23-12,90)	0,03 (0,01-0,05)	0,20 (0,17-0,24)	0,36 (0,30-0,40)
South Eastern	16	98,3	5,87 (1,10-19,60)	0,20 (0,06-0,39)	n.d.	0,56 (0,11-1,46)	0,86 (0,21-2,55)
Central	6	64,7	7,55 (1,30-13,80)	0,16 (0,05-0,26)	n.d.	n.d.	n.d.
Middle Western	18	51,5	1,63 (0,30-3,02)	0,31 (0,07-0,69)	0,13 (0,02-0,24)	0,33 (0,05-0,51)	0,40 (0,08-0,58)
South Western	16	94,8	2,81 (1,19-4,42)	0,40 (0,35-0,49)	0,06 (0,02-0,08)	0,61 (0,13-0,87)	0,99 (0,37-1,48)
Western	4	41,9	n.d.	n.d.	0,02 (0,01-0,03)	n.d.	n.d.

The results showed that the mean mycotoxin contamination of feedingstuffs in each investigated region was below the maximum permitted level for AFB_1 (20 µg/kg; Regulation No. 574/2011/EU) and proposals for the other analysed mycotoxins (Recommendation No. 576/2006/EC). Otherwise mean values were found to be higher in the South Eastern and South Western regions for T-2 and HT-2 toxins, for which we do not have official limit value proposal in the EU, but generally accepted the threshold value of 0.5 mg/kg for all farm animals, as it was proposed by Eriksen and Pettersson (2004). However, the results has also revealed that AFB_1 has occurred even in crops cultivated in different regions of Hungary due to the climate changes in the last decade. This was found mainly in maize silage, in which the actual value was higher than the EU maximum permitted level. T-2 and HT-2 toxin levels were also higher in some cases than the proposed threshold value, mainly in grains cultivated in Southern Hungary.

Acknowledgement
The research was supported by the project TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 „Improvement of the level of education and research at the Szent István University“

References

Abramson, D., 1998. Mycotoxin formation and environmental factors. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 255–277.

AOAC Official Method 990.33 Aflatoxins in corn and peanutbutter. Association of Official

Analytical Chemists, Arlington.

AOAC Official method 985.18. Zearalenone in corn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington

Bodra, H., Morgavi, D.P. 2009. Silage could be a way to detoxify maize contaminated by mycotoxins. Proceedings. ISM Conference 2009, Tulln, p. 106.

Christensen, C.M., 1974. Storage of cereal grains and products. 2nd ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota

Czerwiecki, L., Wilczyńska, G. 2003. Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC-UV. Mycotox. Res. 19:31-34.

Dobolyi, Cs., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, Gy., Baranyi, N., Szécsi, Á., Lustyik, Gy., Micsinai, A., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Kukolya, J. 2011. Occurrence of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* strains in maize kernels in Hungary [In Hungarian]. Növényvédelem, 47, 125–133.

Eriksen, G.S., Pettersson H. 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol. 114: 205–239.

Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N., Travers, S.E., 2006. Climate change effects on plant disease: genome to ecosystems. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 489–509.

International Agency for Research on Cancer (IARC) 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Lyon, France, pp. 56.

Munkvold, G.P., Desjardins, A.E., 1997. Fumonisins in maize: can we reduce the occurrence? Plant Dis. 81: 556–565.

Payne, G.A. 1998. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 279–306.

Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses; An overview. Int. J. Food Microbiol. 119, 3–10.

Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. Food Chem. Toxicol., 45: 2420–2425.

Steyn, P.S. 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol. Lett. 82/83: 843-851.

Tóth K. Balogh K., Bócsai A., Mézes M. 2012. Reduction of the mycotoxin contamination of forage plants during cultivation, storage and processing. Acta Aliment. 41: 465–474.

Trebstein A, Seefelder W, Lauber U, Humpf HU. 2008. Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. J Agric Food Chem. 56:4968-4975.

SYSTEMIC TOXICITY OF ACRYLAMIDE IN SWISS MICE

FORMICKI G., KOPAŃSKA M., KRASKA K., GREŃ A., KAPUSTA E., MUCHACKA R., SZAROMA W., GOC Z., SEMLA M.

Department of Animal Physiology and Toxicology, Cracow Pedagogical University, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków,
email: formicki@up.krakow.pl

We studied systemic influence of acrylamide toxicity on the antioxidative system of SWISS mice. The mice were injected with two doses of acrylamide 20 and 40 and 80 mg/kg b.w. The injections were made once a week for 8 weeks. Mice were decapitated after 12, 24, 48 hours and in one week periods between 1 st and 8 th week of the experiment. Next blood samples, brain hemispheres, cerebellum, brainstem, eye lenses, liver, kidneys, testes were taken. In blood serum the concentrations of glucose, cholesterol and triglyceride were measured. In the rest of samples the concentration of reduced glutathione, and activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were estimated. In neural system activity of acetylcholinesterase was estimated additionally.

Systemic influence of acrylamide was generally related to significant depletion of reduced glutathione content in tested organs and significant changes in the concentration of glucose, cholesterol and triglyceride in blood serum. The decreases of reduced glutathione content were accompanied by affected activity of antioxidative enzymes. In the studied brain structures clear reduction of acetylcholinesterase activity occurred.

Our studies indicated that acrylamide toxicity is related to disturbances in redox balance and disturbances in basic blood parameters. The inhibition of acetylcholinesterase participates in neurotoxic properties of acrylamide.

Keywords:
acrylamide, antioxidants, glucose, triglycerides, cholesterol, acetylcholinesterase, mice organs

EVALUATION OF CHROMOSOMAL DAMAGE INDUCED BY THIACLOPRID-BASED INSECTICIDE IN BOVINE PERIPHERAL LYMPHOCYTES *IN VITRO*

Martina GALDÍKOVÁ, Katarína ŠIVIKOVÁ, Ján DIANOVSKÝ, Beáta HOLEČKOVÁ, Monika DRÁŽOVSKÁ

University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Department of Biology and Genetics, Košice, Slovak Republic; Tel: +421 915 984 775; Fax: 055/6711674; Email: galdikova@uvm.sk

Abstract

Thiacloprid-based insecticide was evaluated for its ability to induce chromosome aberrations in cultured bovine peripheral lymphocytes. The cultures were treated with the insecticides at the concentrations ranged from 30 to 480 $\mu g.ml^{-1}$ for the last 24 and 48 h of incubation. Dose dependence in the increase of CAs was observed after exposure to thiacloprid formulation ranged from 120 to 480 $\mu g.\ ml^{-1}$. The highest concentration of the insecticide also reflected in reduction of mitotic index in donor 2. For detection of structural and numerical aberrations, three whole chromosome painting probes (WCPs) were used in our experiments. We observed numerical aberrations, but without statistical significance.

Introduction

Thiacloprid, a neurotoxic insecticide, belongs to the new and commercially very successful family of the neonicotinoids; relatively new class of synthetic organic insecticide, which are now widely used to control piercing and sucking insect pests around the world (Pandey et al., 2009). Thiacloprid is an acute contact and stomach poison, with systemic properties. Neonicotinoid insecticides act as agonists on the insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which plays an important role, in synaptic transmission, in the central nervous system (Muccio et al., 2006).

Because of widespread application of thiacloprid, the assessment of its possible cytotoxic, genotoxic and/or carcinogenic potential effects is very important. Despite massive use, only manufactory's reports about its mutagenic potential are available. It has been described not to be mutagenic in *in vitro* bacterial mutation and *in vivo* cytogenetic mammalian assays (Pesticide residues in food, 2006).

We report here the cytogenetic effect of the thiacloprid-based insecticide (Calypso 480 SC) on the induction of chromosome aberrations (CA) in bovine peripheral lymphocytes *in vitro*. Chromosome aberrations are generally considered as biological endpoints to determine the level of genetic damage. Our interest was to detect also the frequency of stable aberrations, which do not result in the loss of chromosome material and it is assumed to be heritable. For this purpose, fluorescence in situ hybridization technique (FISH) was applied. In addition, changes in expression of bovine GSTA2 and GSTM3 after exposure to insecticide were investigated using real-time PCR method. Glutathione S-transferase (GST) family is considered as one of the most important detoxification enzymes groups (Isgor *et al*., 2010).

Keywords: thiaclopri-based insecticide, bovine peripheral lymphocytes, fluorescence *in situ* hybridization

Materials and Methods

Chemicals

The thiacloprid-based insecticide, (trade name Calypso 480 SC, with active agent N-{3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2-yliden}cyanamide (Bayer AG, Germany), was solved in water and used in the experiments. Mitomycin C (MMC, Sigma, St. Louis, MO, USA, 0.4µmol) and ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 250 $\mu g.ml^{-1}$ were used as positive control agents.

Cell cultivation

0,5 ml of heparinised whole blood of 2 healthy young bulls (Slovak spotted cattle, 6-8 months old) was added to 5 ml of chromosome medium RPMI 1640 supplemented with L- glutamine, 15 µmol/L HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 15% foetal calf serum (BOFES, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA), antibiotics (penicillin 250 U/ml and streptomycin 250 µg. ml^{-1} and phytohaemagglutinin (PHA, 180 µg. ml^{-1}, Welcome, Dartford, England). Lymphocyte cultures were incubated at 37^{o}C for 72 h Lymphocyte cultures were treated with 30, 60, 120, 240 and 480 µg. $ml^{-1}$of thiacloprid insecticide for the last 24 and 48 h of the incubation. One and half hour before the end of cultivation, colchicine (Merck, Darmstadt, Germany) was added at the final concentration of 5 µg/ml. For the standard cytogenetic analysis the slides were stained with Giemsa solution. One hundred well-spread metaphases were analysed for the CA including chromatid, isochromatid breaks (CB, IB) and chromatid, isochromatid exchanges (CE, IE). Gaps (G) were examined separately. The mitotic index (MI) was calculated as the metaphase ratio of the total number of 3000 cells.

Fluorescence in situ hybridization

Orange-red labelled whole chromosome painting probes (WCPs), specific for the bovine chromosome 1 and 7, and green labelled WCP, specific for the bovine chromosomes 5 (Kubičková et al., 2002) were used for hybridization, simultaneously. The painting probe in hybridization mixture (50% formamide in 2xSSC, 10% dextran sulphate, salmon sperm DNA, competitor DNA) was denatured at 72˚C for 10 min and reannealed at 37˚C for 90 min. The denaturation of slides was performed in 70% formamide in 2xSSC (pH 7.0) at 72˚C for 2 min and followed by a dehydration procedure (70, 80, 90% ethanol, -20˚C and 96% ethanol, RT) for 2 min. After overnight hybridization at 37˚C, the slides were washed in 2xSSC (3-5 min, room temperature), in 0, 4 xSSC with 0, 3% Igepal at 72˚C for 2 min and again in 2xSSC at room temperature from 5 sec to 2 min and TNT (Tris-NaCl-Tween 20 buffer) (2 x 5 min, RT). The slides were counterstained in DAPI/Antifade (4´, 6´-diamidino-2-phenylindole, Q-BIOgene, UK). One thousand of well spread metaphases were analysed for each and all experimental cultures and controls. Aberrations were scored according to the PAINT nomenclature (Tucker *et al*., 1995). A fluorescent microscope NIKON Labophot 2A/2, equipped with a single (Texas Red and Fluorescein isothiocyanate - FITC) and dual band pass filters (FITC/Texas Red; DAPI/FITC) was used for visualisation of painting probes. Statistical analysis was performed using the χ^2 test for the estimation of CAs and MI in both experimental conditions.

Real time PCR

RNA was extracted using the Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad, USA). cDNA was prepared by iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, USA). Real time PCR was performed using CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Relative expression values were calculated according to comparative threshold cycle method.

Results

The frequency of chromosomal aberrations induced by thiacloprid-based insecticide in bovine lymphocyte cultures can be seen in Tables 1 and 2. When compared with controls a weak higher percentage of chromosomal breaks were found after treatment with the fungicide for 24 h (Table 1). A dose dependence of CAs was found after treatment with the insecticide at concentrations ranging from 120 to 480 µg.ml^{-1} ($p<0.05$ or $p<0.01$). A slightly decrease in mitotic indices was seen in each donor, with statistical significance at the highest concentration of the insecticide in donor 2 ($p<0.05$). In the CA assay for 48 h, no statistically significant increases in the induction of chromosome aberrations were obtained (Table 2). After the exposure to the

Table 1.

Induction of CA in bovine lymphocytes exposed to several concentrations of commercial insecticide thiacloprid for 24h

Dose	Metaphase number	G	Types of CA				% Breaks (±SD)	% Aberrant cells (±SD)	% MI
			CB	IB	CE	IE			
Donor 1									
Control	100	5	1	–	–	–	1.0±0.10	1.0±0.10	2.6
	Concentrations of thiacloprid (μg.ml^{-1})								
30	100	7	3	1	-	-	4.0±0.20[a]	4.0±0.20[a]	2.2[a]
60	100	7	4	-	-	-	4.0±0.20[a]	3.0±0.17[a]	2.3[a]
120	100	7	3	4	-	–	7.0±0.25*	7.0±0.25*	1.9[a]
240	100	8	7	2	-	-	9.0±0.32**	8.0±0.27*	2.2[a]
480	100	8	8	2	-	-	10.0±0.30**	10.0±030**	1.5[a]
EMS (250μg. ml^{-1})	100	8	14	2	1	-	18.0±0.55***	12.0±0.38**	1.6[a]
Dose	Metaphase number	G	Types of CA				% Breaks (±SD)	% Aberrant cells (±SD)	% MI
			CB	IB	CE	IE			
Donor 2									
Control	100	5	2	–	–	–	2.0±0.14	2.0±0.14	2.5
	Concentrations of thiacloprid (μg.ml^{-1})								
30	100	8	4	1	-	-	5.0±0.22[a]	5.0±0.22[a]	2.0[a]
60	100	5	5	-	-	-	5.0±0.22[a]	5.0±0.22[a]	2.1[a]
120	100	5	8	1	-	-	9.0±0.29*	9.0±0.29*	1.8[a]
240	100	7	9	-	-	-	9.0±0.32*	8.0±0.29[a]	1.9[a]
480	100	13	7	5	-	-	12.0±0.38**	10.0±0.30**	1.3*
EMS (250μg. ml^{-1})	100	8	16	4	1	-	22.0±0.48***	19.0±0.40***	1.2*

a-statistically non significant data, *, *** -statistical significance ($p<0.05$, $p<0.001$, respectively: χ^2 test), CB, IB-chromatid, isochromatid breaks, CE, IE-chromatid, isochromatid exchanges

Table 2.

Induction of CA in bovine lymphocytes exposed to several concentrations of commercial insecticide thiacloprid for 48h

Dose	Metaphase number	G	Types of CA				% Breaks (±SD)	% Aberrant cells (±SD)	% MI
			CB	IB	CE	IE			
Donor 1									
Control	100	4	2	-	-	-	2.0±0.14	2.0±0.14	3.3
	Concentrations of thiacloprid (μg/ml)								
30	100	7	1	1	-	-	2.0±0.14[a]	2.0±0.14[a]	3.3[a]
60	100	7	1	1	-	-	2.0±0.14[a]	2.0±0.14[a]	3.2[a]
120	100	9	2	1	-	-	3.0±0.17[a]	3.0±0.17[a]	2.9[a]
240	100	5	2	2	-	-	4.0±0.20[a]	4.0±0.20[a]	1.9*
480	100	4	-	3	-	-	3.0±0.17[a]	3.0±0.17[a]	1.1***
MMC (4μM)	100	8	19	4	-	-	23.0±0.54***	18.0±0.42***	1.0***
Dose	Metaphase number	G	Types of CA				% Breaks (±SD)	% Aberrant cells (±SD)	% MI
			CB	IB	CE	IE			
Donor 2									
Control	100	4	2	-	-		2.0±0.14	2.0±0.14	3.1
	Concentrations of thiacloprid (μg/ml)								
30	100	8	2	-	-	-	2.0±0.14[a]	2.0±0.14[a]	2.9[a]
60	100	9	1	1	-	-	2.0±0.14[a]	2.0±0.14[a]	2.7[a]
120	100	4	4	1	-	-	5.0±0.22[a]	5.0±0.22[a]	2.5[a]
240	100	4	3	3	-	-	6.0±0.24[a]	6.0±0.24[a]	1.7*
480	100	4	3	-	-	-	3.0±0.17[a]	3.0±0.17[a]	1.0***
MMC (4μM)	100	4	15	1	2		20.0±0.51***	16.0±0.40***	0.9***

a-statistically non significant data, *, *** -statistical significance ($p<0.05$, $p<0.001$, respectively: χ^2 test), CB, IB-chromatid, isochromatid breaks, CE, IE-chromatid, isochromatid exchanges

insecticide at concentration of 240 and 480 μg.ml^{-1}, an apparent or total inhibition in mitotic activity was shown ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively).

On the basis of the results of standard chromosomal analysis, the lowest concentration (30 μg.ml^{-}1) of the insecticide was chosen for the investigation of stable structural and the numerical aberrations using FISH technique. The results after exposure of bovine peripheral lymphocytes to thiacloprid-based insecticide are shown in Table 3. Under condition of our experiment no translocation were detected. We have observed numerical aberrations, aneuploidies and polyploidies, without statistical significance.

Table 3.

The frequency of CA in bovine lymphocytes exposed to thiacloprid-based insecticide evaluated by WCP *in vitro*

			Numerical aberrations					Structural aberrations				
	Dose	No.	Aneuploidy				Polyploidy (4n)	CB	IB	CE	IE	Total %
			Total	1	5	7						
Control		1000	5	1	2	2	4	_	_	_	_	0,0±0,0
Calypso 480SC	30 $\mu g.ml^{-1}$	1000	9	5	3	1	6	4	3	-	-	7,0±0.08**
EMS	250 $\mu g.ml^{-1}$	1000	15	2	8	5	9 [a]	16	1	1		19±0,14***

a - statistically non significant data, **, *** statistical significance ($p<0,01$, $p<0,001$, respectively: χ^2 test

Discussion

In our study, the cytogenetic activity of thiacloprid-based insecticide *in vitro* was investigated using bovine peripheral lymphocytes. Under condition of our experiments, slight concentration dependence was observed in relation to induction of chromosomal aberrations for 24 h treatment. The highest concentration of the insecticide tested (480 $\mu g.ml^{-1}$) caused a weak significant inhibition of mitotic activity in donor 2 ($p<0.05$), reflected in the lower values of mitotic index in comparison with the control value. No statistically significant increase in CAs induction was observed after prolonged time of exposure (48 h). When compared with the controls the highest thiacloprid dose (480 $\mu g.ml^{-1}$) induced a significant decrease in the mitotic ability in both donor cultures. Thus, the cytotoxic effect of the insecticide was observed. Using WCP, only low levels of numerical aberrations, without statistical significance were found. No stable aberrations, such as translocations and insertions were detected. It is likely that the use of three WCP provides relatively low proportion of the painted bovine genome; thus detection of the total number of stable aberrations was not possible.

The activity of some detoxification enzymes does not only depend on the genotype; it changes as a consequence of exposure to chemicals or by many dietary components that could either induce or inhibit their enzyme activity (Lampe et al., 2000). In our study, we have investigated changes in expression of two GST genes in association with exposure to thiacloprid. Our data suggest that GSTM3 gene was underexpressed in lymphocytes treated with insecticide. GSTA2 displayed very low or udentedectable expression levels in cultured lymphocytes (unpublished data).

Thiacloprid has been classified by WHO (1994) as moderately hazardous. The EPA (2006) identified this chemical as “likely to be carcinogenic to humans” based on the occurrence of thyroid tumors in male rats, and uterine and ovarian tumors in rats and mice, respectively However there are few data in the literature on clastogenic and genotoxic effects of thiacloprid. No statistically significant increase in the number of cell with chromosome aberrations was observed in Chinese hamster V79 cells after *in vitro* exposure to thiacloprid with purity 96.8-97.2%. Cytotoxicity was described at the highest concentration (750 $\mu g.ml^{-1}$) (Pesticide residues in food, 2006). In contrast to these findings, Kocaman et al. (2012) reported significantly increase in the CA, SCE and MN (micronuclei) frequencies in the human peripheral lymphocytes treated with thiacloprid. Thiacloprid also caused reduction in the mitotic, proliferation and nuclear division indices. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltametrin and/or thiacloprid in rat bone marrow cells were documented by

Sekeroglu et al. (2011). They found significantly increase in the CA and MN frequencies. Other authors (Calderón-Segura et al., 2012) have investigated neonicotinoid insecticides (thiacloprid, clothianidin and imidacloprid) *in vitro* in human peripheral lymphocytes using comet assay. They have demonstrated that commercial formulations, Jade, Gaucho, Calypso and Poncho directly induce DNA damage in a concentration-dependent manner.

In conclusion, our results indicated ability of thiacloprid formulation to induce clastogenic/genotoxic and/or cytotoxic effects in bovine peripheral lymphocytes.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Slovak Republic through contract no. VEGA1/0125/11 and VEGA 1/0117/13

References

CALDERÓN-SEGURA, M.E., GÓMEZ-ARROYO, S., VILLALOBOS-PIETRINI, R., MARTÍNEZ-VALENZUELA, C., CARBAJAL-LÓPEZ, Y., CALDERÓN-EZQUERRO, MDEL, C., CORTÉS-ESLAVA, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, R., FLORES-RAMÍREZ, D., RODRÍGUEZ-ROMERO, M. I, MÉNDEZ-PÉREZ, P., BAÑUELOS-RUÍZ, E. 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*, 2012,1-11.

ISGOR, B.S., CORUH, N., ISCAN, M. 2010. Soluble Glutathione S-Transferases in Bovine Liver: Existence of GST T2. *Journal of Biological Sciences*, 667-675.

KOCAMAN, A. Y., RENCÜZOĞULLARI, E., TOPAKTAŞ, M. 2012. In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 1-11.

KUBÍČKOVÁ, S., ČERNOHORSKÁ, H., MUSILOVÁ, P., RUBEŠ J. 2002. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. Chromosome Research,10(7),571-577.

LAMPE, J.W., CHEN, C., LI, S., PRUNTY, J., GRATE, M.T., MEEHAN, D., BARALE, K.V., DIGHTMAN, D.A., FENG, Z., POTTER, J.D. 2000. Modulation of human glutathione S-transferases by botanically defined vegetable diets. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,*9,787–793.

MUCCIO, A.D., FIDENTE, P., BARBINI, D.A., DOMMARCO, R., SECCIA, S., MORRICA, P. 2006. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*,1108,1–6.

PANDEY, G., DORRIAN, S.J., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G. 2009. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by Pseudomonas sp. 1G. Biochemical and Biophysical Research Commununications, 380(3),710-714.

SEKEROĞLU, V., SEKEROĞLU, Z. A., KEFELIOĞLU, H. 2011. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on Wistar rat bone marrow cells. Environmental Toxicology, 1-8.

TUCKER, J.D., MORGAN, W.F., AWA, A.A., BAUCHINGER, M., BLAKEY, D., CORNFORTH, M.N., LITTLEFIELD, L.G., NATARAJAN, A.T., SHASSERRE, C. 1995. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 68, 211-221.

[USEPA Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch: "Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential" (April 2006)] http://www.fluoridealert.org/pesticides/pesticides.cancer.potential.2006.pdf World Health Organization, WHO,2004. The WHO recommended classification of pesticides and guidelines to classification. 2004 World Health Organization.

HEAT TREATMENTS VERSUS FERMENTATION

Gábor GÉCZI[1], Péter KORZENSZKY[2], Márk HORVÁTH[3], Erik MOLNÁR[4]

Szent István University, Páter K. u. 1., Gödöllő, H-2103, Hungary
[1,2] Faculty of Mechanical Engineerin,
[1]Institute for Environmental Engineering Systems, Department of Environmental Engineering
[2]Institute of Process Engineering, Department of Metrology
[3,4]Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Institute of Environmental Science, Department of Chemistry and Biochemistry,

Our researches have been determined in the recent years by examining the effects of heat treatment methods on food. In our current article we are presenting the results achieved during storing and fermentation of heat-treated grape must. Heat treatments have been executed by microwave-energy transfer and convective heat transfer carried out in water bath. Identical long treatment time and temperature were applied in both cases. Heat treatment slowed down, respectively prevented the natural fermentation of raw grape juice, which was checked by examining the CO_2 concentration. It was established during the comparison of heat treatment methods, that there is no significant difference between the effects of heat treatments carried out with either microwave energy transfer or water-bath thermostat on grape must.

Introduction

Juice squeezed out of the grape-seeds is called grape must, which is the raw material of wine. It is a popular drink of vintage period, but fermentation of its sugar-content changes both flavour and attributes rapidly. During fermentation process majority of sugar content disintegrates into alcohol and CO_2. It is undoubtedly a – from the aspect of wine production – very favourable process, which is triggered by yeast molecules getting in the grape must, however more and more people are trying to conserve grape must and selling it as a soft drink. (Eperjes, 2010; Mauricio et al., 1997; Lafon-Lafourcade et al., 1984, Rektor 2009)

Heat treatment is a well known procedure in food conservation as well, which is utilised in order to prevent and delay the deterioration processes. This procedure was worked out by Louise Pasteur French scientist – among other purposes – to prevent late fermentation of wine. The mild heat treatment is called pasteurization – named after its inventor. As an interesting fact we would like to mention that simultaneously with Pasteur, Móric Preysz Hungarian chemist, developed a similar method to prevent quality-deterioration of Tokaj wines. (http1)

Mild heat treatment (60-80 °C) delays fermentation of grape must, therefore it is a common method used with home-made conservations. Industrial scale heat treatments are carried out in tubular or plate-type heat exchanger, with convective heat transfer. Heating of liquid foods can be executed by microwave energy transfer. During our previous researches we carried out both traditional and microwave-heating of milk, egg juice, beer and orange juice and we examined the effects of heat treatment on the food in all the cases. (Géczi et. al. 2013, Korzenszky et al., 2013, Garnacho et al. 2012). Based on the above, heat treatment for conserving grape must offers a possibility to examine microwave heat treatment as well. (Kapcsándi, 2012)

Material and methods

Comparison-examinations were executed on the experimental instrument set up in the laboratory of Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering. Analysing and checking the grape must examples took place at Szent István University, Department of Chemistry and Biochemistry. Examples heat treated with microwave (MH), respectively water bath thermostat (TH) were compared with each other and untreated (WH) example as well.
Grape must used for the experiments at the end of July 2013 was prepared from Italian Vittoria white grape and Black Magic red grape. In august was used Bianca white grape and Nero red grape from Hungary. Properties of grape must is summarised in Table 1.

Table 1

Attributes of grape must used in the experiments.

	Vittoria white grape (Italy)	**Black Magic red grape (Italy)**	**Nero red grape (Hungary)**	**Bianca white grape (Hungary)**
Dry matter content [g/100ml]	13.55±0.03	16.63±0.05	23.31±0.12	23.74±0.08
Density [g/ml]	1.0402±0.011	1.0327±0.013	1.083±0.02	1.079
pH	2.08±0.1	2.56±0.08	3.52±0.11	3.26
Conductivity [µS/cm]	1477±11	1497±17	2350±15	1620
Degrees Brix [°Bx]*	13	16	22	23

*determined by OG-101/A type manual refractometer

At the Faculty of Mechanical Engineering of Szent István University a group of researchers dealing with food treatment created an experimental instrument capable of continuous service microwave heating and heat treatment. They managed to create a measuring circuit capable of comparison-examinations, which allowed heating up liquid foods by usage of microwave energy transfer and convective heat transfer, by upgrading this instrument in the recent years.

The „spirit" of the comparison-circuit is a glass spiral, in which the food to be treated is circulated – grape must in our case – by a STENNER 85M5 type pump (Stenner Pump Company, Jacksonville, FL, U.S.A.) which has continuously adjustable flow rate. The glass spiral can be placed into either the Whirlpool AT 314WH type (Whirlpool Corporation, U.S.A.) household microwave device or *T*-PHYWE (Lauda DR. R. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen, Germany) water-bath thermostat for executing the heating procedure. In case of the microwave gadget we applied continuous 900 Watt output power, whereas with the water-bath thermostat a water-bath of appropriate temperature (70-95°C) for the desired target temperature was used. During the heat treatment of continuous flowing, the liquid foods circulating in the glass spiral – depending on the length of the glass spiral and the volume flow of the pump – can be heated to the desired temperature.

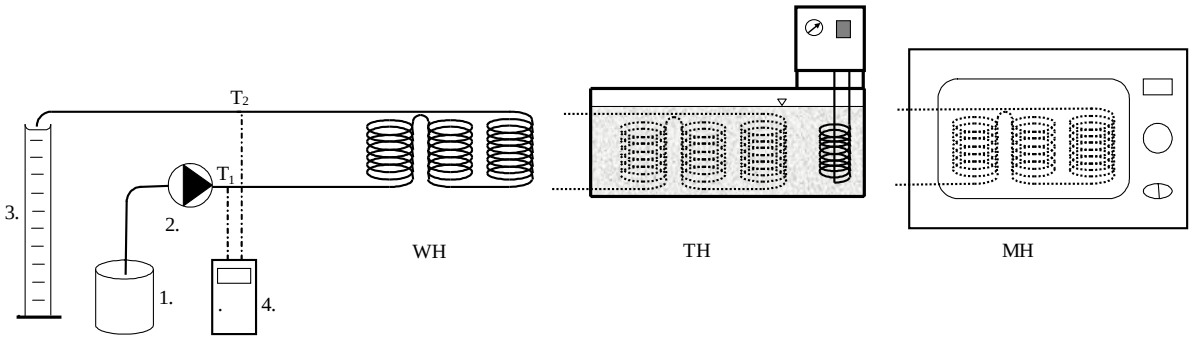


Figure 1

Structuring of heat-treated sets of samples

1- Grape must tank (5 litres); 2-STENNER 85M5 pump; 3-Heat treated sample; 4-ALMENO 2590-9 monitoring and data collection system, WH – untreated control; TH – heat treated with water-bath; MH – microwave heat treated

One of the advantages of this method is that heating process in the electromagnetic field of the microwave instrument is continuous and outlet temperature is constant by using glass spiral. Therefore the fluctuations of temperature inside the product, which is highly characteristic for microwave heating, could be avoided. Temperature – before and after microwave field and water bath as well – is easily to supervise, the procedure can be controlled easily. For measuring the temperature ALMEMO 2590-9 type (Ahlborn, Holzkirchen, Germany) data collection system was applied with NiCr-Ni temperature sensors.

We aimed at a target temperature of T_2=70°C for the heat treatment of grape must, but we did not hold this temperature. The desired temperature could be realised at Q=2,69cm^3/s flow rate and at T_{bath}=78°C water temperature in case of convective heating. We poured 1-1 dl of the control and heat treated samples in the commercially available 3,3dl PET bottles. The samples cooled down to the storage temperature of 22°C in a natural way in all cases. Sample bottles were closed one day after the treatment in order to avoid pressure decrease due to cooling. Samples were stored 7 days long at the indicated storage temperature. The CO_2 determination, which is fairly characteristic to the fermentation process, was executed at Szent István University, Faculty of Chemistry and Biochemistry. Gas analysis and control of samples, were carried out as a blind test, the examiner received the samples encrypted and mixed, the person carrying out the heat treatment of the grape must did not participate in the examinations.

During the fermentation we took samples from the atmosphere above the liquid level of the PET bottles. Determination of the samples' CO_2 content was carried out by means of Hewlett Packard 5890 series II. (Germany, SN.: 3203616265) type gas chromatograph, by using thermal conductivity measuring (TCD) universal scanner and helium carrier gas. For data display we used HP GC Chem Station Rev. A. 08.03 software, which is capable of visualising the area under the peak, characteristic of CO_2 content and retention time. (Kristóf 2009; Erdey & Mázor 1974, Buffington &Wilson 1991, Burger 1992)

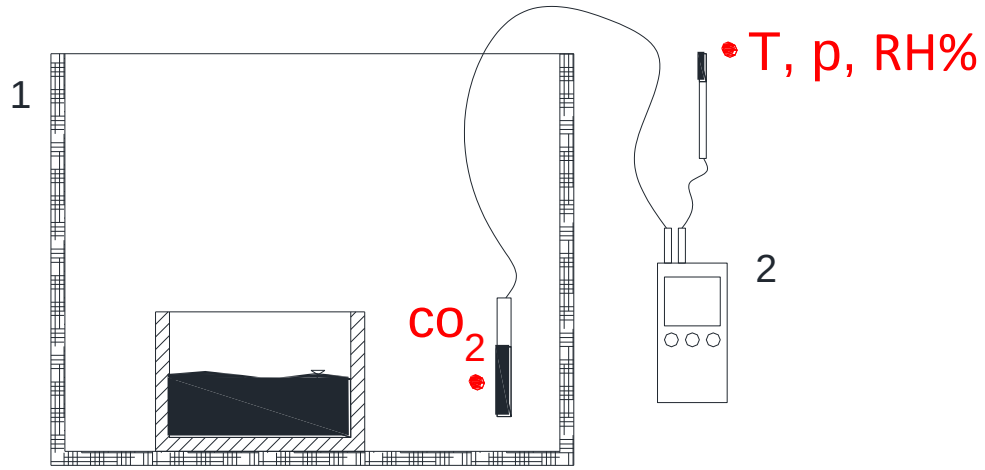


Figure 2

Double vessel for examining grape must fermentation

1-Double vessel with grape must in the inside one, 2- ALMENO 2590-9 monitoring and data collection system with sensors

Carbon-dioxide concentration forming during fermentation was checked with the arrangement displayed on Figure 2. as well. Carbon-dioxide has higher density than air therefore during fermentation of the grape must placed in the inside vessel, a continuous increase of carbon-dioxide concentration in the outside vessel can be measured. For measurement we used ALMEMO 2590-9 type (Ahlborn, Holzkirchen, Germany) data collection system with connectable FYAD 00 CO2 B10 és FHA646E1C type sensor, plus the concentration was continuously measured and recorded for 4 days. Storage temperature, humidity, and atmospheric pressure were also monitored during the measuring process. Fermentation of the three sample groups was observed simultaneously in a parallel way.

Results

There was a transformation in the heat treated (MH és TH) and untreated (WH) samples' atmosphere above liquid level during the 7 days long storage because of the fermentation procedures. This transformation is nicely demonstrated in Figure 3, by the photo taken before measuring the CO_2 concentration. On the photo can be see in PET bottle Nr. 23 heat treated sample by microwave-energy transfer, in PET bottle Nr. 35 an untreated control- and in PET bottle Nr. 41 a heat treated grape must sample by water-bath thermostat. It is visible, that due to the formed CO_2, pressure increased in the middle bottle (35), PET bottle lost its original shape.



Figure 3

Grape must samples after 7 days storage.

Nr.23 heat-treated by microwave energy (MH), Nr.35 without heating, as a control (WH), Nr.41 heat treated by water-bath thermostat (TH)

We took samples from the atmosphere above the grape must by piercing through the bottles and we determined the CO_2 content of the atmosphere by using gas chromatograph examination. On Figure 4 we depicted the CO_2 content formed in the closed atmosphere above the liquid level of 8-8 pcs of sample grape musts. The diagram confirms the pressure difference experienced on the photo of Figure 3. CO_2 concentration originating from the atmosphere of untreated sample (WH) (938,57±36,21SD) is more than four times of that of the heat treated samples.

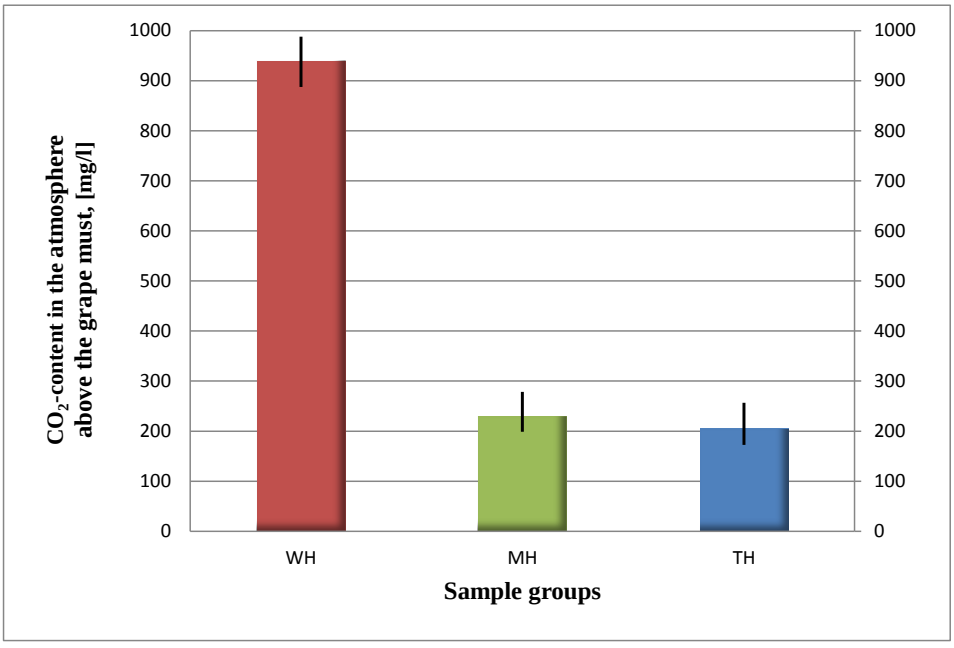


Figure 4

CO_2 content in the PET bottle atmosphere above the grape must after 7 days storage

Table 2

Two sample *t*-test, for comparing the effects of heat treatment methods

Measured values CO_2 [ppm]				Calculated values (data analysis*)		
WH	MH	TH			*MH*	*TH*
987,65	236,53	213,86		**Expected value**	229,16	204,23
945,60	278,65	176,43		**Variance**	1016,78	903,69
887,65	275,65	179,55		**F-value**	1,13	
917,69	198,76	256,53		**P(F<=f)**	0,44	
972,92	214,42	218,79		**F-critical**	3,79	
897,22	205,11	187,44		**t-value**	1,61	
933,38	220,67	228,88		**P (T<=t) two-tailed**	0,13	
966,44	203,45	172,38		**t critical two-tailed**	2,14	

*data analysis by means of Excel2007 Analysis Toolpack

Based on Table 2, a two-sample t-test did not show a significant difference ($|t_{value}| < t_{critical}$) between the mean CO2 concentration in the two heat-treatment conditions at a significance level of p=0.05.

On the diagram of Figure 5 we present the results of the experiment executed under the conditions described in Figure 2. It can be seen that during the experiment which was carried out in the double vessel under open-air conditions the CO_2 concentration measured in the outside vessel is continuously increasing from the ~520 ppm initial concentration. Pressure (986mbar) and temperature (20,2°C) of the storage can be considered as constant. We can establish that the fermentation process starts earlier and gets accomplished quicker in case of the untreated (WH) sample. The procedures of carbon-dioxide generation in the heat treated samples are very similar; we did not detect any remarkable deviations this time either. Examinations were repeated three times each with Nero and Bianca grape types in August 2013; formations of the curves were similar in all cases.

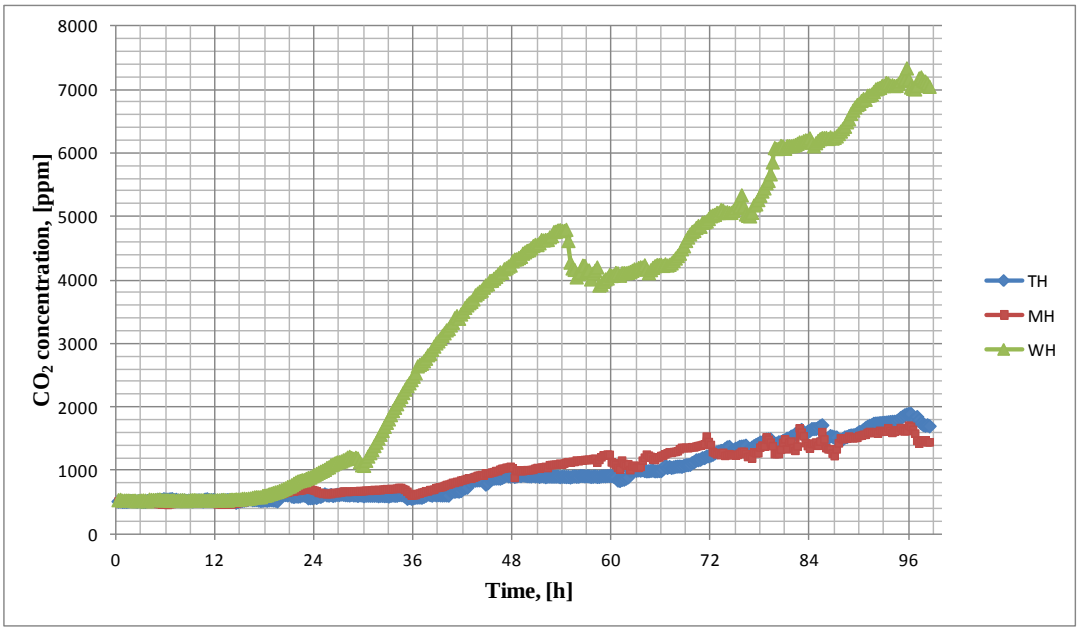


Figure 5

CO_2 change of concentration during fermentation of Nero grape must

Conclusions

Grape must proved to be an appropriate subject for examining microwave heat transfer. During vine-making technology grape must starts to ferment and its sugar content transforms into alcohol and carbon-dioxide. Fermentation of grape must can be tracked by measuring the latter component. Fermentation process might be delayed, slowed down by using heat treatment methods. (A known method for home-made grape must conservation.) Just as during our previous examinations, we were searching for an answer whether microwave heat treating can be matched with any further advantages or disadvantages apart from the known thermal-effect. Fermentation of the grape must heat treated with microwave method was compared to fermentation of samples heat treated with convective method (water bath thermostat). We examined fermentation in PET bottle, closed conditions and in double glass vessel fermentation under natural conditions. It can be established that the effect of heat treatment is obviously detectable in both examinations; however we could not find any significant difference between the effects of heat treatments in either of the cases.

Acknowledgments

This work was financially supported by TÁMOP 4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 Improvement of Research and Education Standard of Szent István University project and by KTIA-AIK-12 project.

References

Buffington R & Wilson K. M.(1991): Detectors for Gas Chromatography. HP Hewlett Packard, Awandale, 37-42 p.

Burger K. (1992): Basics of quantitative analysis – chemical and instrumental analysis. (Hungarian language) Semmelweis Publisher, Budapest 449-454 p.

Imre Eperjes (2010): Wineyard technology – Wine making 1. (Hungarian language) Mezőgazda Publisher, 314p.

L. Erdey & L. Mázor (1974): Analitical handbook. (Hungarian language) Technical Publisher, Budapest, pp. 303-342.

G Géczi, M Horváth, T Kaszab, G G Alemany (2013): No Major Differences Found between the Effects of Microwave-Based and Conventional Heat Treatment Methods on Two Different Liquid Foods PLOS ONE 8:(1) pp. 1-12.

Gonzalo Garnacho, Tímea Kaszab, Márk Horváth, Gábor Géczi (2012): COMPARATIVE STUDY OF HEAT-TREATED ORANGE JUICE JOURNAL OF MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY AND FOOD SCIENCES 2:(3) pp. 446-457.

V. Kapcsándi, E. Lakatos, A. J. Kovács, M. Neményi (2012): Effects of low power microwave radiation on the fermentation of Italian Riesling grape must. (Hungarian language) XXXIV. Óvár Scientific Day, Mosonmagyaróvár, NyME, *pp. 62-67.*

Péter Korzenszky, Péter Sembery, Gábor Géczi (2013): Microwave Milk Pasteurization without Food Safety Risk POTRAVINARSTVO 7:(1) pp. 45-48.

K. Kristóf (2009): Structure of the gas chromatograh, principles of measurements with gas chromatograh. (Hungarian language) Educational lecture 1-5 p.

S. Lafon-Lafourcade, C. Geneix and P. Ribéreau-Gayon (1984): Inhibition of Alcoholic Fermentation of Grape Must by Fatty Acids Produced by Yeasts and Their Elimination by Yeast Ghosts *Appl. Environ. Microbiol.* June 1984 vol. 47 no. 6 1246-1249

J.C. Mauricio, J. Moreno, L. Zea, J.M. Ortega, M. Medina (1997):The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae* Journal of the Science of Food and Agriculture 75 (6) 155-160.

Attila Rektor (2009): Processing milk whey and grape must with complex membrane-technology methods (PhD) dissertation (Hungarian language) Budapest Corvinus University 119 p.

http1://www.ng.hu/Tudomany/2003/10/Skot_es_magyar_felfedezok_Pasteur_elott

THE CONCENTRATION OF MERCURY IN KIDNEY CANCEROUS AND CONTROL TISSUES OF HUMAN

Marta GŁOGOWSKA[1]

[1]*Department of Vertebrate Zoology and Human Biology, Pedagogical University of Cracow, Poland*
e-mail: aisutram22@o2.pl

ABSTRACT

The aims of this study was determinate the average accumulation of mercury in kidney healthy and cancerous tissues of human in relation age and sex.

Both inorganic and organic forms of mercury are highly toxic to humans; however, inorganic mercury is not as easily absorbed by the body. Inorganic mercury, such as mercury vapor, is toxic if inhaled in large concentrations. As the body tries to rid itself of these toxins, gaseous mercury is oxidized to divalent mercury, which accumulates in the kidneys and can cause kidney damage.

Tissues were taken during surgery and post-mortem from Military Hospital, PROSMED Health Center and Oncology Centre of Maria Skłodowska - Curie in Cracow. Fragments of tissues cancerous (tissues away from the tumor, tissues surrounding the tumor, tissues tumor) and tissues normal (control group) were taken from kidney and then frozen. Average mass of each sample hesitated from 0,5-1g. Samples were taken from 98 (n=98) cancerous patients and from 22 (n=22) healthy patients (control tissues). Mercury contents were detected using CVAAS methods. All results were expressed in ppm.

Mean content of mercury in men (20-50 years old) in control tissues is 0,015±0,00001 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,12±0,091 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,099±0,064 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,036±0,021 ppm. Mean content of mercury in men (50-90 years old) in control tissues is 0,023±0,009 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,164±0,154 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,106±0,094 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,035±0,031 ppm. Mean content of mercury in women (20-50 years old) in control tissues is 0,0005±0,0003 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,174±0,005 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,151±0,061 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,011±0,009 ppm. Mean content of mercury in women (50-90 years old) in control tissues is 0,021±0,013 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,093±0,069 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,086±0,073 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,068±0,063 ppm.

Mercury content is much higher in patients with tumors (both men and women) in comparison to healthy tissues of both sexes. In all groups, mercury concentration was the highest in tissues away from the kidney tumor, in comparison to mercury content in adjacent mucous membrane and tumor tissues of this organ. The results suggest that some types of cancerous tissues may accumulate more effectively toxic elements.

Key words: kidney, mercury, CVAAS, cancerous tissues

Introduction

Around 208,500 new cases of kidney cancer are diagnosed in the world each year, accounting for just under 2% of all cancers **(Lindblad and Adami)**. The most recent estimates of incidence of kidney cancer suggest that there are 63,300 new cases annually in the EU25. In Europe, kidney cancer accounts for nearly 3% of all cancer cases **(Ferlay et al., 2007)**. In the UK kidney cancer is the eighth most common cancer in men (5,377 new cases diagnosed in 2008), and the ninth most common cancer in women (3,380 new cases in 2008), giving a male: female ratio of over 3:2. The number of cases of kidney cancer in men in the UK has doubled from 7 per 100,000 to 14.8 per

100,000 between 1975-1977 and 2006-2008. In women the rates have more than doubled over the same period, rising from 3.2 to 7.5 per 100,000 **(Cancer Research)**. The incidence of kidney cancer is also increasing in the United States. This is thought to be a real increase, not only due to changes in the way the disease is diagnosed **(Lynch et al., 2007)**.

Historically medical practitioners would expect a person to present with what is known as the classic triad of symptoms **(Cohen and McGovern, 2005)**. This triad of symptoms includes: hematuria which is when there is blood present in the urine. Flank pain, which is pain on the side of the body between the hip and ribs. An abdominal mass, similar to bloating but larger. It is now known that this classic triad of symptoms only occurs in 10-15% of cases, and can be indicative of the Renal cell carcinoma (RCC) in an advanced stage **(Cohen and McGovern, 2005)**. Today RCC is fairly asymptomatic (meaning little to no symptoms) and is generally detected incidentally when a person is being examined for other ailments **(Motzer et al., 1996)**. VHL is a rare disease that runs in some families. It is caused by changes in the VHL gene. An abnormal VHL gene increases the risk of kidney cancer. It also can cause cysts or tumors in the eyes, brain, and other parts of the body. Family members of those with this syndrome can have a test to check for the abnormal VHL gene. For people with the abnormal VHL gene, doctors may suggest ways to improve the detection of kidney cancer and other diseases before symptoms develop.

Both inorganic and organic forms of mercury are highly toxic to humans; however, inorganic mercury is not as easily absorbed by the body. Inorganic mercury, such as mercury vapor, is toxic if inhaled in large concentrations. Inhaled gaseous mercury is absorbed into the blood. Once in the circulatory system, it can pass through the blood-brain barrier and accumulate in the brain, damaging the central nervous system. As the body tries to rid itself of these toxins, gaseous mercury is oxidized to divalent mercury, which accumulates in the kidneys and can cause kidney damage **(Honda et al., 2006)**. Most people are not exposed to inorganic mercury but rather absorb methylmercury through the consumption of fish and shellfish. Methylmercury is easily absorbed in the digestive tract, where it forms a complex with the amino acid cysteine. This new complex resembles a large neutral amino acid found in the body, methionine, and can more easily gain entry into cells. As with inorganic mercury, once in the bloodstream, methylmercury will accumulate in the brain and cause damage to the central nervous system. Methylmercury is naturally removed from the body over time. Eventually, this methylmercury-cysteine complex is transported to the liver where it is secreted into bile, after which enzymes break the complex down into its amino acid and methylmercury parts. Some of this methylmercury then comes in contact with the bacteria in the intestine and is broken down into inorganic mercury and carbon. The inorganic mercury is poorly absorbed in the digestive tract and 90 percent is excreted in the feces. The rest of the methylmercury that does not interact with bacteria is reabsorbed by the body and goes through the process again. It takes about 30 to 40 hours for methylmercury to be distributed to the tissues of the body **(Clarkson and Magos, 2006)**.

Material and methods

Tissues were taken during surgery and post-mortem from Military Hospital, PROSMED Health Center and Oncology Centre of Maria Skłodowska - Curie in Cracow. Permission for research was given by Local Bioethical Commission. Fragments of tissues cancerous (tissues away from the tumor, tissues surrounding the tumor, tissues tumor) and tissues normal (control group) were taken from kidney and then frozen. Average mass of each sample hesitated from 0,5-1g. Samples were taken from 98 (n=98) cancerous patients and from 22 (n=22) healthy patients (control tissues).

Mercury contents were detected using CVAAS methods. All results were expressed in ppm. Hypothesis falsification were made by U Mann-Whitney test, and Kruskal-Wallis ANOVA.

Results

Results were analyzed statistically by using Statistica 10 program. In statistical description the following statistics were used: the arithmetic mean and standard deviation. Normality of the distribution was examined by Shapiro-Wilk test. Because none of the normal distributions were noticed, Kruskal-Wallis test for independent trials was used. Statistical analysis was to use the U

Mann-Whitney test, to check the differences in the average content of mercury between the two age groups separately for men, healthy and sick. Results are shown in Figure 1, Figure 2, Figure 3 and Figure 4.

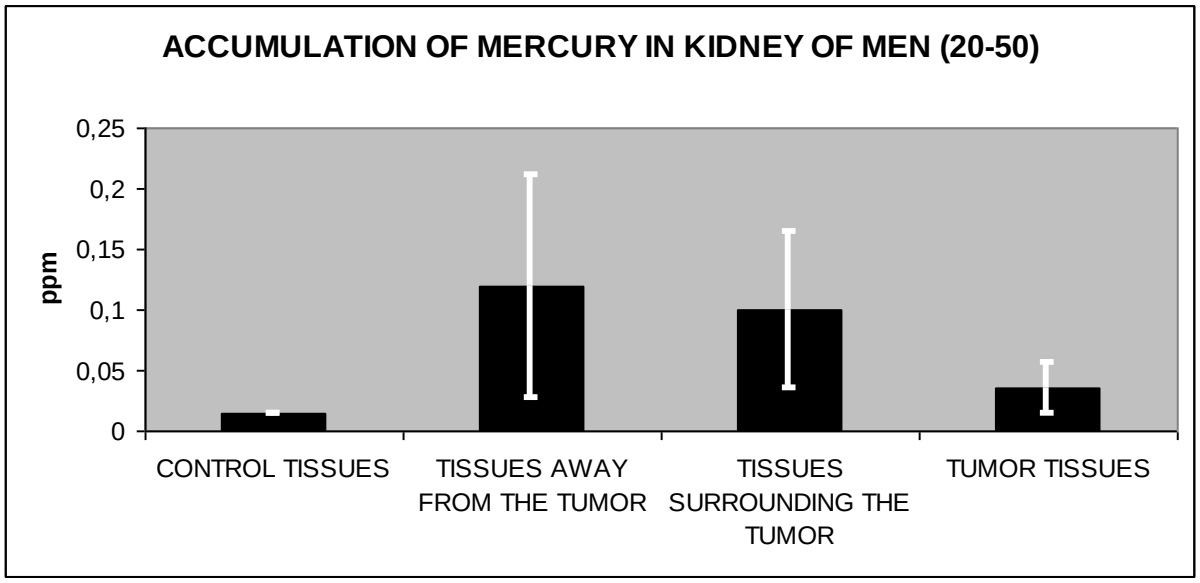


Fig. 1

Accumulation of mercury in kidney of men (20-50 years old).

Mean content of mercury in men (20-50 years old) in control tissues is 0,015±0,00001 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,12±0,091 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,099±0,064 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,036±0,021 ppm.

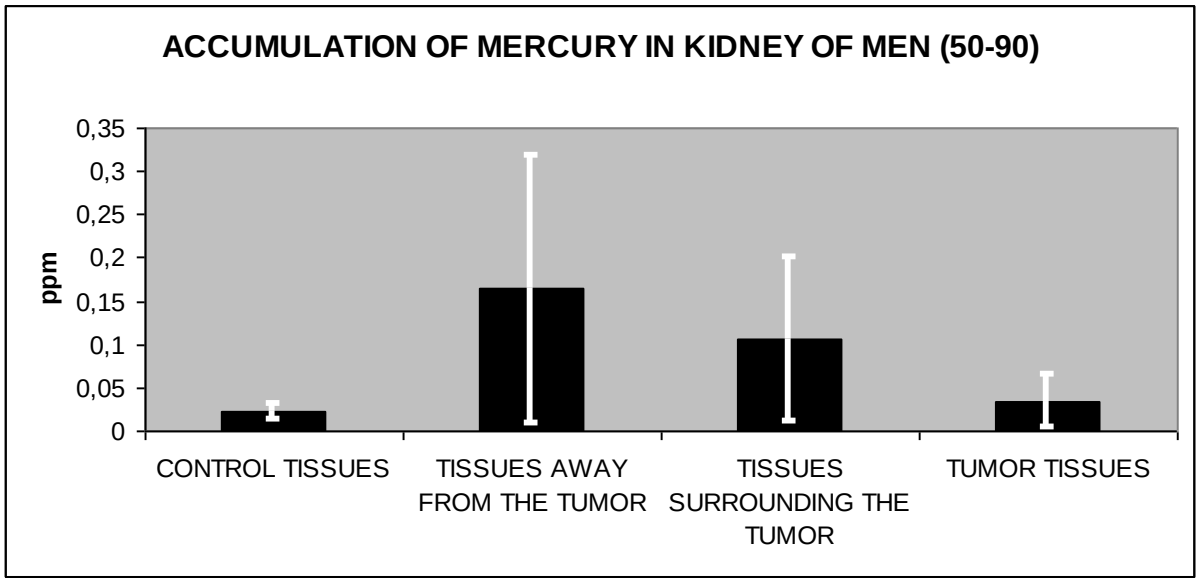


Fig. 2

Accumulation of mercury in kidney of men (50-90 years old).

Mean content of mercury in men (50-90 years old) in control tissues is 0,023±0,009 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,164±0,154 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,106±0,094 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,035±0,031 ppm.

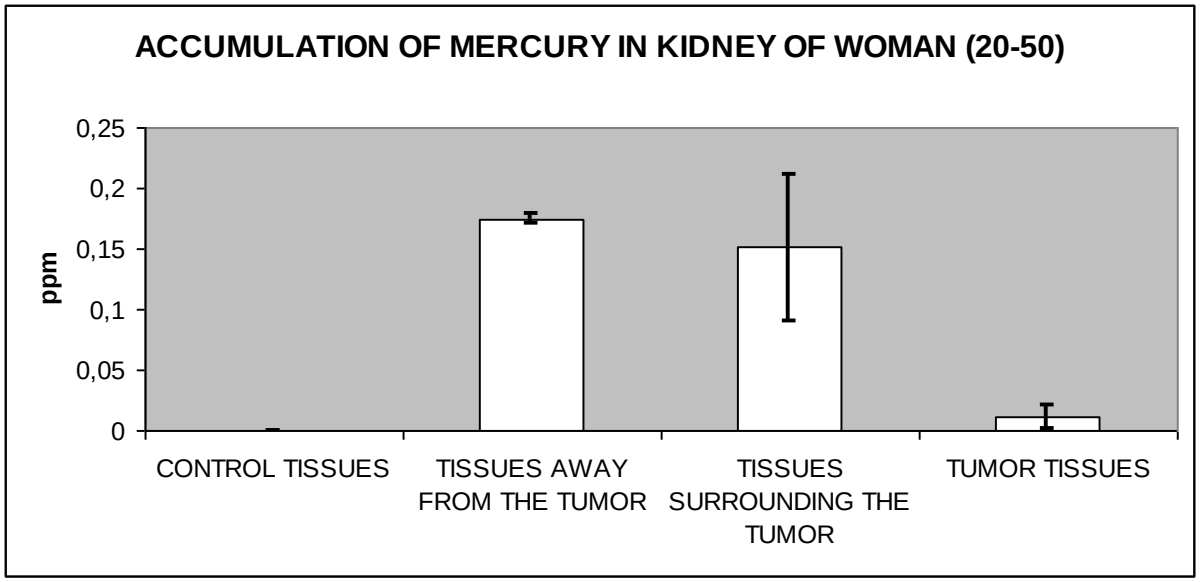


Fig. 3

Accumulation of mercury in kidney of women (20-50 years old).

Mean content of mercury in women (20-50 years old) in control tissues is 0,0005±0,0003 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,174±0,005 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,151±0,061 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,011±0,009 ppm.

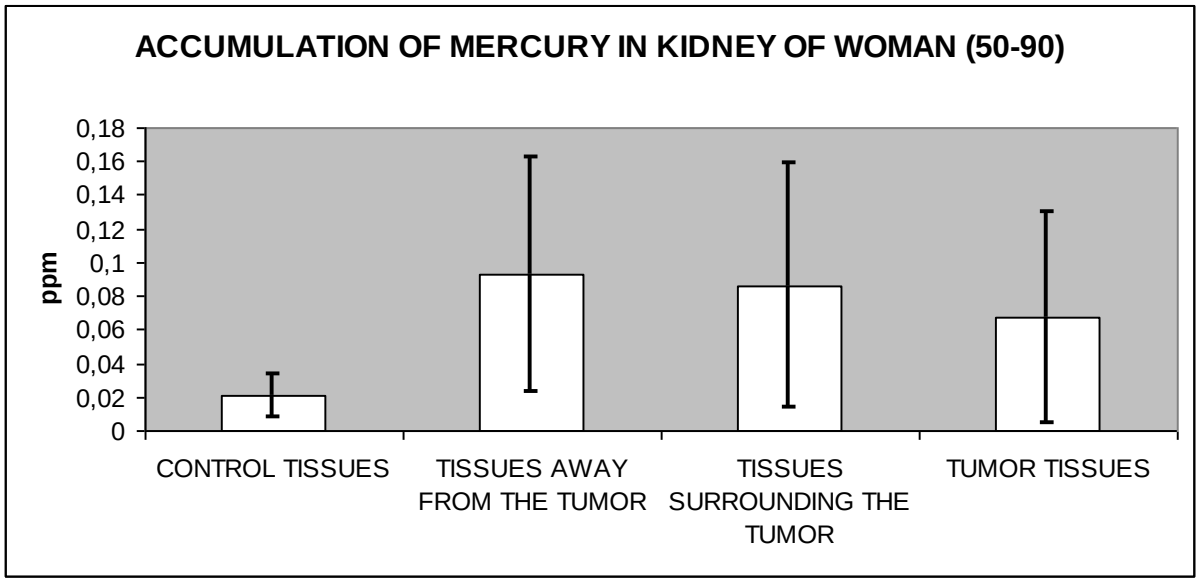


Fig. 4

Accumulation of mercury in kidney of women (50-90 years old).

Mean content of mercury in women (50-90 years old) in control tissues is 0,021±0,013 ppm. The average content of mercury in tissues away from the tumor is 0,093±0,069 ppm. The average content of mercury in tissues surrounding the tumor is 0,086±0,073 ppm. The average content of mercury in tumor tissues is 0,068±0,063 ppm.

Discussion and conclusions

In men 20-50 years old, mean concentration of mercury is higher in cancerous tissues, especially in tissues away from the tumor (0,12 ppm) compared with healthy tissues (control group) (0,02 ppm). Also in men 50-90 years old, mean concentration of mercury is higher in tissues away from the tumor (0,164 ppm) compared with healthy tissues (control group) (0,023 ppm). It shows too

low level of this element in normal tissues of kidney of healthy people, what can protect before initiation of carcinogenesis in kidney.

In women 20-50 years old, mean concentration of mercury is the highest in tissues away from the tumor (0,174 ppm) compared with tumor tissues (0,011 ppm) and healthy tissues (control group) (0,0005 ppm). In women 50-90 years old, mean concentration of mercury is higher also in tissues away from the tumor (0,093 ppm) compared with healthy tissues (control group) (0,021 ppm).

Many adverse health effects are associated with the accumulation of mercury in the body, though these vary depending on the amount of mercury one is exposed to, time of exposure, chemical form of the mercury, and age of the subject **(Shea et al., 2004)**. To date, these more severe symptoms have only been observed in people who consumed fish that were contaminated directly by methylmercury from anthropogenic sources, not from methylmercury that accumulated through the natural methylation process **(Clarkson and Magos, 2006)**. Taking into consideration relationship between mercury and its influence on carcinogenesis it is proved that only organic form of this metal may accumulate in kidney and can cause cancer of this organ. Our analysis also point such connection, because we detected higher level of Hg in cancerous tissues. Mercury content is much higher in patients with tumors (both men and women) in comparison to healthy tissues of both sexes. In all groups, mercury concentration was the highest in tissues away from the kidney tumor, in comparison to mercury content in adjacent mucous membrane and tumor tissues of this organ. The results suggest that some types of cancerous tissues may accumulate more effectively toxic elements.

References

Clarkson, T. W., Magos, L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36 (8): 609-662.

Cohen, H. T., McGovern, F. J. 2005. Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2477–2490.

Ferlay J. et al. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18 (3): 581–92.

Honda, S., Hylander, L., Sakamoto, M. 2006. Recent advances in evaluation of health effects on mercury with special reference to methylmercury: A minireview. *Environmental Health and Preventive Medicine* 11 (4): 171-176.

Kidney cancer incidence statistics. *Cancer Research UK*.

Lindblad, P., Adami H.O. Kidney Cancer. *Textbook of Cancer*.

Lynch, Ch. F., West, M. M., Davila, J. A., Platz, Ch. E. 2007. Cancers of the Kidney and Renal Pelvic. In Horner, M-J; Young, JL; Keel, GE et al. *SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics*. 193–202.

Motzer, R J., Bander, N. H., Nanus, D. M. 1996. Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 335 (12): 865–875.

Shea, K. M., Perry, K. L., Shah, M. 2004. Health effects of methylmercury. *Physicians for Social Responsibility publication.*

THE CONTENT OF MERCURY IN BODY OF MEN TREATED IN CRACOW ONCOLOGY AND SPECIALIST HOSPITALS

Marta GŁOGOWSKA[1], Robert STAWARZ[1]

[1]Department of Vertebrate Zoology and Human Biology, Pedagogical University of Cracow, Poland
e-mail: aisutram22@o2.pl

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the content of mercury both in sick (cancerous) and healthy men in relation age and state of health. The samples coming from men lived in Cracow and area around of the city. Healthy tissues were collected during autopsy, cancerous tissues during surgery.

The content of mercury in the samples was measured using cold vapor atomic absorption spectrometry method (CVAAS). The fragments of esophagus, stomach, small intestine, large intestine, liver, pancreas, kidney, bladder and skin tissues (healthy tissues) and stomach, large intestine, kidney and bladder (cancerous tissues), were placed in a special crucible directly after defrosting and weighing.

The average mercury content in healthy men was significantly higher in the age group 51-90 years old (0,027 ppm), compared to young men (0,008 ppm). Similar differences were obtained for sick men - older men have a slightly higher content of mercury in the organs (0,106 ppm) than men younger (0,088 ppm).

Key words: mercury, neoplasm, CVAAS, cancer

Introduction

Mercury is a heavy metal occurring in several forms, all of which can produce toxic effects in high enough doses. Its zero oxidation state Hg^0 exists as vapor or as liquid metal, its mercurous state Hg_2^{2+} exists as inorganic salts, and its mercuric state Hg^{2+} may form either inorganic salts or organomercury compounds; the three groups vary in effects. Toxic effects include damage to the brain, kidney, and lungs **(Clifton, 2007)**. Mercury poisoning can result in several diseases, including acrodynia (pink disease) **(Bjorklund, 1995)**, Hunter-Russell syndrome, and Minamata disease **(Davidson et al., 2004)**. Symptoms typically include sensory impairment (vision, hearing, speech), disturbed sensation and a lack of coordination. The type and degree of symptoms exhibited depend upon the individual toxin, the dose, and the method and duration of exposure. Common symptoms of mercury poisoning include peripheral neuropathy (presenting as paresthesia or itching, burning or pain), skin discoloration (pink cheeks, fingertips and toes), swelling, and desquamation (shedding of skin). Mercury irreversibly inhibits selenium-dependent enzymes (see below) and may also inactivate S-adenosyl-methionine, which is necessary for catecholamine catabolism by catechol-o-methyl transferase. Due to the body's inability to degrade catecholamines (e.g. epinephrine), a person suffering from mercury poisoning may experience profuse sweating, tachycardia (persistently faster-than-normal heart beat), increased salivation, and hypertension (high blood pressure).

Affected children may show red cheeks, nose and lips, loss of hair, teeth, and nails, transient rashes, hypotonia (muscle weakness), and increased sensitivity to light. Other symptoms may include kidney dysfunction (e.g. Fanconi syndrome) or neuropsychiatric symptoms such as emotional lability, memory impairment, and/or insomnia. Thus, the clinical presentation may resemble pheochromocytoma or Kawasaki disease. An example of desquamation (skin peeling) of the hand of a child with severe mercury poisoning acquired by handling elemental mercury is this photograph in **Horowitz, et al. (2002)**.

The consumption of fish is by far the most significant source of ingestion-related mercury exposure in humans and animals, although plants and livestock also contain mercury due to bioaccumulation of mercury from soil, water and atmosphere, and due to biomagnification by

ingesting other mercury-containing organisms **(USEPA, 1997)**. Exposure to mercury can occur from breathing contaminated air, **(ATSDR, 1999)** from eating foods that have acquired mercury residues during processing, **(Dufault et al., 2009)** from exposure to mercury vapor in mercury amalgam dental restorations, **(Levy, 1995)** and from improper use or disposal of mercury and mercury-containing objects, for example, after spills of elemental mercury or improper disposal of fluorescent lamps **(Goldman and Shannon, 2001)**. Human-generated sources, such as coal plants, emit about half of atmospheric mercury, with natural sources such as volcanoes responsible for the remainder. An estimated two-thirds of human-generated mercury comes from stationary combustion, mostly of coal. Other important human-generated sources include gold production, nonferrous metal production, cement production, waste disposal, human crematoria, caustic soda production, pig iron and steel production, mercury production (mostly for batteries), and biomass burning **(Pacyna et al., 2006)**.

Mercury and many of its chemical compounds, especially organomercury compounds, can also be readily absorbed through direct contact with bare, or in some cases (such as dimethylmercury) insufficiently protected, skin. Mercury and its compounds are commonly used in chemical laboratories, hospitals, dental clinics, and facilities involved in the production of items such as fluorescent light bulbs, batteries, and explosives **(USEPA, 1997)**.

Material and methods

Research was conducted on samples taken from different segments of human digestive tract and human urinary tract. Healthy tissues were taken during autopsy, cancerous tissues during surgery from Military Hospital, PROSMED Health Center in Cracow and Cancer Pathology the Oncology Centre of Maria Skłodowska-Curie in Cracow. Permission for research was given by Local Bioethical Commission. Samples were taken from 24 healthy men (20-90 years old). Fragments of normal tissues were taken from esophagus (n=24 samples), stomach (n=24 samples), small intestine (n=24 samples), large intestine (n=24 samples), liver (n=22 samples), pancreas (n=22 samples), kidney (n=22 samples), bladder (n=21 samples) and skin (n=8 samples). Fragments of cancerous tissues were taken from 265 sick men (20-90 years old) from stomach tumor (n=18 samples), large intestine tumor (n=138 samples), kidney tumor (n=98 samples), bladder tumor (n=11 samples). Average mass of each sample hesitated from 0,5-1g.

Mercury contents were detected using CVAAS methods. This method does not require mineralization and allows the measurement directly in tissue. The small fragments of tissues were placed into the special crucible directly after defrosting and precise weighing. Results of weighting were recorded in the computer using the program, which operate spectrophotometer MA2. The measuring was repeated three times for each sample. All results were expressed in ppm.

Results

Results were analyzed statistically by using Statistica 10 program. In statistical description the following statistics were used: the arithmetic mean and standard deviation. Normality of the distribution was examined by Shapiro-Wilk test. Because none of the normal distributions were noticed, Kruskal-Wallis test for independent trials was used. Statistical analysis was to use the U Mann-Whitney test, to check the differences in the average content of mercury between the two age groups separately for men, healthy and sick. Results are shown in Figure 1 and Figure 2.

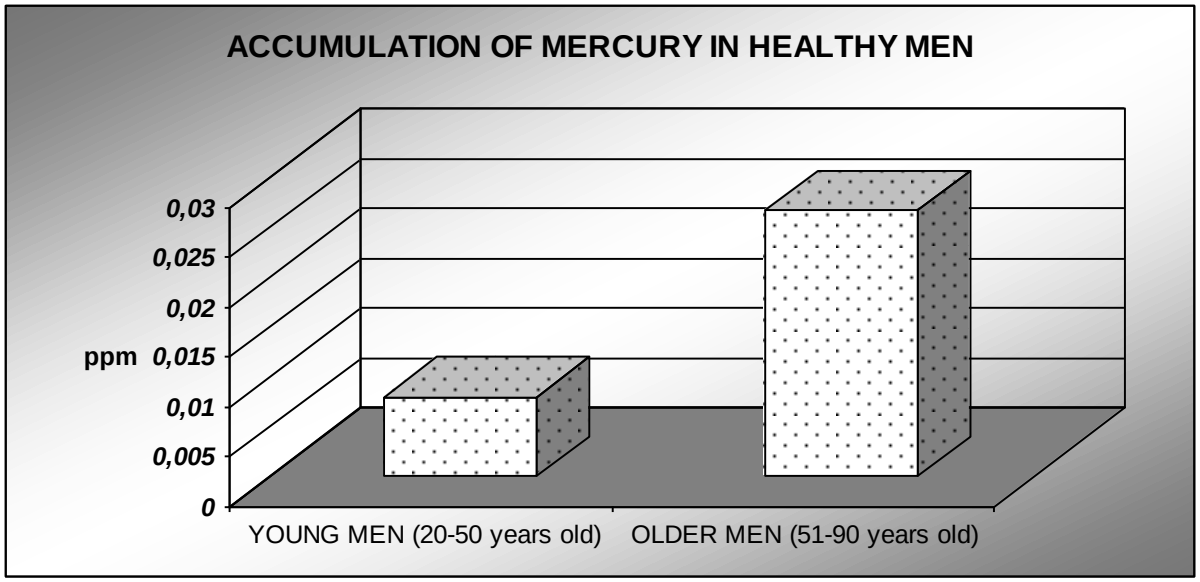


Fig. 1

Accumulation of mercury in healthy men organs

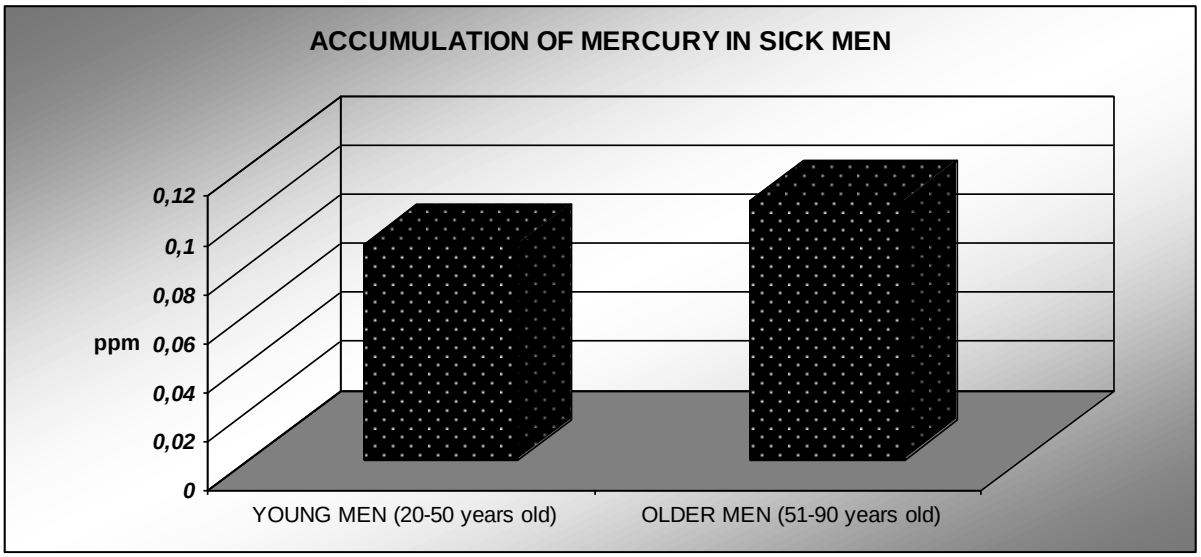


Fig. 2

Accumulation of mercury in sick men organs

Mean content of mercury for tissues young (<50) healthy men is 0,008 ppm. The average content of mercury for tissues older (>50) healthy men is 0,027 ppm. The average content of mercury for tissues young (<50) sick men is 0,088 ppm. The average content of mercury for tissues older (>50) sick men is 0,106 ppm. Statistically significant differences were found between healthy and sick men tissues. In the case of healthy tissues, mercury concentrations was higher in older men.

Discussion and conclusions

In our study we determined presence of Hg in cancerous and normal (healthy) tissues of similar men's organs (bladder, kidney, esophagus, stomach, small intestine, large intestine, liver, pancreas and skin). Compounds of mercury tend to be much more toxic than the elemental form, and organic compounds of mercury are often extremely toxic and have been implicated in causing brain and liver damage. The most dangerous mercury compound, dimethylmercury, is so toxic that even a few microliters spilled on the skin, or even a latex glove, can cause death. Mercuric chloride may cause

cancer as it has caused increases in several types of tumors in rats and mice, while methyl mercury has caused kidney tumors in male rats. The EPA has classified mercuric chloride and methyl mercury as possible human carcinogens.

Metals – such as mercury - are involved in different physical and chemical processes, which are common in cancer development. There are different effects caused by metals in the process of carcinogenesis, such as: damage in DNA, formation of DNA cross-links, the interference of metals with DNA-repair enzymes. Some metals affect the transduction signal by initiation of gene expression disturbances and intracellular communication. Moreover metals may cause of negative effects of the immune system function and disturbances of cellular homeostasis. It is crucial to realize that mercury is especially dangerous because it can be found in things and places which are surrounding us for example tuna has a capacity to accumulate high quantities of mercury in muscles.

It can be stated unequivocally much higher mercury content in cancerous tissues of sick men (0,106 ppm and 0,088 ppm), compared to healthy tissues (control group) (0.027 ppm and 0,008 ppm). Older people have a greater tendency to accumulate heavy metals in their tissues, perhaps because the metals are not the ability to direct carcinogenesis, may interact with other carcinogenic factors, such as metals can inhibit the DNA repair process, increasing the likelihood of mutation and, as a thus - cancer **(Hartwig, 1998, Hu et al., 2004a, 2004b)**. The nucleic acids are capable of intermolecular interaction with different chemical compounds and metal ions.

References

ATSDR Mercury ToxFAQ. 1999. ToxFAQs: Mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Retrieved 2007-07-25.

Bjørklund, G. 1995. Mercury and Acrodynia. *Journal of Orthomolecular Medicine* 10, 145–146.

Clifton, J.C. 2007. Mercury exposure and public health. *Pediatr Clin North Am* 54 (2): 237–69.

Davidson, P.W., Myers, G.J., Weiss, B. 2004. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 113 (4 Suppl): 1023–9.

Dufault, R., LeBlanc, B., Schnoll, R. et al. 2009. Mercury from chlor-alkali plants: measured concentrations in food product sugar. *Environ Health* 8 (1): 2.

Goldman, L.R., Shannon, M.W. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics* 108 (1): 197–205.

Hartwig, A. 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicology Letters* 102-103, 235-239.

Horowitz, Y., Greenberg, D., Ling, G., Lifshitz, M. 2002. Acrodynia: a case report of two siblings. *Arch Dis Child* 86 (6): 453.

Hu, W., Feng, Z., Tang, M.S. 2004. Chromium(VI) enhances (+/-)-anti-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10 tetrahydrobenzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair. *Biochemistry* 43, 14282-14289.

Hu, W., Feng, Z., Tang, M.S. 2004. Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25, 455-462.

Levy, M. 1995. Dental Amalgam: toxicological evaluation and health risk assessment. *J Cdn Dent Assoc* 61: 667–8, 671–4.

Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Steenhuisen, F., Wilson, S. 2006. Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmos Environ* 40 (22): 4048–63.

United States Environmental Protection Agency. 1997. *Mercury Study Report to Congress 3.* Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency.

United States Environmental Protection Agency. 1997. *Mercury Study Report to Congress 4.* Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency.

Influence of smoking on selected metals and antioxidants in breast milk

GOC Z., KILIAN K., STAWARZ R., FORMICKI G., SZAROMA W., GREŃ A., KAPUSTA E.

Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow,
Podbrzezie 3, 31-045 Cracow, Poland

Abstract

The aim of the study was comparison of selected breast milk parameters taken from smoking and non-smoking mothers, being in different age. Concentrations of calcium, mercury, and glutathione (GSH) were measured in milk samples. Also activities of superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), were fixed. Breast milk samples were collected in the morning hours from women were between 20 and 37 years old, living in Cracow in Lesser Poland. All samples were divided in accordance with women' age and smoking addict. According to their age status, 90 mothers were classified into three groups of age: 20-25, 26-31 and 32-37 years. Samples were taken from the selected women between 4^{th} and 14^{th} day postpartum (transitional milk). Results indicate that mercury was present in all analyzed milk samples and its concentrations were higher in milk samples taken from smoking women than taken from non-smoking in all age groups. Mercury concentration in milk samples of smoking women was lower than in milk samples taken from elder women. This fact suggests that smoking can affect mechanisms of detoxification and mercury excretion into breast milk. Mean calcium level was the highest in milk samples taken from smoking mothers in age of 32-37 years old and the lowest level was observed in milk from youngest women. Smoking habit did not have influence on calcium concentration in milk.

Differences between superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) activity and glutathione (GSH) level in milk samples taken from smoking and samples taken from non-smoking women were statistically insignificant in all age groups. This fact suggests that antioxidant properties of milk are always stable and independent of women' age and cigarette smoking.

Investigation of the Paramecium Toxicity Test for Detecting of Heavy Metals in an Aquatic Environment

Magdalena Greczek-Stachura, Patrycja Zagata

Institute of Biology, Pedagogical University
30-089 Kraków, Podchorążych 2

Heavy metals are ubiquitous elements in the natural environment and also but their presence in the environment is associated with contamination by industrial waste. Contamination of aquatic ecosystems with heavy metals has increased, worldwide. The heavy metals can enter the aquatic food chain through direct consumption of water or through consumption of organism living in the contaminated water. Microorganisms and specially ciliates are the key components for the decomposition of organic materials. They are an important link in the aquatic food-chain and they are involved in water purification. Many studies conducted on heavy metals polluted waters have revealed changes in the dynamics of protist communities. The ciliate species present in the polluted sites could become useful bioindicator for the detection of environmental disturbances and assessment of the trophic state.

Paramecium bursaria is a unicellular organisms, which is widely distributed in aquatic environment. Among ciliates *Paramecium* species, only *Paramecium bursaria* maintains several hundred symbiotic algae in their cytoplasm. The algae can supply the host with a photosynthetic product, maltose enable *P. bursaria* to survive under starvation condition.

The present study of *Paramecium bursaria* and its interaction with cadmium, chromium, nickel, copper, zinc may be useful for bioremediation of heavy metals contaminated environment.

Effect of resveratrol on antioxidants in diabetic mice

Greń Agnieszka, Formicki Grzegorz*, Tvrdá Eva**, Goc Zofia*, Kňažická Zuzana**, Lukáčová Jana**, Lukáč Norbert**, Massányi Peter**, Kapusta Edyta**

* Pedagogical University of Cracow , Department of Animal Physiology and Toxicology, Institute of Biology, ul. Podbrzezie 3, Kraków, Poland,

**Slovak University of Agriculture, Department of Animal Physiology, Tr. Andreja Hlinku 2, Nitra, Slovak Republic

*Corresponding author: agrenagren@gmail.com

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is characterized by chronic hyperglycemia, resulting from defects in insulin secretion, action, or both, leading to disturbance in carbohydrate, lipid and protein metabolism. This state induces immediate oxidant stress and free radicals which trigger oxidative stress-linked diabetic complications. Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a natural polyphenol present in various foodstuffs, mainly in grapes where it is synthesized in response to environmental stress conditions. Many studies have demonstrated that this molecule exhibits a wide range of biological and pharmacological activities both in vivo and in vitro. A series of studies showed that resveratrol has anti-oxidant properties, anti-inflammatory properties, and anticancer activity.

The present study was to investigate the effect of resveratrol on alloxan-induced diabetic mice, through analysis of basic biochemical parameters, enzymic as well as non-enzymic activities – superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH).

The experiments were carried out male mice, average body weight 25 – 26g, bred in the constant light conditions LD 12:12 and fed with standard diet with unlimited access to water. Male mice were divided into four groups (n = 6): normal control, diabetic control, normal rats treated with resveratrol, and diabetic rats treated with resveratrol. Alloxan was administered as a single dose (75 $mgKg^{-1}$ body weight) to induce diabetes in mice. A dose of resveratrol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (20 $mgKg^{-1}$ body weight/for 14 days) were administrated orally, to the alloxan-induced diabetic mice. Thirty minutes after the last injection animals were anaesthetized and decapitated. The blood samples were collected from the carotid artery. All blood samples were processed immediately and frozen at minus 70 degrees centigrade until assay.

In animals, the control group average of enzyme activity was respectively: SOD=21,61 U/mg protein; CAT=50,13 U/mg protein and level of GSH=1,93 µM/ml blood. The levels of antioxidants were significantly decreased in blood serum in alloxan-induced diabetic mice. A significant ($p<0.05$) reduction in SOD=14,27 U/mg protein; CAT=38,34 U/mg protein and level of GSH=1,14 µM/ml blood are observed in diabetic group as compared to control mice. After resveratrol administration, there were increases in superoxide dismutase ($p<0.001$), catalase ($p<0.001$) activities and reduced glutathione ($p<0.01$) concentration compared to diabetes mice.

Treating the diabetic mice with doses of resveratrol restored the changes in the above parameters analyzed. The present study, showed that resveratrol exerted antioxidant effects, consequently alleviate damage caused by alloxan-induced diabetes

Keywords: resveratrol, oxidative stress, diabetes, mice

EFFECTS OF DIETARY FUSARIUM MYCOTOXINS ON ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CHICKENS

Ľubomíra GREŠÁKOVÁ , Klaudia ČOBANOVÁ, Štefan FAIX

Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences,
Šoltesovej 4-6, 040 01, Košice, Slovak Republic

Abstract

The effect of medium dietary levels of Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (DON) with or without zearalenone (ZEA) on the activity of glutathione peroxidase (GPx) in blood and tissues,thioredoxin reductase (TrxR) in liver tissue, superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes, the activity of γ-glutamyltransferase (GGT) in plasma and concentrations of malondialdehyde (MDA)in liver and kidney was investigated on Ross 308 hybrid broiler chickens of both sexes. After hatching, all chickens were fed an identical control diet for two weeks. Then chickens of Group 1 fed a diet contaminated with DON (3 mg DON/kg), while Group 2 was fed a contaminated diet containing DON and ZEA, each at a level of 3.4 mg/kg. All contaminated diets were prepared in the laboratory using maize cultivated with Fusarium graminearum. Intake of contaminated diet with the combination of mycotoxins DON and ZEA resulted in significantly increased levels of MDA in liver and kidney tissues, while the activity of TrxR in liver and GPx in both tissues did not affected. On the other hand, feeding of diet contaminated with 3 mg DON/kg and only background ZEA level (0.15 mg/kg) reduced activity of GPx in liver only and increased level of MDA in liver and kidney tissue. The activity of blood GPx and SOD in erythrocytes did not affected by dietary mycotoxins. The activity of GGT in plasma was significantly elevated in all chickens fed contaminated diets. Presented results demonstrate that diet contaminated with DON and ZEA at medium dietary levels is already able to induce oxidative stress in broilers.

Introduction

Mycotoxins as secondary metabolites of several moulds differ in their chemical structure, toxic properties and biological effects. In the mild climatic zone, maize is usually infected by members of the genus Fusarium, especially by the species Fusarium graminearum. The most important mycotoxins produced by these moulds are DON, its acetylated derivatives, ZEA and nivalenol (Binder et al., 2007). Deoxynivalenol (DON) is a member of trichothecene mycotoxin group. The mode of toxic action of DON is inhibition of protein synthesis, thus affecting rapidly dividing cells, such as those of the gastrointestinal tract and the immune system (Sergent et al., 2006). ZEA is a naturally occurring non-steroidal mycotoxin with oestrogenic properties, which is known to induce functional and morphological alteration in reproductive organs due to the activation of estrogen receptors. In addition, ZEA has been shown to be hepatotoxic, haemotoxic, immunotoxic and genotoxic (Zinedine et al., 2007). Adverse effects of mycotoxins on cells are also associated with the increased production of free radicals and reactive oxygen species resulting in oxidative damage of target tissues (Dvorska et al., 2007). The aim of our studies was to investigate the effects of diets contaminated with DON and ZEA in complete feed on parameters of tissue oxidative stress and antioxidant status in fattening chickens.

Material and methods

Experimental design, diets and analysis

One-day-old chickens of Ross 308 hybrid broilers of both sexes were randomly divided into dietary treatment groups and all were fed an identical uncontaminated starter diet for 2 weeks. After this time, control broilers continued to be fed the uncontaminated diet and chickens from experimental Group 1 being fed a diet contaminated with DON (3 mg DON/kg) and only background ZEA level (0.15 mg/kg). Group 2 was given a diet contaminated with DON and ZEA, each at a level of 3.4 mg/kg. Rearing of the chickens was done with a lighting regimen of 23 h light to 1 h dark and lasted for four

weeks. The initial room temperature of 32–33°C was reduced weekly by 18°C to a final temperature of 28°C. All birds had free access to water and feed. To provide stable dietary contents of mycotoxins during the entire experimental period, the chickens were fed only one type of diet (HYD-01). The final diets were obtained by mixing the basal diet (BD, the part of complete diet before addition of 40% portion of control or contaminated maize) with control or contaminated maize batches. Contaminated batches of maize were obtained by their cultivation with Fusarium graminearum for four weeks at the Slovak Agriculture University in Nitra (Labuda et al. 2003). The contents of deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), total aflatoxins, and ochratoxin A in BD and experimental diets are shown in *Table 1.*

Table 1

Final concentrations of mycotoxins in control and experimental diets

Dietary treatment	DON	ZEA	AFLA total	OTA
Control group	0.1	0.005	0.0	0.0004
Group 1 (DON contaminated diet)	3.0	0.15	0.0	0.0004
Group 2 (DON+ZEA contaminated diet)	3.4	3.4	0.0	0.0005

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenone; AFLA total = total aflatoxins; OTA = ochratoxin A

At the end of the 4-week experiment, eight randomly chosen chickens from each treatment were euthanised and tissue samples from liver and kidney were collected. Samples of blood were collected by intracardial punction into heparinised tubes. Mucosa from the duodenum was obtained by scraping. The blood, plasma and tissue samples were stored at –65 °C until analysis. Mycotoxin concentrations in feed were detected using the commercial competitive enzyme-linked immunosorbent assay-based Veratox 5/5 kit (Neogen, Lansing, MI., USA). The activity of blood glutathione peroxidase (GPx) was determined using the method of Paglia and Valentine (1967) with the Ransel kit (Randox, UK). Malondialdehyde concentrations (MDA) in tissue were measured by modified fluorometric methods as described by Jo and Ahn (1998). Haemoglobin (Hb) content of blood and superoxide dismutase (SOD) activity (Arthur and Boyne, 1985) in erythrocytes was analysed using kits from Randox, UK. The protein concentrations in the tissues examined were measured by the spectrophotometric method of Bradford (1976). Spectrophotometric determination of thioredoxin reductase (TrxR) activity was done with a Thioredoxin Reductase Assay Kit by the method of Holmgren and Bjornstedt (1995). The γ-glutamyltransferase (GGT) activity was measured using the kit from Randox, UK, by the method of Szasz (1969).

Statistical analysis

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA) with the post hoc Tukey multiple comparison test using GraphPad Software (USA). The results are given as means ± SEM.

Result and discussion

Two weeks of feeding contaminated diets with mycotoxins resulted in increased levels of MDA in liver and kidney tissue in both experimental groups. A similar response was found in the MDA concentration in kidney of all broilers fed contaminated diets. Intake of contaminated diet with DON (3 mg DON/kg) led to significantly decreased GPx activity in liver tissue only, while no change of TrxR activity in this tissue as well as the activity of GPx in kidney did not affected in any experimental groups (*Table 2*).

Table 2

Concentration of malondialdehyde (MDA), activity of glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) in tissues of broilers fed diet contaminated with deoxynivalenol (DON, 3mg/kg) and combination DON with zearalenone (ZEA), both 3.4 mg/kg).

Parameter	Control	DON	DON+ZEA
Liver			
MDA (nmol·g -1 protein)	195.2±32.4 [a]	382.6±44.8 [b]	397.3±54.7 [b]
GPx (U·g -1 protein)	13.8±1.7 [a]	7.8±1.3 [b]	10.4±1.4 [a]
TrxR (U·g -1 protein)	18.4±1.9	28.01±5.0	24.4±3.6
Kidney			
MDA (nmol·g -1 protein)	133.2±8.4 [a]	214.4±15.4 [b]	232.0±18.3 [b]
GPx (U·g -1 protein)	15.4±3.5	16.7±2.7	17.7±3.1

a, b: Different letters in superscript within a row mean significant difference (P<0.05).

Our results demonstrate increased production of MDA with concomitant significant reduction of GPx activity in liver tissue of broilers fed on diets contaminated with DON. It has been reported that lower GPx activity in tissues is closely connected with an increase in MDA concentration (Balogh et al. 2004). DON contaminated feed has been reported as a factor increasing TBARS formation in rat and mice liver (Rizzo et al. 1994). It was found that dietary inclusion of another trichothecene mycotoxin T-2 toxin also increased lipid peroxidation in the livers of chickens, ducks and geese (Mezes et al.,1999). The kidney tissue activities of GPx did not show any differences between dietary treatments. This could be in part ascribed to a considerably smaller MDA response in kidney tissue to contaminated diets than that in the liver of chickens. Currently it is not clear if mycotoxins stimulate lipid peroxidation directly by enhancing free radicals production, or if the increased tissue susceptibility to lipid peroxidation is a result of a compromised antioxidant system (Surai 2006). It has been shown that DNA damage and apoptosis rather than plasma membrane damage and necrosis may be responsible for toxicity of DON (Minervini et al., 2004). In the liver, the gluthathione and thioredoxin systems are major players in the regulation of cell redox status (Gromer et al., 2004). The decreased activity of GPx in liver tissue together with greater MDA production indicate that combinations of DON and ZEA in concentrations 3.4 mg/kg feed are capable of inducing significant oxidative stress in chickens. Intake of contaminated diet with the combination of mycotoxins DON and ZEA, both being 3.4 mg.kg -1 resulted in significantly increased GGT activity in plasma of chickens while the activity of blood GPx and SOD in erythrocytes did not elevated (*Table 3*).

Table 3

Activity of glutathione peroxidase (GPx) in blood, superoxid dismutase (SOD) in red blood cells (RBC) and activity of γ-glutamyltransferase (GGT) in plasma of broilers fed diet contaminated with deoxynivalenol (DON, 3mg/kg) and combination DON with zearalenone (ZEA, both 3.4 mg/kg).

Parameter	Control	DON	DON+ZEA
GPx in blood (U.g $^{-1}$ Hb)	132.3±12.3	132.9±10.5	134.5±11.2
SOD in erythrocytes (U.g $^{-1}$ Hb)	1295±105	1566±113	1639±47
GGT in plasma (U.L $^{-1}$)	40.7±2.8 [a]	64.9±2.5 [b]	63.4±6.0 [b]

a, b: Different letters in superscript within a row mean significant difference (P<0.05).

The adverse effects of mycotoxins DON and ZEA on the livers of our broilers are demonstrated by findings of increased plasma activities of γ-glutamyltransferase (GGT). This enzyme is known to be involved in the transfer of amino acids across the cellular membrane and in glutathione metabolism. Serum GGT activity is widely used as a marker of liver dysfunction. Our results as well as previous studies show that serum GGT activity may be an early marker of oxidative stress (Lim et al., 2004).

Conclusion

In conclusion, the results of this experiment demonstrate the adverse effects of Fusarium mycotoxins on the antioxidative status in chickens for fattening. It is shown that diets contaminated with DON with or without ZEA at medium levels of about 3 mg/kg feed are already able to induce oxidative stress in liver and kidney tissue.

Acknowledgement

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency, Slovak Republic, Grants No. LPP-0213-06.

References

Arthur JR, Boyne R. 1985. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. Life Sci 36: 1569-1575.

Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J. and Richard, J. (2007): Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 265–282.

Bořutová, R., Faix, Š., Plachá, I., Grešáková, Ľ., Čobanová, K. and Leng, Ľ. (2008): Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. Arch. Anim. Nutr. 62, 303-312.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Dvorska JE, Pappas AC, Karadas F, Speake BK, Surai PF. 2007. Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 145: 582-7.

Gromer S, Urig S, Becker K. 2004. The thioredoxin system - from science to clinic. Med Res Rev 24: 40-89.

Holmgren A, Bjornstedt M. 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. Meth Enzymol 252: 199-208.

Jo C, Ahn DU. 1998. Fluorimetric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. Poult Sci 77: 457-480.

Labuda R, Tancinova D, Hudec K. 2003. Identification and enumeration of Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. Ann Agric Environ Med 10: 61-6.

Lim JS, Yang JH, Chung BY, Kam S, Jacobs Jr. DR, Lee DH. 2004. Is serum γ-glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? Free Radical Bio Med 37: 1018-1023.

Minervini F, Fornelli F, Flynn KM. 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. Toxicol In vitro 18: 21-28.

Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on quantitative and qualitative charactrezation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 70: 158-169.

Sergent, T., Parys, M., Garson, S., Pussemier, L., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentration. Toxicol. Lett. 164, 167–176.

Surai PF. 2006. Selenium and mycotoxins. In: Surai PF, editor. Selenium nutrition and health. Nothingham University Press. p 317-347.

Szasz G. 1969. A kinetic photometric method for serum γ-glutamyltranspeptidase. Clin Chem 15: 124-136.

Zinedine, A., Soriano, JM., Molto, JC. and Manes, J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food Chem. Toxicol.45, 1-18.

POSSIBLE EFECT OF AMYGDALIN IN COMBINATION WITH DEOXYNIVALENOL ON SECRETION ACTIVITY OF PORCINE OVARIAN GRANULOSA CELLS *IN VITRO*

Marek Halenár*[1], Marína Medveďová[1], Nora Maruniaková[1], Adriana Kolesárová[1]

[1]Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic
*Corresponding author: halenarmarek@gmail.com

ABSTRACT

Amygdalin is a controversial anti-tumor natural product found in plants of the *Rosaceae* family that has been used as an alternative cancer drug for many years. One of the most widely distributed trichothecene contaminating food and animal feed is deoxynivalenol (DON) produced by *Fusarium* species. Deoxynivalenol has adverse effects on humans, animals, and crops that result in illnesses. The aim of the present *in vitro* study was to investigated the effect of natural compound amygdalin at the selected doses (1, 10, 100, 1000, 10 000 μg/ml) in combination with deoxynivalenol (1000 ng/ml) on secretion of steroid hormones (progesterone and estradiol) by ovarian granulosa cells from non-cyclic gilts. The release of progesterone and estradiol by granulosa cells was significantly (P≤0.05) increased in experimental group with the highest dose of amygdalin (10 000 μg/ml) in combination with deoxynivalenol (1000 ng/ml) compared to control group without administration of the natural compounds. On the other hand no significant differences in secretion of both steroid hormones were observed. Results from our study suggest possible effects of amygdalin in combination with mycotoxin-deoxynivalenol on secretion activity of porcine ovarian granulosa cells and possible involvement in the steroidogenesis.

Keywords: amygdalin, deoxynivalenol, estradiol, progesterone, health granulosa cells

INTRODUCTION

Amygdalin is one of many nitrilosides, which are natural cyanide-containing substances abundant in the seeds of apricots, almond, peaches, apples, and other rosaceous plants (*Chang et al.,* 2006). Its oldest known use was by the ancient Egyptians as a poison for executing capital punishment: "penalty of the peach". Amygdalin (D-mandelonitrile-β-D-gentiobioside, Fig. 1), $C_{20}H_{27}NO_{11}$, is composed of two molecules of glucose, one of benzaldehyde, which induces an analgesic action, and one of hydrocyanic acid, which is an anti-neoplastic compound (*Chang et al.,* 2006).

It has been used as a traditional drug because of its wide range of medicinal benefits, including curing or preventing cancer, relieving fever, suppressing cough, and quenching thirst. In the late 1970s and early 1980s, amygdalin was reported to selectively kill cancer cells at the tumor site without systemic toxicity and to effectively relieve pain in cancer patients (*Zhou et al.,* 2012). However, the Food and Drug Administration (FDA) has not approved amygdalin as a cancer treatment owing to insufficient clinical evidence of its efficacy and potential toxicity. Despite the failure of clinical tests to demonstrate the anticancer effects of amygdalin in the U.S.A. and in Europe, amygdalin continues to be manufactured and administered as an anticancer therapy in northern Europe and Mexico (*Chang et al*.,2006; *Kwon et al*., 2010).

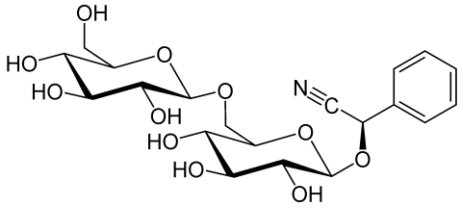


Figure 1

Chemical structure of amygdalin

Deoxynivalenol (DON) is one of the most important and occurring *Fussarium* mycotoxin (*Łazicka and Orzechowski,* 2010; *Klem et al.,* 2007). Occurrence of these mycotoxins is mainly in grains such as wheat, barley and maize (*Creppy,* 2002). DON could be rapidly absorbed after oral administration passively throughout the gastrointestinal tract and actively in the kidneys, liver, muscle, adipose tissue and reproductive tissues. Thus, mycotoxin exposure that alters granulosa cells steroid hormone production may also alter oocyte development, ovulation, reproductive tract function and pregnancy outcome (*Medveďová et al.,* 2011).

Steroid hormones, such as progesterone and estradiol are produced by ovarian cells and both are substantial for normal ovarian cycles (*Hagan et al.,* 2008; *Arnhold et al.,* 2009), contribute to regulation of ovarian follicular development and remodeling (*Mahajan,* 2008). The aim of the present *in vitro* study was to examine the secretion of steroid hormones progesterone and estradiol by health porcine ovarian granulosa cells after addition of natural substances amygdalin and deoxynivalenol.

MATERIAL AND METHODS

Preparation, culture and processing of granulosa cells from ovaries

Ovaries from non-cyclic gilts were obtained from healthy Slovakian White gilts without obvious reproductive abnormalities. Isolated ovaries were transported to the laboratory in containers at 4ºC and washed in sterile physiological solution. Follicular fluid was aspirated from 3-5 mm follicles. Granulosa cells were isolated by centrifugation for 10 min at 200xg followed by washing in sterile DMEM/F12 1:1 medium (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) and resuspended in the same medium supplemented with 10% fetal calf serum (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma, St. Louis, Mo, USA) at the final concentration of 10^6 cells/ml (as detected by haemocytometer). Portions of the cell suspension were dispensed to 24-welled culture plates (Nunc™, Roskilde, Denmark, 1ml/well; for Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA). The well plates were incubated at 37 °C and 5% CO_2 in humidified air until a 75% confluent monolayer was formed (4-5 days), at this point, the medium was renewed and ovarian granulosa cells were incubated with the similar supplements (DMEM/F12 1:1 medium, 10% fetal calf serum, without 1% antibiotic-antimycotic solution) and without (control) or with amygdalin (1, 10, 100, 1000, 10 000 μg/ml) (99 % purity, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) combined with deoxynivalenol (1000 ng/ml) (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria) for 24h. After 24h of incubation the culture media from well plates were aspirated and kept at –80°C for subsequent assay. The concentrations of steroid hormones progesterone and estradiol were assayed using ELISA (Dialab, Wiener Neudorf, Austria) according to the manufacturer´s instructions.

Statistical Analysis

Each experimental group was represented by four culture wells of granulosa cells. Assay of hormone level in the incubation media was performed in duplicate. Significance of differences between the control and experimental groups were evaluated by one-way ANOVA and t-test using statistical software Sigma Plot 11.0 (Jandel, Corte Madera, USA). The data are expressed as means ± SEM. Differences were compared for statistical significance at the P – level less than 0.05 ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Release of progesterone and estradiol by porcine ovarian granulosa cells

The release of progesterone and estradiol by porcine ovarian granulosa cells after addition of amygdalin (1, 10, 100, 1000, 10 000 μg/ml) combined with DON (1000 ng/ml) was detected (Figs. 2, 3). Amygdalin at the highest dose (10 000 μg/ml) in combination with DON (1000 ng/ml) significantly ($P \leq 0.05$) stimulated the release of progesterone (Fig. 2) and estradiol (Fig. 3) by granulosa cells

compared to control group without addition of natural substances. No significant (P≥0.05) differences in secretion of these steroid hormones by granulosa cells were found between control group without addition of both natural compounds and experimental groups with 1, 10, 100, 1000 µg/ml of amygdalin treatment combined with 1000 ng/ml of DON.

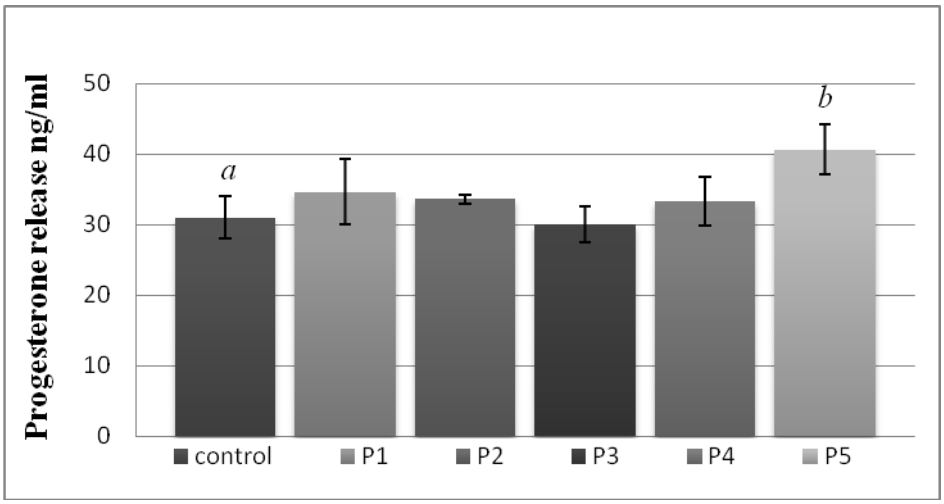


Figure 2

The effect of amygdalin in combination with deoxynivalenol on progesterone release by porcine ovarian granulosa cells.

Control represents culture medium without amygdalin and deoxynivalenol addition. Experimental group P1 represents culture medium with amygdalin (1 µg/ml) plus deoxynivalenol (1000 µg/ml), other groups represent culture medium with amygdalin P2 (10 µg/ml), P3 (100 µg/ml), P4 (1000 µg/ml) and P5 (10 000 µg/ml) plus in each group deoxynivalenol (1000 ng/ml). Signs a,b denote values significantly different from control group (P≤0.05) evaluated by one-way ANOVA and t-test. ELISA.

DISCUSION

Dose-response of amygdalin combined with DON addition to ovarian granulosa cells was examined in this study. Isolated ovarian granulosa cells were able to survive in culture and release hormonal substances progesterone and estradiol after experimental addition of both natural compounds. Findings from our observation suggest that the release of steroid hormones progesterone and estradiol was affected by amygdalin addition in combination with trichothecene deoxynivalenol.

Natural plant origin products like amygdalin are still a major part of traditional medicine (*Nabavizadeh et al*., 2011). In the late 1970s and early 1980s, amygdalin was reported to selectively kill cancer cells at the tumor site without systemic toxicity and to effectively relieve pain in cancer patients (*Zhou et al*., 2012).

The effects of natural substances on animal organism focus on the reproductive system were studied in the previous studies (*Kolesárová et al*., 2012a; 2012b; 2011; *Tanyildizy and Bozkurt*, 2004; *Yasui et al*., 2003; *Randel et al*., 1992). Amygdalin (at 10 000 but not at 1, 10, 100, 1000 µg/ml) combined with DON (1000 ng/ml) significantly (P≤0.05) stimulated the release of steroid hormones

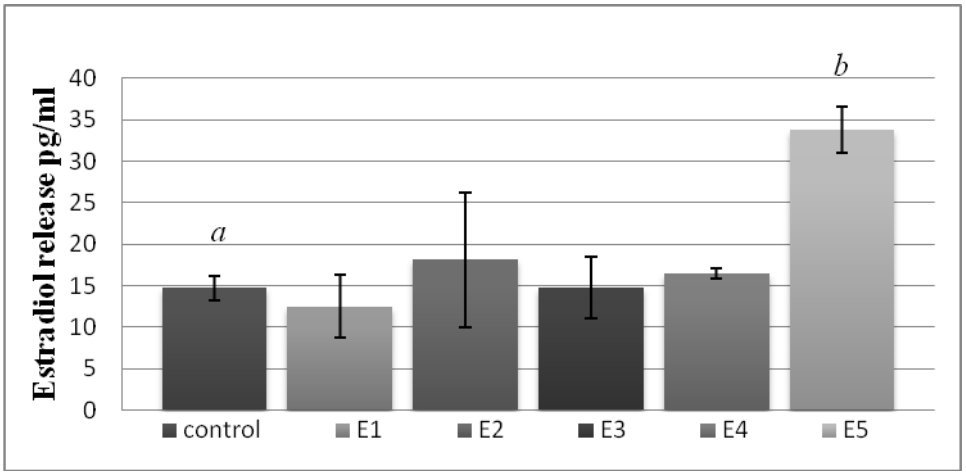


Figure 3

The effect of amygdalin in combination with deoxynivalenol on estradiol release by porcine ovarian granulosa cells.

Control represents culture medium without amygdalin and deoxynivalenol addition. Experimental group E1 represents culture medium with amygdalin (1 µg/ml) plus deoxynivalenol (1000 ng/ml), other groups represent culture medium with amygdalin E2 (10 µg/ml), E3 (100 µg/ml), E4 (1000 µg/ml) and E5 (10 000 µg/ml) plus in each group deoxynivalenol (1000 ng/ml). Signs a,b denote values significantly different from control group (P≤0.05) evaluated by one-way ANOVA and t-test. ELISA.

progesterone and estradiol by porcine ovarian granulosa cells. On the other hand, our recent *in vitro* investigation showed that the release of steroid hormone progesterone by health granulosa cells from cyclic and non-cyclic porcine ovaries was not affected by the amygdalin addition at the doses 1, 10, 100, 1000 and 10 000 µg/ml (*Halenár et al.,* 2013). Previous studies on amygdalin have focused on its purification, toxicity related to the release of cyanide, anti-tumor mechanism, and identification of its metabolites in plasma or herbs, and its pharmacological effect on cancers (*Rauws et al.,* 1982). Possible effect of amygdalin on the male reproductive system was observed in previous study (*Tanyildizi and Bozkurt,* 2004). There are many studies which suggest dose-dependent impact of different mycotoxins on the secretion activity of porcine (*Medveďová et al.,* 2011, *Maruniaková et al.,* 2013, *Ranzenigo et al*., 2008) and rat ovarian cells (*Kolesárová et al.,* 2011). The effect of deoxynivalenol on the steroid secretion by porcine ovarian granulosa cells was examined by *Medveďová et al.* (2011). Progesterone release by porcine ovarian granulosa cells was stimulated by DON treatment at the dose 1000 ng/ml but not at 10 and 100 ng/ml. Previous data also indicated dose-depended effects of DON on ovarian granulosa cells (*Ranzenigo et al.,* 2008). On the other hand, the release of progesterone by porcine ovarian granulosa cells was significantly (P<0.05) inhibited after administration of trichothecene T-2 toxin at the doses 10, 100 and 1000 ng/ml (*Maruniaková et al.,* 2013). The release of progesterone by porcine ovarian granulosa cells after exposure to toxic concentrations of DON, resveratrol, and their combination was studied by *Kolesárová et al.* (2012). These *in vitro* results suggest that reproductive toxicity of animals induced by a mycotoxin – deoxynivalenol can be inhibited by a protective natural substance - resveratrol.

The results of our *in vitro* experiments indicate that amygdalin combined with DON could modify secretion of steroid hormones by granulosa cells and potentially regulate process of steroidogenesis in porcine ovaries.

CONCLUSION

This *in vitro* study was focused on assessment the interaction between natural anti-cancer substance amygdalin and mycotoxin deoxynivalenol. In conclusion, there are still a few studies that suggest possible positive or negative effects of natural substances depending on their toxicity. The

results suggest possible effects of amygdalin in combination with mycotoxin-deoxynivalenol on secretion activity of porcine ovarian granulosa cells and possible involvement in the steroidogenesis.

Acknowledgments:
This work was financially supported by the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic projects no. 1/0790/11 and 1/0022/13 and European Community under project no 26220220180: Building Research Centre „AgroBioTech".

REFERENCES

Arnhold, I.J., Lofrano-Porto, A., Latronico, A.C. (2009): Inactivating mutations of luteinizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women. In *Hormone Research,* vol. 71, 2009, no. 2, p. 75-82.

Creppy, E. E. (2002): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. In *Toxicology Letters*, vol. 127, 2002, no. 1-3, p. 19-28.

Hagan, C.R., Faivre, E.J., Lange, C.A. (2008): Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. In *Steroids*, vol. 74, 2008, p. 568-572.

Halenár, M., Maruniaková, N., Medveďová, M., Kolesárová, A. (2013): The effect of amygdalin on porcine ovarian granulosa cells *in vitro.* In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* vol. 2, 2013, p. 14.

Chang, H.K., Shin, M.S., Yang, H.Y., Lee, J.W., Kim, Y.S., Lee, M.H., Kim, J., Kim, K.H.,Kim, C.J. (2006): Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU145 and LNCaP Prostate Cancer Cells. In *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* vol. 29, 2006, no. 8, p. 1597-1602.

Klem, K., Váňová, M., Hajšlová, J., Lancová, K., Sehnalová, M. (2007): A neural network model for prediction of deoxynivalenol content in wheat grain based on weather data and preceding crop. In *Plant and Soil Environment*, vol. 53, 2007, no. 10, p. 421-429.

Kolesárová, A., Capcarová, M., Baková, Z., Gálik, B., Juracek, M., Simko, M., Sirotkin, A.V. (2011): The effect of bee pollen on secretion activity, markers of proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. In *Journal of Environmental Science and Health*, Part B, vol. 46, 2011, no. 3, p. 207-212.

Kolesárová, A., Capcarová, M., Maruniaková, N., Lukáč, N., Ciereszko, R.E., Sirotkin, A.V. (2012a): Resveratrol inhibits reproductive toxicity induced by deoxynivalenol. In *Journal of Environmental Science and Health*, Part A, vol. 47,

2012a, p. 1329-1334.

Kolesárová, A., Baková, Z., Capcarová, M., Gálik, B., Juracek, M., Simko, M., Toman, R., Sirotkin, A.V. (2012b): Consumption of bee pollen affects rat ovarian functions. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, (Berl).2012b Nov 9.doi: 10.1111/jpn.12013. [Epub ahead of print]

Kwon, H.J., Lee, J.H., Hong, S.P. (2010): Improvement of the extraction efficiency of D-amygdalin from Armeniacae Semen powder through inactivating emulsion and suppressing the epimerization of D-amygdalin. In *Archives of Pharmacal Research*, vol. 33, 2010, p. 81-86.

Łazicka, K.,Orzechowski, S. (2010): The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. In *Natural Science*, vol. 2, 2010, no. 6, p. 544-550.

Mahajan, D.K. (2008): Pig model to study Dynamics of steroid during ovarian follicular growth and maturation. In *Sourcebook of Models for Biomedical Research,* Totowa, New Jersey: Humana Press, 2008, p. 778.

Maruniaková, N., Kolesárová, A., Kádasi, A., Medveďová, M., Halenár, M., Sirotkin, A.V., Grossmann, R., Bulla, J. (2013): Release of progesterone and testosterone by ovarian granulosa cells after addition of T-2 toxin and its combination with growth factor IGF-I. In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* vol. 2, 2013, p. 1864-1874.

Medveďová, M., Kolesárová, A., Capcarová, M., Labuda, R., Sirotkin, A.V., Kováčik, J., Bulla, J. (2011): The effect of deoxynivalenol on the secretory activity, proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. In *Journal of Environmental Science and Health Part B*, vol. 46, 2011, no. 3, p. 213-219.

Nabavizadeh, F., Alizadeh, A.M., Sadroleslami, Z.,Adeli, S. (2011):Gastroprotective effects of amygdalin on experimental gastric ulcer: Role of NO and TNF-α.

In *Journal of Medical Plants Research,* vol. 5, 2011, no. 14, p. 3122-3127.

Randel, R.D., Chase, C.C.Jr., Wyse, S.J. (1992): Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. In *Journal of Animal Science,* vol. 70, 1992, p. 1620- 1638.

Ranzenigo, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P.Y., Spicer, L.J. (2008): Effects of *Fusarium*mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. In *AnimalReproduction Science,* vol. 107, 2008, no. 1-2, p. 115-130.

Rauws, A.G., Gramberg, L.G., Olling, M. (1982): Determination of amygdalin and its major metabolite prunasin in plasma and urine by high pressure liquid chromatography. In *Pharmacy World & Science*, vol. 6, 1982, p. 172-175.

Tanyildizi, S., Bozkurt, T. (2004):*In Vitro* Effects of Linamarin, Amygdalin and Gossypol Acetic Acid on Hyaluronidase Activity, Sperm Motility and Morphological Abnormality in Bull Sperm. In *Turkish Journal* of *Veterinary* and *Animal Sciences,* vol. 28, 2004, p. 819-824.

Yasui, T., Matsuzaki, T., Ushigoe, K., Kuwahara, A., Maegawa, M., Furumoto, H., Aono, T., Irahara, M. (2003): Stimulatory effect of the herbal medicine *Keishi-bukuryo-gan*on a cytokine-induced neutrophil chemoattractant, in rat ovarian cell culture. In *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 50, 2003, p. 90- 97.

Zhou, C., Qian, L.,Ma, H., Yu, X., Zhang, Y., Qu, W., Zhang, X., Xia, W. (2012): Enhancement of amygdalin activated with β-D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, 2012, p. 516-523.

THE EFFECT OF BEE POLLEN AS SUPPLEMENT DIETARY FOR MEAT pH, COOLING AND FREEZING LOSES ON BROILER CHICKENS MEAT

Peter Haščík, Ibrahim Elimam, Jozef Garlík, Marek Bobk, Juraj Čuboň*

Address: Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic.
*Corresponding author: ibrahimelimam18@gmail.com

ABSTRACT

The present study was aimed to achieve the effect of bee pollen as a supplement dietary on broiler chickens for the meat pH value, cooling and freezing loss. A total 180 chicks in one day old which were divided into 6 groups (n = 30). To experimental groups were added bee pollen in different doses [(500 mg/kg (E1); 1500 mg/kg (E2); 2500 mg/kg (E3); 3500 mg/kg (E4) and 4500 mg/kg (E5)] into feed mixture. However the breast muscles pH value was greater in the experimental groups compared to the control groups except E1, E2 after 45 minutes and after 2 hours, and there were found significant differences (P≤0.05) between E1and E2 and between E2 with E4 after 2 hours. Also in thigh muscles the experimental groups were greater except E1, E2 and E3 after 45 minutes and after 2 hours and there found significant (P≤0.05) between E1and E4, and E4 an E5. Otherwise the cooling and freezingloss was higher in experimental groups except E5 in freezing loss and there were found significant differences (P≤0.05) between control group and E1, E2, E5 after 24 hours, also between control group with E2 and between E3 with E5 after 48 hours and there was significant (P≤0.05) between control and E5 groups with E2, E4 groups in freezing loss. The bee pollen has a positive effect on meat pH value but has a negative effect on cooling and freezing loss.

Keywords: bee pollen, broiler, pH meat value, cooling and freezing loss

INTRODUCTION

Broilers are chickens bred and raised specifically for meat production, and it's one of the most common and widespread domestic animals. In this regard, numerous references exist on increasing poultry meat yields and improving carcass quality. For this reason, many ingredients have been used in broiler diets, in recent years (**Karaoğlu *et al.,* 2005**). Complete feed mixtures for broiler chickens are often enriched with various additives as vegetable oils, probiotic, prebiotic and enzyme preparations (**Lee *et al.,* 2003, 2004; Shalmany and Shivazad, 2006)**. It is reported that additional benefits can be gained by supplementing broiler diets, particularly using of bee pollen as feed additives. Bee pollen has been used for many years in both traditional medicine and supplementary nutrition, as well as in alternative diets, mainly due to its nutritional properties and health benefits (**Serra *et al.,* 1997; Isla *et al.,* 2001; Almeida-Muradian *et al.,* 2005**). Pollen loads are formed from the pollen of one plant species, ie. monofloral pollen **(Carrión *et al.,* 2003)**, is shaped pollen grains from different plant species called multifloral pollen, respectively **(Stanley and Linskens, 1974; Barth *et al.,* 2009; Modro *et al.,* 2009)**. Pollen loads or bee pollen is the basic food for the colony as a source of protein for them **(Tüylü and Sorkun, 2004)**. The protein content of pollen is 25-30% carbohydrates, 30-55% fats, including fatty acids and sterols 1-20% and also contains significant amounts of vitamins and minerals. Composition of the pollen provides valuablenutrients such as free amino acids, minerals, polyfenolytic substances and oligo-elements **(Serra *et al.,* 1997; Villanueva *et al.,* 2002; Bastos et al., 2004; Almeida-Muradian *et al.,* 2005; Cocan *et al.,* 2005; Hamamoto *et al.,* 2006; Human and Nicolson, 2006; Yamaguchi *et al.,* 2006)** and therefore is also used in the human diet, which provides a sense of well-being, contributes to functional and well-balanced body has antioxidant properties **(Moreira *et al.,* 2008)** and prevents free radicals **(Hejinen *et al.,* 2002;Villanueva *et al.,* 2002; Bastos *et al.*, 2004; Almeida-Muradian *et al.,* 2005; Silva *et al*., 2006;**

Mărghitas *et al.,* 2009; Stanciu *et al*., 2009). Pollen is also rich in carotenoids, flavonoids, phytosterols and other healthy substances **(Serra *et al.,* 2001; Baltrusaityte *et al.,* 2007; Moreira *et al.,* 2008)**. There are implicit interrelationships between temperature and pH because glycolysis is exothermic, and the effects of pH are severe when a carcass is still near body temperature. The corollary of this tenet is that low glycogen levels at slaughter will prevent the normal *post-mortem* increase in meat reflectance, thus leaving muscles, as in the live animal. Three biophysical mechanisms have been proposed to explain how a low-pH causes increased reflectance (**Hamm, 1960; Bendall and Wismer-Pedersen, 1962; Swatland, 2004**): (1) denaturation of sarcoplasmic proteins, (2) increased surface reflectance from myo-fibrils, (3) increased refraction through myofibrils. Meat quality is influenced, to a large extent, by the rate of pH decline in the muscles after slaughter and by the ultimate pH (**Hambrecht *et al.,* 2004; Muchenje *et al.,* 2009**). The rate of pH decline is a good predictor of the colour and drip loss of meat (**Aberle *et al.,* 2001; Muchenje *et al.,* 2008**). The object of this work is to verify the influence of bee pollen on broiler´s chickens Ross 308 meat pH values, cooling and freezing loses.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

The experiment was implemented in the test poultry station of Slovak University of Agriculture in Nitra. The experiment included 180 one day-old chicken hybrid combination Ross 308, which were divided into 6 groups (n=30): control (C) and experimental groups (E1, E2, E3, E4 and E5). Chickens experimental were fed from one day old to 42 days of age by *ad libitum system* with feed mixture HYD-01 (until the age of 21st days) and HYD-02 (from 22nd to 42nd days of age). Feed mixtures HYD-01 and HYD-02 were produced without any antibiotic preparations and coccidiostats. Their nutritional value (Table 1) was the same in each group during the whole experiment, but the experimental groups of broiler chickens were addition natural bee pollen to broiler feed mixture at doses of 500 mg/kg (E1); 1500 mg/kg (E2); 2500 mg/kg (E3); 3500 mg/kg (E4) and 4500 mg/kg (E5).

Sample analysis

At the end of the fattening (42 days) from each group were chosen 120 chickens for slaughter, and the technology quality of broiler chickens were determined pH measured in (45 minutes, 2 and 24 hours after slaughtering) the measurement of pH has been measured by a pH meter equipped with an electrode calibrated (Grif 209L apparatus) at pH 4.0 and 7.0 before measuring. The pH is easier measured by probe method by inserting a thin electrode directly into the muscle after incision of the muscle. The experimental analysis was evaluated at Department for evaluation and processing of animal products at Faculty of Biotechnology and Food Sciences Slovak university of agriculture in Nitra.

Statistical Analysis

The results of the experiment were evaluated with statistical program Statgraphics Plus Version 5.1 (AV Trading Umex, Dresden, Germany), were calculated variables-statistical values (arithmetic mean, standard deviation) and to determine the evidential difference between groups we used variance analyses with subsequent Scheffé's test.

Table 1. Composition of the broiler feed mixture

Ingredients (%)	Starter (1 to 21 days of age)	Grower (22 to 42 days of age)
Wheat	35.00	35.00
Maize	35.00	40.00
Soybean meal (48 % N)	21.30	18.70
Fish meal (71 % N)	3.80	2.00
Dried blood	1.25	1.25
Ground limestone	1.00	1.05
Monocalcium phosphate	1.00	0.70
Fodder salt	0.10	0.15
Sodium bicarbonate	0.15	0.20
Lysine	0.05	0.07
Methionine	0.15	0.22
Palm kernel oil Bergafat	0.70	0.16
[1]Premix Euromix BR 0,5 %1	0.50	0.50
Analyzed composition (g/kg)		
Crude protein	210.76	190.42
Fibre	30.19	29.93
Ash	24.24	19.94
Ca	8.16	7.28
P	6.76	5.71
Mg	1.41	1.36
ME_N ($MJ.kg^{-1}$) by calculation	12.02	12.03

[1] active substances per kilogram of premix: vitamin A 2 500 000 IU; vitamin E 50 000 mg; vitamin D3 800 000 IU; niacin 12 000 mg; d-pantothenic acid 3 000 mg; riboflavin 1 800 mg; pyridoxine 1 200 mg; thiamine 600 mg; menadione 800 mg; ascorbic acid 50 000 mg; folic acid 400 mg; biotin 40 mg; vitamin B12 10.0 mg; choline 100 000 mg; betaine 50 000 mg; Mn 20 000 mg; Zn 16 000 mg; Fe 14 000 mg; Cu 2 400 mg; Co 80 mg; I 200 mg; Se 50 mg

RESULTS AND DISCUSSION

The meat pH value of broiler breast muscles after application bee pollen as a supplemental dietary into the feed mixture, were shown in (Table 2). After 45 minutes the results were mentioned that the pH value in experimental groups were higher comparison to the control group except E2, E3 and there was significant differences (P≤0.05) between E1 with E2, E3, groups, also the value of pH after 2 hours was higher in experimental groups comparison to the control group except E2, E3 and there was significant differences (P≤0.05) between E2 with E4, on other hand the value of pH after 24 hours were higher in experimental groups than control group and there were no significant differences.

Table 3. summarize the meat pH value of thigh muscles, there were found the value of pH after 45 minutes in experimental groups were higher than control group, except E2, E3 and there was significant differences (P≤0.05) between E1 and E4, similar after 2 hours they found that the experimental groups were higher comparison to control except E1, E2, E3, also after 24 hours were found thatthe experimental groups were higher than control except E1, E2 E3 and there was no significant differences. Our results are confirm (**Šulcerova *et al.,* 2011**) who studied the effect of bee pollen and propolis on broiler (Ross 308) breast and thigh muscles. However the present study in agreement with (**Elimam *et al.,* 2012**) who studied the effect of bee on broiler´s Ross 308 pH value of the breast and thigh musclesthigh muscles, in the thigh findings but contrary in the breast muscles findings. Also the recent study are support (**Haščík *et al.,* 2010**) who tested probiotic on broiler. The

reason why the bee pollen improves the meat pH value, because bee pollen decrease the meat oxidative (**Haščík *et al.,* 2011**) and also bee pollen is antibacterial pathogens **(Basime *et al*., 2006; Kňazovická *et al*., 2009)** according to this reason, the pH meat value will be increased. Table 4. shows the results of cooling and freezing loss, however after 24 hours were found that the experimental groups were greater comparison to the control group and were found significant differences (P≤0.05) between control and E1, E2, E5 similar results were observed after 48 hours and they found that the experimental groups were higher in experimental than the control group and were found significant differences (P≤0.05) between control and E1, E5, also there was significant between E3 and E5.

Moreover the freezing loss was greater in experimental groups than control except E5 and there were significant differences (P≤0.05) between control and E3, E4, also were found significant between E5 with E3, E4. Our study support **(Ngapo *et al.,* 1999**) who studied the effects of freezing and thawing rate on drip loss from samples of pork. Why the bee pollen increases the cooling and freezing loss, because bee pollen increase meat water content (**Haščík *et al.,* 2012**), might that reason which has been explained why the bee pollen increase the cooling and freezing loss.

Table 2. pH of the breast muscles

Indicators	C	E1 (pollen 500 mg/kg)	E2 (pollen 1500 mg/kg)	E3(pollen 2500 mg/kg)	E4 (pollen 3500 mg/ kg)	E5(pollen 4500 mg/kg)
	30	30	30	30	30	30
45 minutes	6.16 ± 0.07^{abc}	6.20 ± 0.06^{a}	6.12 ± 0.08^{bc}	6.13 ± 0.04^{b}	6.20 ± 0.07^{ac}	6.17 ± 0.05^{abc}
2 hours	6.09 ± 0.03^{ab}	6.12 ± 0.08^{ab}	6.06 ± 0.06^{a}	6.07 ± 0.04^{ab}	6.10 ± 0.06^{b}	6.10 ± 0.06^{ab}
24 hours	6.00±0.03	6.03±0.13	6.00±0.06	6.01±0.09	6.04±0.09	6.03±0.06

*C: control group, *E1, E2, E3, E4, E5 experimental groups; $^{a, b, c}$:Values are expressed as means ± standard error (n = 30); (P ≤ 0. 05) Levels.

Table 3. pH of the thigh muscles

Indicators	C	E1 (pollen 500 mg/kg)	E2 (pollen 1500 mg/kg)	E3 (pollen 2500 mg/kg)	E4 (pollen 3500 mg/ kg)	E5(pollen 4500 mg/kg)
	30	30	30	30	30	30
45 minutes	6.52 ± 0.09^{ab}	6.49 ± 0.10^{a}	6.49 ± 0.07^{ab}	6.46 ± 0.08^{ab}	6.58 ± 0.06^{b}	6.52 ± 0.06^{a}
2 hours	6.46±0.09	6.40±0.09	6.40±0.08	6.40±0.09	6.47±0.11	6.48±0.04
24 hours	6.30±0.08	6.26±0.14	6.26±0.06	6.28±0.11	6.30±0.06	6.31±0.06

*C: control group, *E1, E2, E3, E4, E5 experimental groups; $^{a, b, c}$:Values are expressed as means ± standard error (n = 30); (P ≤ 0. 05) Levels

Table 4. cooling and freezing loss

Indicators	C	E1 (pollen 500 mg/kg)	E2 (pollen 1500 mg/kg)	E3 (pollen 2500mg/kg)	E4 (pollen 3500 mg/ kg)	E5 (pollen 4500 mg/kg)
	30	30	30	30	30	30
Cooling loss after 24 hours	3.48 ± 0.41^{a}	3.86 ± 1.31^{b}	4.46 ± 1.07^{b}	4.09 ± 0.51^{ab}	4.49 ± 0.38^{ab}	4.08 ± 0.61^{b}
Cooling loss after 48 hours	4.24 ± 0.51^{a}	4.47 ± 0.38^{abc}	5.17 ± 1.04^{bc}	4.76 ± 0.26^{ac}	5.28 ± 0.45^{abc}	5.31 ± 0.59^{b}
Freezingloss after 2 months	2.84 ± 1.40^{ac}	3.66 ± 0.39^{ab}	3.68 ± 1.23^{abc}	4.12 ± 0.64^{b}	4.07 ± 0.93^{b}	2.74 ± 0.20^{c}

*C: control group; *E1, E2, E3, E4, E5 experimental groups; $^{a, b, c}$:Values are expressed as means ± standard error (n = 30); (P ≤ 0. 05) Levels

CONCLUSION

From the recent study we conduct that the bee pollen has a positive effect on the meat pH value except doses of 1500 and 2500 mg/kg. But the bee pollen has a negative effect on cooling and freezing loss.

Acknowledgments

This work was supported by the VEGA grants from the Ministry of Education Science, Research and Sport of the Slovak Republic, grant No. 1/0129/13.

REFERENCES

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.V. 2001. Principles of meat science . Dubuque. IA, Kendall/Hunt Publ. Co.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B., PAMPLONA, L. C., COIMBRA, S., BARTH, O. M.2005 Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis, Rome,* 18 (1) 105-111.

BALTRUSAITYTE, V.,VENSKUTONIS,P.R., CEKSTERYTE, V.2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts.*Food Chemistry*, 101, 502-514.

BASIM, E., BASIM H., OZCAN. M. 2006. Antibacterial activities of turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*,77, 992-996.

BASTOS, D. H. M., BARTH, O.M., ROCHA, C. I., CUNHA, I. B. D., CARVALHO, P. D., TORRES, E.A. S., MICHELAN, M. 2004. Fatty acid composition and palynological analusisof bee (Apis) pollen loads in the states of sao paulo and Minas Gerais, Barzil. *Journal ofapicultural research*, 43,35-39.

BENDALL, J. R.,WISMER-PEDERSEN, J. 1962. Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *Journal of Food Science*, 27, 144-159.

COCAN, O., MARGHITAS, L. A., DEZMIREAN, D., LASLO, L. 2005. Compositionand biological activities of bee pollen: review.*Bulletin of the University of AgriculturalScience and Veterinary Medicine*, 61, 221-226.

HAMAMOTO, R., ISHIYAMA, K., YAMAGUCHI, M. 2006. Inhibitory effects of beepollen Cistus ladaniferus extract on bone resorption in femoral tissues and osteoclast-like cellmformation in bone marrow cells *in vitro*. *Journal of Health Science*, 52, 268- 275.

HAMBRECHT, E., EISSEN, J.J., NOOIJEN, R.I. J., DUCRO, B. J., SMITS, C. H. M., HARTOG, L.A. 2004. Pre-slaughter stress and muscle energy largery determine pork quality and two commercial processing plants. *Journal of Animal Science*, 82, 1401-1409.

HAMM, R. 1960. Biochemistry of meat hydration. *Advances in Food Research*, 10, 355-463.

HAŠČÍK, P., MICHAL, M., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., PRÍVARA, Š., VAVRIŠINOVÁ, K., Arpášová H., Kunová.S. 2010.Effect of multistrain probiotic aplication on changes in breast and thigh muscle of hybro broiler chickens post mortem. *Potravinárstvo*, special issue,143-151.

HEJINEN, C. G., HAENEN, G. R. , OOSTVEEN, R. M., STALPERS, E. M. , BAST, A. 2002. Protective of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*, 36, 575-581.

ISLA, M. I., MORENO, M. I. N., SAMPIETRO, A. R., VATTUONE, M. A.2001 Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology, Leiden*, 76, 165-170.

KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H. 2011. The effect of bee pollen as dietary supplement on meat chemical composition for broiler ross 308.*Časopis Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LXI, 71-76.

KARAOĞLU, M., AKSU, M.İ., ESENBUGA, N., MACIT, M., DURDAĞ, H. 2005. pH and Colour Characteristics of Carcasses of Broilers Fed with Dietary Probiotics and Slaughtered at Different Ages. *Asian- Australasian. Journal Animal Science*,19, 605-610.

KŇAZOVICKÁ, V., MELICH, M., KAČÁNIOVÁ, M., FIKSELOVÁ, M., HAŠČÍK, P., AND CHLEBO.R. 2009.Antimicrobial activity of selected bee products.Actafytotechnica et zootechnica – Mimoriadnečíslo, 280-285.

LEE, K. W., EVERTS, H., BEYNEN, A. C. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal Poultry Science*, 3, 738-752.

LEE, K.W., EVERTS, H., KAPPERT, H. J., FREHNER, M., LOSA, R., BEYNEN, A. C. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44, 450-457.

MĂRGHITAS, L.A., STANCIU, O.G., DEZMIREAN, D.S., BOBIS, O., POPESCU, O., BOGDANOV, S., CAMPOS, M.G. 2009. In vitro antioxidant capacity of honey bee collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115, 878-883.

MOREIRA, L., DIAS, L. G., PEREIRA,J. A., ESTEVINHO, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal.*Food Chemistry and Toxicology*, 46, 3482-3485.

MUCHENJE, V., DZAMA, K., CHIMONYO, M., STRYDOM, P. E., RAATS, J. G. 2009. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Science*, 81,653-657.

MUCHENJE, V., DZAMA, K., CHIMONYO, M., STRYDOM, P.E., HUGO, A., RAATS, J.G. 2008. Sensory evaluation and its relationship to quality attributes of beef from Nguni and Bonsmara steers raised on natural pasture. *Animal,* 2, 1700-1706.

NGAPOA, T.M., BABAREB,I.H.REYNOLDSB, J.,MAWSONB.R.F. 1999. Freezing and thawing rate effects on drip loss from samples of pork. Meat Science, 53, (3) 149-158.

SERRA BONVEHI, J., ESCOLA, JORDA, R. 1997. Nutrient composition and The microbiological quality of honey bee collected pollen in Spain.*Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 725-732.

SERRA BONVEHÍ, J., SOLIVA TORRENTÓ, M., CENTELLES LORENTE, E., 2001 Evaluation of polyphenolic and flavonoidcompounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington*, 49,1848-1853.

SHALMANY, K.S., SHIVAZAD, M. 2006. The Effect of Diet Propolis Supplementation on Ross Broiler Chicks Performance. *International Journal of Poultry Science,* 5, 84-88.

SILVA, T.M.S., CAMARA, C. A., LINS, A.C.S., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA,E.M.S., FREITAS, B.M., SANTOS, F., DE A.R. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee Melipona subnitida duck. In*Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511.

STANCIU, O. G., MARGHITAS,L. A., DEZMIREAN, D.2009. Macro- and oligo-mineral elements from honeybee-collected pollen and beebread harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnology*, 66, 1-2.

ŠULCEROVÁ, H., MIHOK, M., JŮZL M. HAŠČÍK. P. 2011. Effect of addition of pollen and propolis to feeding mixture during the production of broiler chickens Ross 308 to the colour for thigh and breast muscles and pH determination. *Časopis Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 44, 359-366.

SWATLAND, H. J. 2004. Progress in understanding the paleness of meat with a low pH. *South African Journal of Animal Science*, 34,1-4.

TÜYLÜ, A. S., SORKUN, K. 2004. Organoleptic analysis of economically significant pollen samples collected in bursa region by *Apis mellifera* L. *Mellifera*, 4, 38-44.

VILLANUEVA, M. T. O., MARQUINA, A. D., SERRANO, R. B., ABELLÁN, G. B.2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53, 217-224.

YAMAGUCHI, M., HAMAMOTO, R., UCHIYAMA, S., ISHIYAMA, K., HASHIMOTO, K. 2006. Anabolic effects of bee pollen Cistus ladaniferus extract on bonecomponents in the femoral diaphyseal and metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Health Science*, 52, 2006, 43-49.

THE EFFECT OF THE PROPOLIS EXTRACT ON BROILER HUBBARD JV INTERAL FAT

Peter Haščík[1], Jozef Garlík[1], Ibrahim Omer Elimam Elamin[1], Miroslava Kačániová[2], Vladimíra Kňazovická[1]

[1.] Department of Animal Products Evaluation and Processing, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia
[2.] Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

ABSTRACT
The aim of the experiment was to evaluate the influence of feed mixtures with propolis extract on weight and fat creation in carcass body of chickens from Hubbard JV hybrid combination. Propolis extract was applied into the feed mixtures in amount of 150 mg kg^{-1} (1st experimental group), 450 mg kg^{-1} (2nd experimental group), 600 mg kg^{-1} (3rd experimental group) and 800 mg kg^{-1} (4th experimental group). Fattening was lasted for 42 days on deep litter (sawdust). Into the experiment, 500 pieces of 1-day chickens were included and then 5 groups of 100 pieces were created: control group – C (without propolis extract application) and 4 experimental groups – E1, E2, E3 and E4 (with a dose of propolis extract). Higher weight of carcass body ($P \geq 0.05$) was found in E1 and E2 groups (1022.37 g - E1 and 1019.75 g - E2) compared with C group (1005.12 g) and lower weight of carcass body ($P \geq 0.05$) was found in E3 and E4 group (927.37 and 916.75) compared with control group. Significant differences ($P \leq 0.05$) were found between the groups E1 and E4, E2 and E4, E1 and E3 and between the groups E2 and E3. The lowest content of abdominal fat was recorded in control group and in E4 group (0.73%). In experimental groups, values of abdominal fat content were decreased by gradual increasing of propolis extract dose in Hubbard JV chicken nutrition (1.03% - E1, 0.99% - E2, 0.80% - E3 and 0.73% - E4). Gizzard fat from carcass body was value-balanced and ranged from 0.29% (E1) to 0.44% (E3). Heart fat was from 0.047% (P4) to 0.068% (P1).Internal fats were considered together from carcass body and the value ranged from 1.17% (P4) to 1.43% (P2). In control group, internal fat was 1.21%. Content of internal fat from carcass body as well as abdominal, gizzard and heart fat contents showed no significant differences ($P \geq 0.05$) between the groups. We found that propolis extract positively influenced the carcass body weight only in E1 and E2 groups. In these groups, no distinctive impact on fat creation was detected. Propolis in the doses of 150 mg kg^{-1} and 450 mg kg^{-1} can be recommended to application in nutrition of Hubbard JV chickens. Higher concentration of propolis extract (600 mg kg^{-1} and 800 mg kg^{-1}) may result in decrease of carcass body weight.

Keywords: chickens Hubbard JV, propolis extract, fat

INTRODUCTION

Consumption of poultry meat has had a growing trend in Slovakia, it was approximately of 19.9 kg per head in 2007 **(Nagy, 2009)**. Poultry is characteristic for the best conversion of nutrients into the meat and therefore production costs as well as prices of poultry products on the world market are relatively low compared with the other animal products. Effort is to breed more efficient hybrids, to improve the conversion of nutrients and to shorten the fattening period **(Marcinčák et al., 2008)**. Primary importance of fat in human nutrition is presence of polyunsaturated fatty acids, which have an essential role in organism as precursors for variety of biologically active substances. Broiler chickens have fat content of 5-7%, of which approximately 30% are saturated fatty acids and 70 % are unsaturated fatty acids **(Halaj and Golian, 2000)**. Poultry fat contains a higher amount of polyunsaturated fatty acids compared with the other carcass animals. It is caused by relatively high content of phospholipids in membrane structures of muscle cells **(Bystrický and Dičáková, 1998)**.

The complete feed mixtures are used for nutrition of broiler chickens. Over the last few years, feed mixtures have been enriched by probiotic preparations or by other available additions,

which are added into the feed mixtures as a possible substitution for excluded animal meals, antibiotic preparations and coccidiostats, what is in accordance with new legislation determined by laws and regulations of European Union and for the purpose of health state improvement, mortality reducing and the better utilization of feed nutrients as are described in papers by **Fuller (1992)**, **Nahashon et al. (1992)**, **Kumprecht and Zobač (1998)**, **Haščík et al. (2004, 2006, 2007)** and **Bobko et al.(2009)**. Integration of new component in animal nutrition has to retain technological, nutritional and sensorial properties of meat without their deterioration **(Aleson-Carbonell et al., 2004; P´erez-Alvarez, 2006)**. As alternative substitutions in nutrition, bee products (pollen, propolis or their extracts) may be employed, because they can have positive influence on health state, economic use of feed and quality of product **(Prytzyk et al., 2003; Wang et al., 2004; Haščík et al., 2005a, b, 2007; Angelovičová et al., 2006, 2008; Shalmany a Shivazad, 2006; Seven et al., 2008 and others.)**. Several plant supplements contain substances, which increase the gluttony and digestion **(Barreto et al., 2008)**. Some researchers showed these substances may stimulate a natural immunity of poultry and may decrease the pathogen microorganisms' activity **(Cross, 2002; Dalloul et al., 2003; Kačániová et al., 2011)**. The contemporary basic requirements in poultry nutrition are to respect the poultry physiological demands on consumption of energy and nutrients, to keep a good animal health and a high yield **(Suchý and Straková, 2004**). **Haščík et al. (2005a)** stated that intensive selection and efficacy of feed mixtures used in chicken nutrition for the last decades shorten the fattening period to less than half, but intensive growth of chickens caused an increased fat deposition, mainly in abdominal cavity in form of abdominal fat. According to **Simoneová (1999)**, large part of subcutaneous fat, fat placed in abdominal cavity and in intestinal region belong to the total body fat. Excessive accumulation of broiler abdominal fat is a result of imbalance between the energy intake and output, while amount of abdominal fat decreases with reduced energy consumption **(Skřivan, 2000)**. **Hood (1984)** and **Fischer et al. (1990)** found that energy intake reduction in food mixture by 20-25% had an influence on substantial decrease and reduction of body fat.

Lipid content in poultry meat depends on various factors as e. g. animal species, breed, gender, origin, and muscle anatomy **(Benková et al., 2005)**. Fat is important in term of meat sensorial properties for consumer, because fat is a source of aromatic substances influencing mainly the taste **(Pipek, 2000)**. Fatty compounds are considered as a taste medium, and only 1-2% fat from total animal weight is sufficient for this purpose (**Winkelmayer et al., 2005**). Meat of mammals and birds are different and birds' meat, with certain exceptions, is culinary prepared and consumed with skin, subcutaneous connective tissue, together with blood vessels and nerves, which are in meat **(Uhrín et al., 1993)**. All these facts influence substantially the taste properties of poultry meat. But certain negatives occur; it is primarily the increase of energy value, which is caused by subcutaneous fat connective tissue and by lipids of the skin.

Fat in certain amount is an important part of meat. An excessive fat tissue formation is considered as an undesired consequence of modern broiler type selection for increased growth. Fat accumulated in broiler carcass bodies is a waste product for consumer; nutritional value of food increases unacceptably following with possible risk to human health and carcass yield is artificially increased **(Mahmouda and Mihaly, 1998)**. According to **Ochrimenko et al. (1997)**, chemical composition of broiler chickens fat causes an unpleasant smell and fatty acids placed in the fat negatively influenced the taste of broiler chickens. Also based on these factors, intestinal, heart, gizzard and abdominal fat represent certain economic losses, because of carcass yield decrease. Increased fat deposition in broiler bodies is not desirable for producer and for consumers, too **(Cherian and Wolfe, 1996; Lichtenstein, 1999)**.

Following the literature sources and new trends in poultry nutrition, the aim of the experiment was to verify the influence of propolis extract applied in various concentrations on carcass body weight and on proportion of internal fats in carcass body of Hubbard JV chickens.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Experiment was performed in poultry test station Zámostie Company. Tested animals were broiler chickens of Hubbard JV hybrid combination. Five hundreds of one-day old chickens were

included in the experiment and five groups of one hundred pieces per each were created as follows: control group – C (without propolis extract application) and four experimental groups – E1, E2, E3 and E4 (with certain dose of propolis extract). Chicken fattening lasted forty two days. Chickens were bred on deep litter (sawdust). Feed mixture was served using tubular feeders. Feed mixtures were mixed and prepared according to Gazette of Ministry of Agriculture and Rural Development (original name: Vestník MP SR) (2004) in Biofeed Company located in Kolárovo. Feed mixtures were analysed in term of basic nutrients and energy value at the Department of Animal Nutrition (Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra). Feed mixture was manually served in periodic intervals each day and chickens were fed by the system *ad libitum*. All evaluated groups were fed by starter feed mixture HYD-01 (powder form) to 21st day of age and then, from 22nd day to 42nd day of age, all animals were fed by feed mixture HYD-02 (powder form). Feed mixtures HYD-01 and HYD-02 were produced without antibiotic preparations and coccidiostats. Nutritional value of the feed mixtures was uniform in each group during the experiment, but in experimental groups, propolis extract was added to both feed mixtures at a dose of 150 mg kg^{-1} (E1), 450 mg kg^{-1} (E2), 600 mg kg^{-1} (E3) and 800 mg kg^{-1} (E4). Propolis originated in Slovak Republic. Propolis extract was prepared from milled propolis and was mixed with 80% ethanol **(Krell, 1996)**. Propolis solution was extracted in water bath at 80 °C for 1 hour under the reflux. Solution was centrifuged after extracting and cooling. Obtained supernatant was evaporated at 40-50 ° C using rotary vacuum evaporator and water bath. Then the residue was weighted. The evaporation of residues at dose of 15 g (E1), 45 g (E2), 60 g (E3) and 80 g (E4) were separately dissolved in 1000 cm3 of 80% ethanol and applied into the 100 kg of each feed mixture intended for evaluated group of Hubbard JV chickens. Water was available *ad libitum* by self-powered system using nipple drinkers with drip tray. At the end of fattening (42nd day), 60 pieces (30 male pieces and 30 female pieces) from each group were selected for carcass analysis, which was performed at Department of Animal Products Evaluation and Processing (Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra). We evaluated the carcass body weight and proportion of fat tissue from carcass body weight of Hubbard JV chickens (proportion of abdominal, gizzard, heart and total internal fat). Weights were measured on analytical scales of KERN 440-33N type with the accuracy of 0.01 g and calculated. Results of the experiment (arithmetic average, standard deviation) were statistically assessed using programme Statgraphics Plus version 5.1 (AV Trading, Umex, Dresden, Germany). Analysis of variance followed by Duncan test was used to determine significance of differences between the groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtained values of carcass body weight, abdominal, gizzard, heart and total internal fat expressed as percentages from carcass body of Hubbard JV hybrid combination chickens are recorded in the tab 1.

Higher carcass body weight ($P \geq 0.05$) was found in the 1st and 2nd experimental group (E1 – 1022.37 g, E2 – 1019.75 g) compared with the control group (1005.12 g). Lower carcass body weight ($P \geq 0.05$) was detected in the 3rd and 4th experimental group (E3 - 927.37 g, E4 – 916.75 g) compared with control group. Significant difference ($P \leq 0.05$) in carcass body weight was detected between the 1st and 4th experimental group, between the 2nd and 4th experimental group, between the 1st and 3rd experimental group and between the 2nd and 3rd experimental group. Carcass body weights detected in this experiment are higher than results of **Seven et al. (2008)** and are lower compared with results of **Haščík et al. (2010, 2012)**, who used a probiotic preparation and pollen extracts in nutrition of Ross 308 chickens.

The lowest content of abdominal fat in carcass body was detected in control and 4th experimental group (0.73%). The values of abdominal fat in carcass body decreased in experimental groups by gradually increasing doses of propolis (E1 – 1.03%, E2 – 0.99%, E3 – 0.80%, E4 – 0.73%) without significant differences ($P \geq 0.05$) between the groups. **Angelovičová (1997)** tested a reduced level of metabolisable energy in feed mixtures and found comparable results of abdominal fat in carcass body, in numbers below 1.00%. Results did not confirm a tendency of abdominal fat

increased deposition in groups with propolis extract application in nutrition of Hubbard JV chickens. **Haščík et al. (2005a)** stated similar conclusion in experiment with application of probiotic preparation through the water. Obtained results of abdominal fat content are lower compared with results of **Uhrín et al. (1993)** and **Krížková et al. (1995)**, who recorded these values in 1.5-3.0%.

Tab 1 Meat performance and presence of internal fat in Hubbard JV carcass body

Indicator	Group				
	C	E1	E2	E3	E4
Carcass body weight (g)	1005.12^{ab}± 115.77	1022.37^{a}± 103.74	1019.75^{a}± 74.66	927.37^{b}± 66.25	916.75^{b}± 51.63
Content of abdominal fat in carcass body (%)	0.73±0.39	1.03±0.29	0.99±0.36	0.80±0.43	0.73±0.33
Content of gizzard fat in carcass body (%)	0.42±0.32	0.29±0.15	0.39±0.13	0.44±0.39	0.38±0.28
Content of heart fat in carcass body (%)	0.051±0.030	0.068±0.030	0.051±0.010	0.054±0.010	0.047±0.020
Content of total internal fat in carcass body (%)	1.21±0.39	1.41±0.31	1.43±0.30	1.31±0.56	1.17±0.34

C – control group, E1 – 1st experimental group, E2 – 2nd experimental group, E3 – 3rd experimental group, E4 – 4th experimental group,

Note.: Average values in the line followed by different letter have significant differences at $P \leq 0.05$.

Content of gizzard fat in carcass body was without significant differences ($P \geq 0.05$) between the groups and the values ranged from 0.29% (E1) to 0.44% (E3). Obtained results are lower than results of **Haščík et al. (2007)**, who found its content from 0.59% to 0.69%. **Horváthová and Lagin (1985)** and **Lagin (1989)** recorded content of gizzard fat in higher values from 0.99% to 1.02%.

Content of heart fat in carcass body was found from 0.047% (E4) to 0.068% (E1). No significant differences ($P \geq 0.05$) were detected between the groups of experiment. Obtained results of heart fat content is in accordance with results found by **Haščík et al. (2007)**, who detected its content in numbers to 0.06%.

Total internal fat in carcass body was evaluated, too. The lowest content of total internal fat was detected in the 4th experimental group (1.17%) and the highest content of total internal fat was detected in the 2nd experimental group (1.43%). In control group, content of total internal fat was 1.21%. Significant differences were not detected between the groups of experiment.

CONCLUSION

In the experiment, propolis extract was applied into the feed mixtures for chickens of Hubbard JV hybrid combination in amount of 150 mg kg^{-1}, 450 mg kg^{-1}, 600 mg kg^{-1} and 800 mg kg^{-1}. Influence of propolis extract on carcass body weight and fat deposition in carcass body was tested. Lower concentration of propolis extract (150 mg kg^{-1} and 450 mg kg^{-1}) influenced positively the carcass body weight, but in experimental groups with higher concentrations (600 mg kg^{-1} and 800 mg kg^{-1}) of propolis, carcass body weight decreased ($P \geq 0.05$) compared with control group. Between the

control and experimental groups, no significant differences ($P \geq 0.05$) were detected in content of abdominal, gizzard, heart and total internal fat in carcass body. Propolis extract in tested concentrations (150 mg kg^{-1} and 450 mg kg^{-1}) may be applied in nutrition of Hubbard JV chickens, because no negative effect on fat content and increased carcass body weight were detected. However, propolis extracts concentration of 600 mg kg^{-1} and 800 mg kg^{-1} are not recommended, because decreased carcass body weights were found.

REFERENCES

ALESON-CARBONELL, L., FERN´ANDEZ-L´OPEZ, J., SENDRA, E., SAYAS-BARBER´A, E., P´EREZ-ALVAREZ, J. A. 2004. Quality characteristics of a non-fermented dry-cured sausage formulated with lemon albedo. In *Journal Science of Food Agriculture*, vol. 84, p. 2077-2084.

ANGELOVIČOVÁ, M. 1997. Vplyv nízkobielkovinových tukovaných kŕmnych zmesí na živú hmotnosť a vybrané ukazovatele jatočnej kvality výkrmových kurčiat. In *Poľnohospodárstvo*, roč. 43, s. 764-771.

ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2006. Uplatnenie biotechnologického postupu náhrady kŕmneho antibiotika premixom škoricovej silice vo výžive výkrmových kurčiat. In *Biotechnológie*, 2006, JU: České Budějovice, p. 134-136, ISBN 8085- 645-53-X.

ANGELOVIČOVÁ, M., LADYKOVÁ, M., LIPTAIOVÁ, D., MOČÁR, K., ŠTOFAN, D. 2008. Riešenie náhrady kŕmnych antibiotík rastlinnými silicami pri výrobe kuracieho mäsa In *IX. potravinárska konferencia : Otvorené fórum o stave bezpečnosti, kvality a kontroly potravín,* Bratislava, p. 41-45.

BARRETO, M. S. R., MENTEN, J. F. M., RACANICCI, A. M. C., PEREIRA, P. W. Z., RIZZO, P. V. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. In *Brazilian Journal of Poultry Science,* vol. 10, no. 2, p. 109-115.

BENKOVÁ, J., BAUMGARTNER, J., HETÉNYI, L. 2005. Hydinové mäso – významná zložka racionálnej výživy obyvateľstva. In *Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR – využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb.* Nitra : SAPV, s. 31-32. ISBN 80-89162-18-5.

BOBKO, M., LAGIN, L., ANGELOVIČOVÁ, M., BOBKOVÁ, A., HAŠČÍK, P. 2009. Vplyv prídavku fytoaditív na kvalitu kuracieho mäsa. In *Potravinárstvo*, Nitrianske Hrnčiarovce, vol. 3, p. 3-7.

BYSTRICKÝ, P., DIČÁKOVÁ, Z. 1998. Živočíšne tuky v potravinách. In *Slovenský veterinársky časopis, Suplementum 1*, vol. 23, p. 1-45.

CROSS, M. L. 2002. Microbes versus microbes: Immunesignals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS. In *Immunol. Med. Microbiol*., vol. 34, p. 245-253.

DALLOUL, R. A., LILLEHOJ, H. S., SHELLEM, T. A., DOERR, J. A. 2003. Enhanced mucosal imunity against eimeria acervulina in broilers fed a lactobacillus-basedprobiotic. In *Poultry Science*, vol. 82, p. 62-66.

FISHER, C., GOUS, R. M., EMMANS G. C., BROADBENT. L. A. 1990. Nutritional effects on the growth and fatness of broilers. In *Poultry Science*, vol. XXXI, no. 3, p. 495-505.

FULLER, R. 1992. Probiotics. In *Scientificasis*, ChapmanHall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1992, p. 398.

HALAJ, M., GOLIAN, J. 2000. Problematika vaječného cholesterolu v ľudskej výžive. In *Zborník prednášok a posterov Hygiena alimentorum XXI*, Štrbské pleso – Vysoké Tatry, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, p. 232-239.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., VAGAČ, V. 2004. Hodnotenie senzorickej kvality hydinového mäsa vplyvom probiotického preparátu IMB 52. In *Maso*, roč. 15, č.1, s. 62-65.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., HORNIAKOVÁ, E., KRIVÁNEK, L., KULÍŠEK, V. 2005a. Vzťah medzi aplikáciou probiotického preparátu a množstvom abdominálneho tuku u výkrmových kurčiat. In *Poľnohospodárstvo*, roč. 51, s. 574-579.

HAŠČÍK, P., WEIS, J., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., MAKOVICKÝ, P., KAČÁNIOVÁ, M. 2005b. Vplyv probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat ROSS 308 na chemické zloženie mäsa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 8, s. 20-24.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., KAČÁNIOVÁ, M., KULÍŠEK, V. 2006. Vplyv probiotického preparátu na zloženie mäsa kurčiat. In *Maso*, Praha, 2006, vol. XVII, p. 13-15.

HAŠČÍK, P., BOBKO, M., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., PAVLIČOVÁ, S. 2007. Vplyv probiotického preparátu na tvorbu tuku v tele kurčiat. In *VII. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov,* Nitra : SPU, s. 85-91. ISBN 978-80-8069-886-7-0.

HAŠČÍK, P., MIHOK, M., KAČÁNIOVÁ, M., CAPCAROVÁ, M., ARPÁŠOVÁ, H., BENCZOVÁ, E. 2010. Sledovanie mäsovej úžitkovosti a tvorby tukového tkaniva u kurčiat Ross 308 vplyvom aplikácie probiotického preparátu v ich výžive. In *X. Risk factors of food chain*, Nitra, p. 101-108, ISBN 978-80-552-0436-9.

HAŠČÍK, P., ELIMAM, I., GARLÍK, J., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M. ABDULLA, H. 2012. Impact of bee pollen as feed supplements on the body weight of broiler Ross 308. In *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 89, p. 15596-15599.

HOOD, R. L. 1984. Cellelar and biochemical aspects of fat deposition in the broiler chicken. In *Jounal of Poultry Science,* vol. XL, no. 2, p. 160-169.

HORVÁTHOVÁ, V., LAGIN, L. 1985. Technologická a nutričná hodnota brojlerových kurčiat hybrida Slovgal. In *Živočíšna výroba*, roč. LVIII, s. 761-768.

CHERIAN, G., WOLFE, F. W. 1996. Dietary oils with added tocopherols: Effect on eggs or tissue tocopherols, fatty acids and oxidative stability. In *Poultry Science*, p. 423-431.

KAČÁNIOVÁ, M., HAŠČÍK, P., HLEBA, L., POCHOP, J., MELICH, M., KŇAZOVICKÁ, V., LEJKOVÁ, J., ARPÁŠOVÁ, H. 2011. Bee products effect to microbial colonization of chickens gastrointestinal tract. In *Potravinárstvo*, vol. 5, p. 372-376.

KRELL, R. 1996. Value-Added products from bee keeping. In Milan, *FAO Publications*, 395 p., ISBN 92-5-103819-8.

KŘÍŽKOVÁ, E., ČERMÁK, B., KADLEC, J., LÁD, F. 1995. Zhodnocení podílu jednotlivých partií drůbežího masa po porážce. In *Aktuálni problémy zdraví, růstu a produkce drůbeže*, Scientific Pedagogoc Publishing : České Budějovice, s. 139-140. ISBN 80-85645-15-7.

KUMPRECHT, I., ZOBAČ, P. 1998. Účinek probiotických preparátů na bázi Sacharomyces cerevisiae a Enterococcus ve směsích s rozdílnou hladinou vitamínů skupiny B na úžitkovost kuřecích brojlerů. In *Czech Journal of Animal Science*, roč. 43, s. 63-70.

LAGIN, L. 1989. Jatočná hodnota kurčiat kombinácie Hybro. In *Živočíšna výroba*, roč. LXII, s. 655-662.

LICHTENSTEIN, A. H. 1999. Dietary fat: A history. In *Nutr. Revision*, vol. 57, p. 11-14.

MAHMOUDA, H., MIHALY, S. 1998. Effects of L-carnitine supplementation of diets differing in energy levels on performance, abdominal fat content, yield and composition of edible meat broilers. In *British Journal Nutrition,* vol. 80, p. 391-400.

MARCINČÁK, S., NAGY, J., ŠÁLY, J., POPELKA, P. 2008. Účinok skrmovania olejového extraktu oregana na oxidačnú stabilitu hydinového mäsa. In *Náš chov*, vol. 68, no. 10, p. 38-39.

NAGY, J. 2009. *Hygiena a technológia hydinya vajec*. Košice, *Edičné stredisko Univerzity veterinárskeho lekárstva*, 393 s. ISBN 978–80–8077–132–4.

NAHASHON, S. N., NAKAUE, H. S., MIROSH, L.W. 1992. Effect of direct-feed microbilas on nutritient retention and production parameters of laying pullets. In *Poultry Science*, vol. 71, no. 1, p. 111.

OCHRIMENKO, W. I., RICHTER, G., RUDOLPH, B., BARGHOLZ, J., REICHARDT, W., LUBBE, F., LEMSER, A. 1997. Influence of linseed on fattening performance and fat quality of broilers. In *Archiv für Geflugelkünde*, vol. LXI, no. 4, p.181-185.

P´EREZ-ALVAREZ, J. A. 2006. Aspectostecnol´ogicosde los productos crudo-curados. In HUI, Y. H., GUERRERO, I., ROSMINI, M R., Mexico -Limusa: *Ciencia y Tecnolog´ıadeCarnes*, 2006, p. 463-492.

PIPEK, P. 2000. Kvalitní hovězí maso z technologického a spotřebitelského hlediska. In *Maso*, roč. 11, s. 18-22.

PRYTZYK, E., DANTAS, A. P., SALOM˜A. O. K., PEREIRA, A. S., BANKOVA, V., S. DE CASTRO, S. L., AQUINO NETO, F. R. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of bulgarian propolis. In *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 88, p. 189-193.

SEVEN, T. P., SEVEN, I., YILMAZ, M., SIMSEK, G. Ü. 2008. The effects of Turkish propolis on growth and carcass charasteristics in broilers under heat stress. In *Animal Feed Science and Technology*, vol. 146, p. 137-148.

SHALMANY, K. S., SHIVAZAD, M. 2006. The Effect of Diet Propolis Supplementation on Ross Broiler Chicks Performance. In *International Journal of Poultry Science,* vol.5, p. 84-88.

SIMEONOVÁ, J. 1999. *Technology of Poultry, Eggs and other Minor Animal Products (in Czech)*. MZLU : Brno, 247 s., ISBN 80-7157-405-8.

SKŘIVAN, M. 2000. *Poultry Raising 2000 (in Czech).* In Agrospoj : Praha, 203 s.

SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E. 2004. Nutriční strategie intenzifikace chovu drůbeže. In *Dni výživy a veterinárnej dietetiky.* Bratislava : ŠVPS SR, s. 51-53, ISBN 80-213-1037-5.

UHRÍN, V., HORVÁTHOVÁ, V., HORNIAKOVÁ, E. 1993. *Kvalita hydinového mäsa*. In *Acta zootechnica*, Nitra : VŠP, 111 s., ISBN 80-7137-124-6.

VESTNÍK MP SR, 2004. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 23. augusta 2004 č.2145/2004-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. októbra 1997 č. 1497/4/1997-100 o úradnom odbere vzoriek a o laboratórnom skúšaní a hodnotení krmív

v znení výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 12. februára 2003 č, 149/2/2003-100, roč. 36, 2004, čiastka 22.

WANG, B. J., LIEN,Y. H., YU, Z. R. 2004. Super critical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. In *Food Chem*istry, vol. 86, p. 237-243.

WINKELMAYER, R., LEBERSORGER, P., ZEDKA, H. F., FOREJTEK, P., VODŇANSKÝ, M., VEČEREK, V., MALENA, M., NAGY, J., LAZAR, P. 2005. In *Hygiena zvěřiny.* In Wien-Brno-Nitra:, Středoevropský institut ekologie zvěře, p. 168.

Acknowledgments:
This work was supported by grant VEGA 1/0129/13.

Contact address:

- doc. Ing. Peter Haščík, PhD email: peter.hascik@uniag.sk
- Ing. Jozef Garlík, email: jozef.garlik@gmail.com
  Msc. Ibrahim Omer Eliman Elimam, email: alkrshola@yahoo.com
- doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., email: miroslava.kacaniova@uniag.sk
- Ing. Vladimíra Kňazovická, PhD., email: vladimira.knazovicka@uniag.sk

XENOBIOTIC - INDUCED PEROXISOMES IN THE RABBIT LIVER

HOLOVSKÁ K., ALMÁŠIOVÁ V., CIGÁNKOVÁ V.

Depatrment of Histology and Embryology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT

The study investigated changes in ultrastructure of the liver in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) which was administered bendiocarb for 3 days. Electron microscopy was used to observe changes in ultrastructure of hepatocytes. The changes were focal and the effect on the liver was not uniform. Some hepatocytes showed no obvious changes in their ultrastructure. In the changed hepatocytes, we observed dilatation of bile capillaries but no visible alterations in the intercellular contacts. Many hepatocytes showed considerable increase in the number of peroxisomes. We observed, that bendiocarb induced ultrastructural changes of hepatocytes but only to a moderate extent.

INTRODUCTION

The current agricultural practice involves the use of many protective chemical substances which contribute to considerable environmental contamination. These environmental contaminants include also insect control preparations. Carbamate insecticides are widely used for agricultural and indoor purposes. They act as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors which affect many organs, such as peripheral and central nervous system, muscles, liver, brain and heart. Bendiocarb is a toxic insecticide. In the body it undergoes hydrolysis to organic metabolites which can also affect the total toxicity of this insecticide. Bendiocarb is rapidly detoxified and excreted (Bendiocarb, 1982). Despite that many scientists observed various morphological changes in different organs. Immunosuppressive effects of bendiocarb were observed after its long-term administration (Mojžišová, 2004). It also induced morphological changes in lymphatic organs. Flešárová et al. (2007) performed morphometric analysis of the thymus exposed to bendiocarb and observed decreased number of cells and reduced volume of its medullar portion. An adverse effect of bendiocarb on the structure of lymph nodes was confirmed by Petrovová et al. (2010) and Špaleková et al. (2010). Almašiová et al. (2012) observed a subchronic influence of bendiocarbamate on histological structure of kidneys which exhibited changes of varying extent in both the cortex and medulla. Bendiocarb caused damage not only in renal corpuscles, but also in individual parts of renal tubules.

Carbamate insecticides are metabolised particularly in the liver due to various chemical reactions aimed at conversion of lipophilic compounds to hydrophilic ones. Because of that our study focused on the influence of bendiocarbamate on the structure and ultrastructure of liver in the common rabbit, the non-target species.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

The experiment was carried out on 12 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), 54-day old, hybrid Hyla-27, mean weight 2.0±0.20 kg. The clinically healthy rabbits were kept in a well ventilated environment and received a standard diet Norm-type-0-10 (BIOFER, 7313/A) and water *ad libitum*. The animals were divided into two groups, six animals in each (control and day 3). Rabbits in experimental group were administrated bendiocarb (96 % Bendiocarb, Bayer) perorally at a dose of 5 mg/kg per day in capsule (Petrovová et al., 2010). The condition of the animals, their manipulation and use corresponded with the requirements of the ethical commission.

Ultrastructural study

The samples intended for transmission electron microscopy (TEM) were fixed in 3 % glutaraldehyde, postfixed in 1 % OsO_4 (both in a phosphate buffer pH 7.2-7.4), dehydrated in acetone and embedded in Durcupan ACM (Fluka). The ultrathin sections were cut on an ultramicrotome Tesla BS 490, stained with uranyl acetate and lead citrate and evaluated under a transmission electron microscope Tesla BS 500.

RESULTS

In the control group we observed hepatocytes of polyhedric shape with a centrally located, round, euchromatic nucleus and pronounced nucleolus. Plasma membranes of neighbouring hepatocytes contacted by their lateral surfaces where one could observe canalicular forms, the bile capillaries. Microvilli protruded into their lumen. In these places the plasma membranes were connected by desmosomes and tight intercellular junctions. The plasma membrane of the apical portion of hepatocytes contained microvilli which extended to the space of Disse.

Mitochondria prevailed in the cytoplasm of hepatocytes. They had oval or round shape with cristae mitochondriales. Their matrix contained electron-dense granules. The hepatocytes had well developed endoplasmic reticulum (ER) and Golgi system. The granulated endoplasmic reticulum consisted of dense, parallel canals with numerous ribosomes. In the cytoplasm, there were also free ribozomes arranged into spirals or rosettes.

The space of Disse was separated from sinusoids by fenestrated endothelial cells. Their cytoplasmic membrane formed short interconnected projections. The cytoplasm of endothelial cells contained compact, oval nucleus, mitochondria and pinocytal vesicles. Kuppfer cells could be observed in blood sinusoids. They had large, oval, euchromatic nucleus of irregular shape. The cytoplasm was light, contained mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosomes of various shape and size. Ito cells, the so-called lipocytes, could be observed sporadically in the space of Disse. Their nucleus was large and irregular. A characteristic feature of these cells was the presence of fat droplets of varying size (Fig. 1).

In the experimental group**,** which were administered bendiocarb for 3 days**,** we observed ultrastructural changes of varying extent in the liver. The organ was not affected uniformly. The ultrastructure of some hepatocytes was comparable with that in the control. On the other hand, the number of peroxisomes was markedly increased in many hepatocytes. These organelles had considerably electron-dense matrix and occurred on the periphery of hepatocytes, or were uniformly distributed in the cytoplasm. Small fat droplets appeared sporadically in the hepatocytes (Fig. 2). Pronounced changes were observed also in bile capillaries. They were dilated and the microvilli were reduced. However, there were no visible changes in intercellular contacts of adjacent hepatocytes. These cells showed changes in both bile capillaries and the nucleus. The nucleus had an irregular shape but retained its nucleal membrane (Fig. 3).

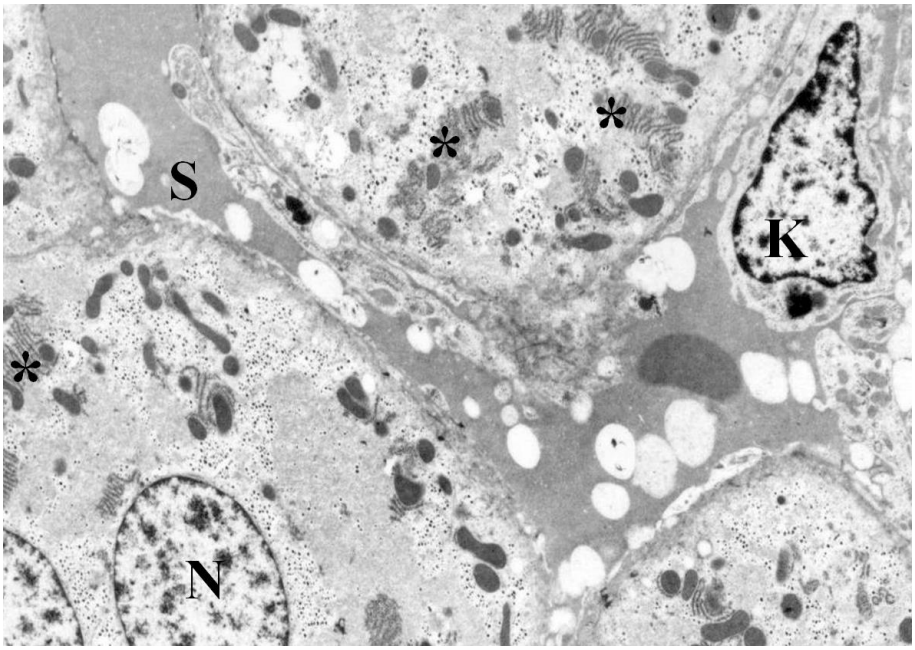


Figure 1 Ultrastructure of liver of control rabbit. N - nucleus; S - sinusoid; K - Kupffer cell; asterisk - rough endoplasmic reticulum
Magn. 4 250 x

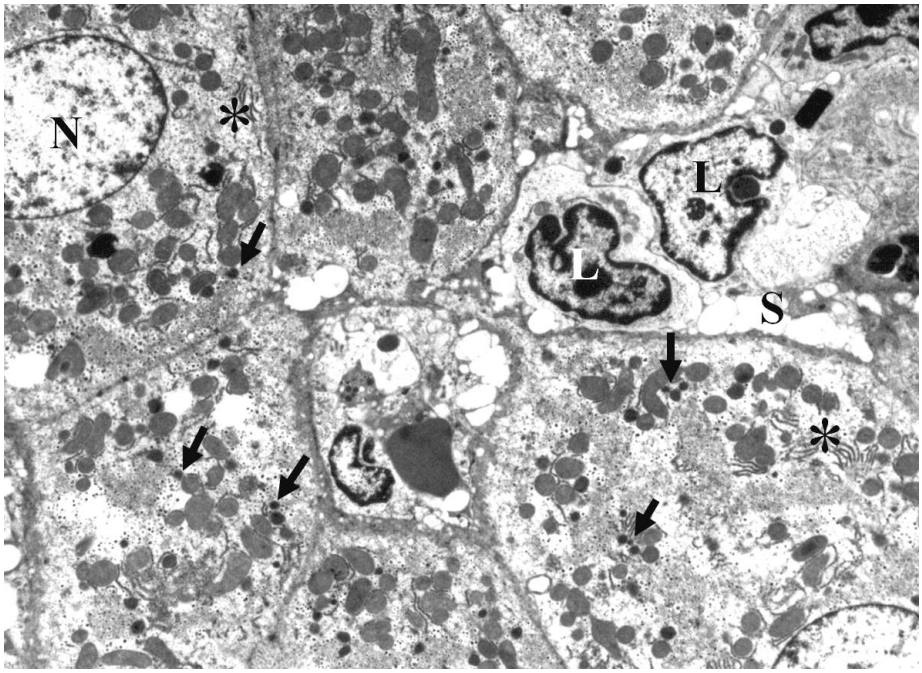


Figure 2 Ultrastructure of liver on day 3 of the experiment. N - nucleus; S, sinusoid; L - lymphocyte; asterisk - rough endoplasmic reticulum, arrow - peroxisomes
Magn. 4 612 x

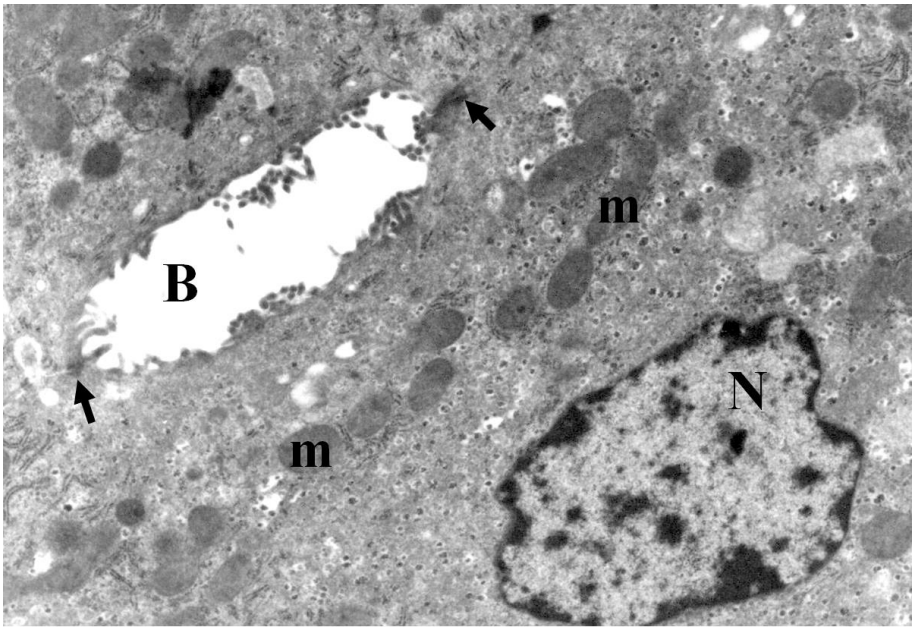


Figure 3 Ultrastructure of liver on day 3 of the experiment. N - nucleus; B - bile canaliculus; m - mitochondrion; arrow - intercellular contacts
Magn. 6 517 x

DISCUSSION

The liver plays an important role in many essential functions of base metabolism. It is the principal organ of accumulation, biotransformation and excretion of contaminants, for example pesticides (Matos et al., 2007). The study of ultrastructure of the rabbit liver after administration of bendiocarb showed changes of different extent. The most pronounced changes involved bile capillaries. They were dilated and their microvilli were reduced. In many hepatocytes we observed considerably increased number of peroxisomes. The peroxisomes are highly dynamic organelles. Depending on cell type, the number of peroxisomes per cell as well as their shape may vary greatly (Singh, 1997). Certain chemicals are capable of increasing the size and number of peroxisomes, and are designated as peroxisome proliferators (PP). Peroxisome proliferators include hypolipidemic drugs, plasticizers and organic solvents used in chemical industry, pesticides and many toxic environmental pollutants. The liver is a target organ of many toxic compounds including PP and these chemicals regulate gene transcription through a receptor, PPARα, which is expressed in hepatocytes (Dansen et al., 2001). As the number of peroxisomes and their enzymatic equipment depend not only on the cell type but also on various other factors, one can assume that bendiocarbamate or some of its metabolites induced increase in their number in hepatocytes.

Also the inflammation that was observed in our previous experiments (Holovská et al., 2011), could induce changes in the function of peroxisomes. Inflammatory cytokines, such as TNF-alpha, suppress catalase and enzymes of β-oxidation of fatty acids (Beier et al., 1992, 1997). Changes in the activity of these enzymes in peroxisomes may explain both the disorders of metabolism of fats and increased production of reactive oxygen species (ROS) (Schnitzky, 1987). The metabolism of ROS is an important function because ROS are considered important mediators in a variety of cellular pathological processes. Alterations in the structure of peroxisomes that were observed following ischemia-reperfusion were reflected in a decrease in peroxisomal activities (e.g. catalase, beta-oxidation of lignoceric acid and others).

Investigations of the influence of bendiocarbamate on the activity of antioxidant enzymes in the rabbit showed no changes in the activity of catalase in experimental groups. On day three of the experiment, there were detected pronounced changes in the activity of glutathione peroxidase (GP_{H2O2}) and increased content of TBARS, an important indicator of oxidative stress (Sobeková et al., 2009).

CONCLUSION

Although bendiocarb does not accumulate in the body, it induced inflammatory changes in the liver of rabbits. They were observed under a light microscope, particularly on day 3 of the experiment. Inflammatory changes affected not only the portobiliary space but spread along the periphery of lobules. Electron microscopy confirmed changes in the ultrastructure of hepatocytes. Bendiocarb induced dilatation of bile capillaries and caused marked increase in the number of peroxisomes. The changes observed in our study were of moderate extent. Our observations allowed us to assume that due to its detoxication abilities the liver was capable of coping with the harmful effects of the investigated pesticide.

REFERENCES

ALMÁŠIOVÁ V.- HOLOVSKÁ K.- TARABOVÁ L.- CIGÁNKOVÁ V. 2012. Sledovanie štrukturálnych zmien na obličkách králikov po perorálnom podaní bendiokarbamátu. In *Zborník referátov. 15. Košický morfologický deň*. Cievny systém z hľadiska anatómie a histológie., p. 86-89.

BEIER K.- VOLKL A.- FAHIMI H. D. 1992. Suppression of peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes by TNF-alpha. In *FEBS Lett*. 310, p. 273-276.

BEIER K.- VOLKL A.- FAHIMI H. D. 1997. TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferarot activated receptor-alpha and mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. In *FEBS Lett*., 412, p. 385-387.

Bendiocarb, C. O. Pesticide residues in food: 1982 evaluations, file: //E: \Lymfatic\legath\carbamates\bendiocarb.htm

DANSEN T. B.- WIRTZ K. W. A. 2001. The peroxisome in Oxidative Stress. In *Life*, 51, p. 223-230.

FLEŠÁROVÁ S.- LUKÁČ N.- DANKO J.- MASSANYI P.2007. Bendiocarbamate induced structural alterations in rabbit thymus after experimental peroral administration. In *Journal of Environmental Science and Health*., vol. 42, no. 3, p. 29-334.

HOLOVSKÁ K.- ALMÁŠIOVÁ V.- TARABOVÁ L.- CIGÁNKOVÁ V. 2007. Effect of xenobiotics on the structure of rabbits liver. In *Folia Veterinaria*, 55, p. 69-72.

MATOS P.- FONTAINHAS-FERNANDES A.- PEIXOTO F.- CARROLA J.- ROCHA E.2007. Biochemical and histological hepatic changes of nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbyl. In *Pesticide Bioche. Physiol.*, 89, p. 73-80.

MOJŽIŠOVÁ J. 2004. The changes of the immunological and haematological parameters in rabbits after bendiocarbamate application In *Proc. Agrochem. Morphogen*., UVM, Košice, p. 37.

PETROVOVÁ E.- MAŽENSKÝ D.- VDOVIAKOVÁ K.- LUPTÁKOVÁ L. 2010. Changes in the structure of rabbit lymph nodes after bendiocarb administration. In *Martinský morfologický zborník*, p. 76-78.

SCHNITZKY M. 1987. Patterns of lipid changes in membranes of the aged brain. In *Gerontology*, 33, p. 149-154.

SCHRADER M.- FATIMI H. D. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. In *Biochimica Biophysica Acta*, p. 1755-1766.

SINGH I. 1997. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. In *Mol. Cell. Biochem.*, 167, p. 1-29.

SOBEKOVÁ A.- HOLOVSKÁ K.- LENÁRTOVÁ V.- FLEŠÁROVÁ S.- JAVORSKÝ P. 2009. The other toxic effect of carbamate insecticides. In *Acta Biologica Hungarica*,60, p. 45-54.

ŠPALEKOVÁ E.- MASSANYI P.- HOLOVSKÁ K.- ALMÁŠIOVÁ V.- PETROVOVÁ E.- DANKO J. 2010. Analýza lymfatickej uzliny králika po experimentálnom podaní bendiokarbamátu. In *X. Risk factor of food chain.* Nitra: Slovak Agricultural University, p. 313-318.

Attempt to Reduce Salmonella Contamination in a Commercial Turkey Flock with Feed Additive Premixes

Janan J.[1, 2], Hutás I.[2], Treuer Á.[2], Csépányi B.[2], Páli J.[2]*

[1]Department of Animal Physiology and Health, Szent István University, Páter K. u. 1, H-2100 Gödöllő, Hungary
[2]Pharmatéka Bt., Cinkotai út 91/C., H-1148 Budapest, Hungary
* Janbaz.Janan@mkk.szie.hu

Summary

A water-soluble probiotic preparation with vitamin feed additive premix (Bactovit P) and a feed additive premix containing volatile oils (Turkey premix 10'), effective in vitro against *Salmonella*, were tested for reducing or preventing *Salmonella* contamination during the growing period of turkey production. Twenty thousand day-old turkey poults (sex ratio of 1: 1) being free from *Salmonella* were randomly assigned to a control (untreated) group and a treated group that received 1 kg Turkey Premix 10' per ton ration for 42 days plus 0.15 g Bactovit P per kg BW in the drinking water on arrival and then at seven-day intervals. Composite faecal samples were taken from both groups per sex at weekly intervals and the population of *Salmonella* spp. enumerated using the Most Probable Number (MPN) method. The flock management data (number of animals, body weights, mortality and medications) were recorded by the farm. The feed additive premixes delayed initially the development of *Salmonella* infection of poults and reduced its level compared to the controls' till week 4 to 5 in females and males, respectively. Thenceforward this effect discontinued. Of l4 faecal samples from the control and treated group each, 14 vs. 10 samples were *Salmonella* positive. The most frequent serovars was *S. Bredney.* The mortality rate was lower for the treated turkeys compared to the controls'. No appreciable improving or worsening was found between the control and experimental groups in the growth rate.

Additional improvement of the products and their application seems reasonable to increase the persistency of their effect through the entire 6-week growing period.

Introduction

Salmonellosis is one of the most important food-born diseases and causes substantial medical and economical burdens worldwide. The main food sources of infections by *Salmonella* are poultry meat and eggs. Thus, a number of actions have been taken to reduce the prevalence of *Salmonella* serovars with public health significance in food-producing animals. Since 2003, all members of the European Union have to put into practice monitoring programs to control these pathogens (European Parliament and European Council, 2003).

Salmonellae are carried within the gut of the birds and contaminate the environment by shedding from infected birds through the faeces, feather dust and eye secretions. In the past, antibiotics seemed an effective way of preventing *Salmonella* contamination. Antibiotic growth promoters have improved the performance and health status of poultry via their action on the intestinal micro-flora. However the ban on animal feed antibiotics in 2005 has led to a demand for alternatives to antibiotics. Possible non-therapeutic alternatives to antibiotics for poultry may be the ones which work via similar mechanisms, promoting growth while enhancing the efficacy of feed conversion Hughes P. and Heritage J. (2003). Such as are organic acids – exerting antimicrobial action through bowel pH depression; enzymes – improving ileac digestibility thereby indirectly overloading the mikroflora; probiotics – improving health and growth by altering intestinal microbial balance; prebiotics – selectively stimulating the growth or metabolic activity of a limited number of intestinal mikroflora; herbs & ether oils – antimicrobial agents by stimulating the endogenous digestive enzymes and immunostimulants – improving the immune system of the bird and enhancing the

resistance to disease (Reddy, 2004). The other method of Salmonella control is litter amendment with inorganic acidifiers.
The purpose of this study was to evaluate the efficacy of two candidate feed additives for reducing *Salmonella* contamination in a turkey flock being free of Salmonella at the early age.

Materials and Methods

Feed additives tested
Bactovit P (Pharmatéka Bt.): It is a water soluble probiotic (Lactic acid bacteria) preparation with vitamin feed additive premix. The application of the probiotic relives stress, enhances the immune system and inhibits the proliferation of harmful bacteria. It is used for preventive purposes.
Dosage: 0.15 g per kg BW, dissolved in daily amount and given drinking water, once a week.
Turkey Premix No.10 (Pharmatéka Bt.): It is a feed additive premix containing a mixture of volatile oils (Origanum vulgare, Thyme oil and Castanea sativa mill). Technological additive: Emulsion (E484), Carbovet. Dosage: mixed in the feed at a rate of 1 kg per ton feed (i.e. in a concentration of 0.1%)

Experimental design
The feeding trial was conducted in a partner farm of Pharmatéka Bt. in 2012. Twenty thousand day-old turkey poults (sex ratio = 1:1) were randomly assigned to a control (untreated) group and a treated group and housed separately in two henneries partitioned into two for isolating the sexes. The bedding material was fresh straw spread daily over the deep litter. Poults received the same turkey starter feed and drinking water *ad libitum*. The experimental group received 1 kg Turkey Premix No.10 per ton feed for 42 days plus 0.15 g Bactovit P per kg BW in the drinking water on arrival and then at seven-day intervals.

Samplings and data collection
Fresh faecal samples were collected across the entire hennery at weekly intervals, placed in 200 ml sterile plastic cups and covered. Two-two cups of composite faecal samples were prepared by treatment and sex, totalling 7 cups on each occasion. The faecal samples were examined for *Salmonella* prevalence in an accredited Laboratory.
Flock management data (number of animals, body weights, mortality and medications) were recorded by the farm.

Results and discussion

Faecal samples from control poults were positive for *Salmonella* already at the of the first week, whilst the samples from treated poults became positive by the end of the first (females) to third week (males), but the level of infections was just above the minimum detectable level and it remained low by the end till week 4 to 5 in females and males, respectively, compared to the controls. However this between-group difference disappeared by the end of the sixth week. All the 14 faecal samples collected from the control group were positive for *Salmonella* spp.; while of 14 faecal samples from the treated group four (28.6%) were negative and ten (71.4%) were positive (Table 1). The most frequent serovars were *S. Bredney*, and in one or two samples *S. Tenesse* and *S. Newport.*

Table 1.

MPN and prevalence of *Salmonella* species in faecal samples collected from treated and control groups

Sampling (Date)	Sample	Salmonella			
		Present/absent	Serotype	MPN cell/g	Serotype
Week 1 (08.05)	Control male	Positive	S. Bredney*	<3.0	
	Treated male	Negative		<3.0	
	Control female	Positive	S. Bredney	200.0	S. Newport
	Treated female	Negative		<3.0	
Week 2 (15.05)	Control male	Positive	S.O:4(B) serogroup	90.0	S. Bredney
	Treated male	Negative		<3.0	
	Control female	Positive	S. Bredney	<3.0	
	Treated female	Positive	S. Bredney	<3.0	
Week 3 (22.05)	Control male	Positive	S. Bredney	200.0	S. Bredney
	Treated male	Negative		<3.0	
	Control female	Positive	S. Bredney	21.0	S. Bredney
	Treated female	Positive	S. Bredney	<3.0	
Week 45 (29.05)	Control male	Positive	S. Bredney	4.0	S. Bredney
	Treated male	Positive	S. Bredney	<3.0	
	Control female	Positive	S.O:4(B) serogroup	40.0	S.O:4(B) serogroup
	Treated female	Positive	S. Bredney	<3.0	
Week 5 (05.06)	Control male	Positive	S. Bredney	1 100.0	S. Newport
	Treated male	Positive	S. Newport	<3.0	
	Control female	Positive	S.O:4(B) serogroup	>11000	S.O:4(B) serogroup H1,7 mono-phase
	Treated female	Positive	S.O:4(B) serogroup	>11000	S.O:4(B) serogroup H1,7 mono-phase
Week 6 (12.06)	Control male	Positive	S. Bredney	1 100.0	S. Newport
	Treated male	Positive	S.O:4(B) serogroup	1 100.0	S. Bredney
	Control female	Positive	S. Tenesse	200.0	S. Tenesse
	Treated female	Positive	S. Bredney	90.0	S. Bredney

The mortality rate for treated male and female poults was lower compared to the controls' (Figs. 1-3).

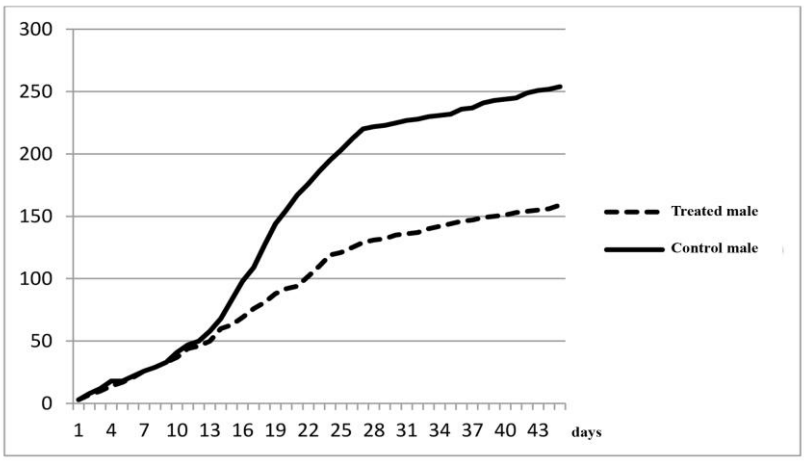


Fig.1.

Mortality rate for males in the treated and control groups

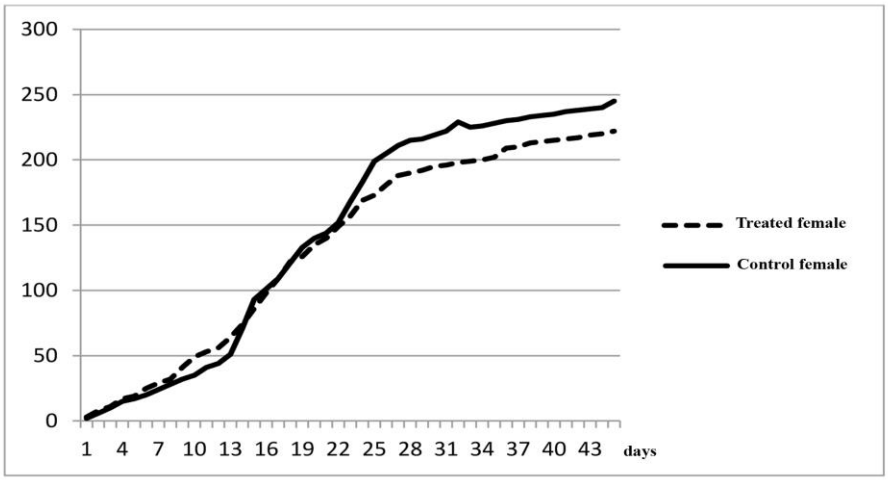


Fig. 2.

Mortality rate for females in the treated and control groups

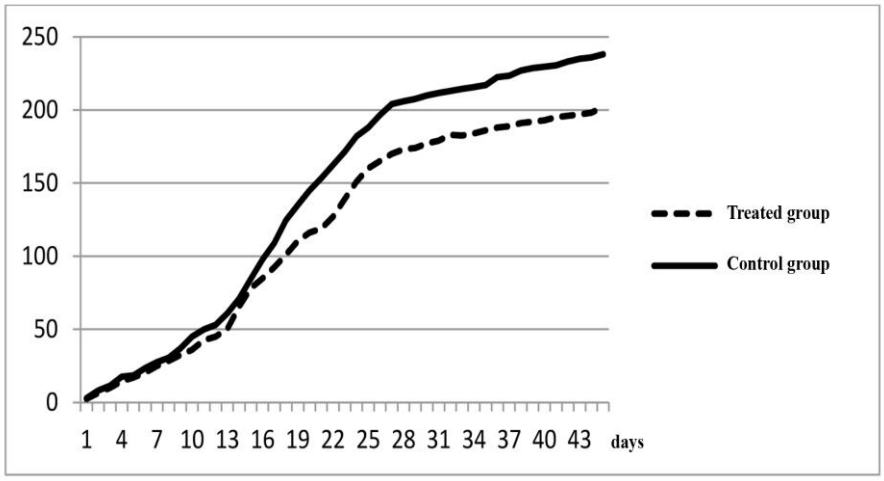


Fig. 3.

Average of mortality rates for the treated and control groups

The growth rate of poults was unaffected by the feed additives, the body weight curves for the control and Treated groups differed little (Figs. 4-6).

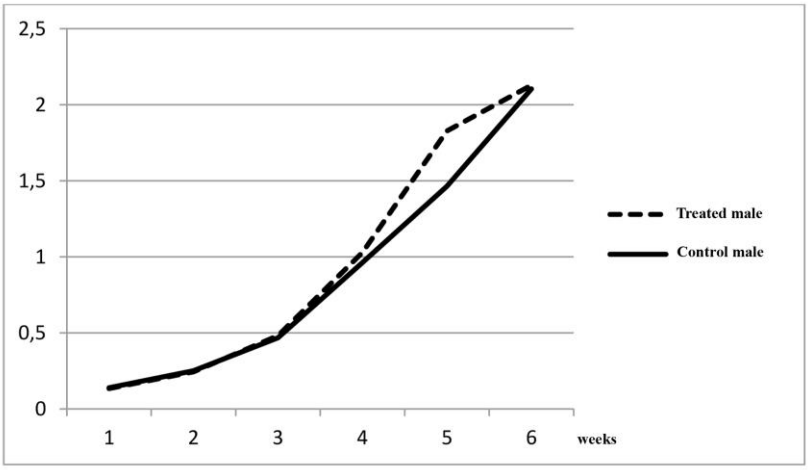


Fig. 4.

Body weight curves for males in the treated and control groups

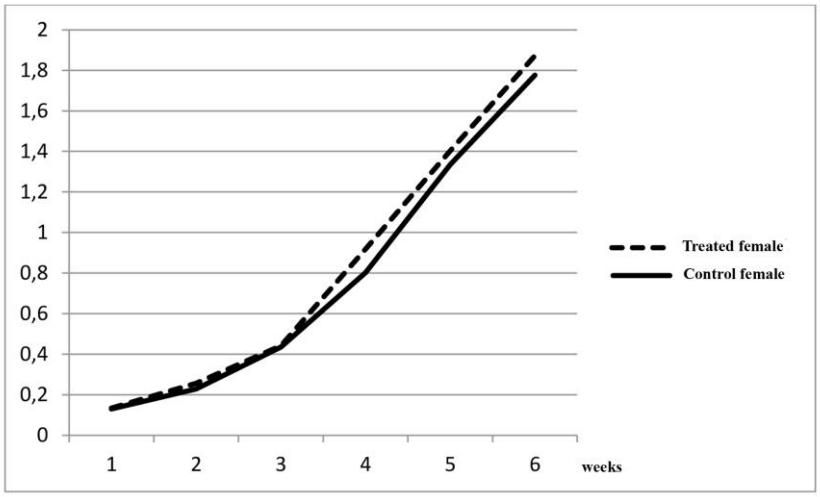


Fig. 5.

Body weight curves for females in the treated and control groups

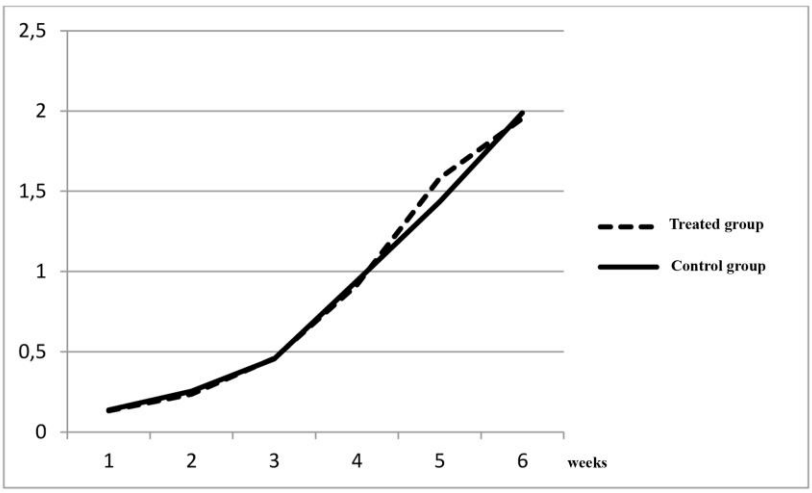


Fig. 6.

Average body weight curves for the treated and control groups

Conclusion

Many candidate feed additives have been described in literature but there is still much uncertainty about their effect *in vivo*, about the persistency of their effect, and the potential interaction between different additives (Wageningen UR, 2012). This is true for our experiment presented here. In light of the results, the dietary inclusion of the two feed additive premixes appears a promising approach to reduce *Salmonella* contamination in turkey poults. However, additional improvement of the products and their application is desirable to increase the persistency of their effect through the entire growing period.

References

European Parliament and European Council (2003): Directive of the European Parliament and of the Council pf 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC.

Hughes P. and Heritage J. (2003): Antibiotic Growth-Promoters in Food Animals. *http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/555_EN.HTM*

Reddy, V. R. (2004): The role of acidifiers in poultry nutrition. Avitech Technical Bulletin, July 2004.

Wageningen University and Research Centre (2012): Law-emission animal feed bursting with energy. http*://www.wageningenur.nl/en/show/Lowemission-animal-feed-burs...*

Acknowledgements

This work was supported in part by Research Centre of Excellence-17586-4/2013/TUDPOL and GOP-1.1.1-09/1-2009-0097 grants

MICROFLORA OF RABBITS AFTER QUERCETIN AND T - 2 TOXIN APPLICATIONS

Miroslava Kačániová[1], Marcela Capcarová[2], Jana Petrová[1], Peter Haščík[3], Lukáš Hleba[1]*

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic
[2]Deartment of animal physiology, Faculty of biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic
[3]Department of Animal Products Evaluation and Processing, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic
*E-mail: miroslava.kacaniova@gmail.com

Abstract
The aim of this study was to compare the microbial species in gut microflora of rabbit in control group against experimental group were it was applied qertecin and T2 toxin. It is first study about caecum microflora study after qertecin and T2 toxin application. In this study for enumeration of bacteria were using classical method. Enterococci were counted on Slanetz-Bartley agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 48-72 hours, lactobacilli were counted on MRS Lactobacillus agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 48-72 hours and coliforms bacteria were counted on MacConkey agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 24-48 hours. In our study the number of coliforms bacteria ranged between 4.23 to 5.50 log CFU.g^{-1}, lactobacilli ranged between 3.20 to 4.54 log CFU.g^{-1} and enterococci ranged between 3.28 to 5.23 log CFU.g^{-1}.
Keywords: microflora, rabbits, quertecin, T2 toxin

Introduction

Rabbits are monogastric herbivores, which are widely used for research purposes and husbandry. In rabbits, most food transformation events occur in the caecum, which is densely populated with bacteria and constitute an efficient continuous culture system. Rabbits help to maintain a relatively stable microbial population by caecotrophy. Notwithstanding this, relatively little attention has been paid to the microbial populations of the rabbit gut. Most studies have focused on the anaerobic microbiota of the caecum (*Crociani et al. 1984; Forsythe and Parker, 1985*) and intestinal athogens (*Lelkes and Chang, 1987; Straw, 1988; Milon, 1996*). These studies have revealed that the intestinal microbiota of rabbits consists predominantly of strictly anaerobic, Gram-negative bacteria belonging to the genus Bacteroides, while anaerobic sporulated Gram-positive bacteria are present in significantly lower numbers (*Forsythe and Parker, 1985; Zomborszky-Kovacs et al. 2000*). Facultative anaerobic bacteria isolated from the intestinal tract of rabbits belong to the Gram-positive genera *Bacillus*, *Enterococcus* and *Staphylococcus*, and Gram-negative *Enterobacter* and *Escherichia* (*Forsythe and Parker, 1985; Canganella et al., 1992*). In contrast with other mammals, lactobacilli are very rarely found (*Yu and Tsen, 1993*).

Probiotics along with other functional foods positively affect the health of the consumer (*Horská, 2012*). Flavonoids have high antioxidant activities as free radical scavengers and as inhibitors of enzymes generating reactive oxygen species (*Hollman and Katan, 1999*). Flavonoids may preserve β-cell function by reducing oxidative stress-induced tissue damage and therefore protect against the progression of insulin resistance to type 2 diabetes. In fact, quercetin, the main dietary flavonol, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell damage in rat pancreas (*Coskun et al., 2005*) and decreased blood glucose concentration in both alloxan- and streptozotocin-induced diabetic rats (*Coskun et al., 2005; Romero et al., 2010*). Moreover, the intake of some specific types of flavonoids, including quercetin, was inversely associated with a higher risk of incident type 2 diabetes (*Knekt et al., 2002*). Mycotoxins represent one of the most important categories of biologically produced natural toxins relative to human health and economic impact worldwide (*Cetin and Bullerman, 2005; McKean et al., 2006*). T-2 is a genotoxic and cytotoxic mycotoxin, which produce inhibition of protein synthesis by strong afinity for the 60S ribosomal unit

and inhibition of RNA and DNA synthesis. Moreover, it can induce mutation and apoptosis. All these effects were observed both *in vivo* and *in vitro* (*Bouaziz et al., 2008; Chaudhari et al., 2009*).

The purpose of this study was to compare the microbial species in gut microflora of rabbit in control group against experimental group were it was applied qertecin and T2 toxin. It is first study about caecum microflora study after qertecin and T2 toxin application. In this study for enumeration of bacteria were using classical method.

Material and methods

Animals and diet, blood collection and determination of the parameters

Animals and diet

Adult female rabbits (n = 20) and male rabbits (n = 20) of meat line M91, maternal albinotic line (crossbreed Newzealand white, Buskat rabbit, French silver) and paternal acromalictic line (crossbreed Nitra's rabbit, Californian rabbit, Big light silver) were used in experiment. Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Water was available at any time from automatic drinking troughs. Groups of adult animals were balanced for age (150 days) and body weight (4 ± 0.5 kg) at the beginning of the experiment. Adult rabbits were fed diet of a 12.35 $MJ.kg^{-1}$ of metabolizable diet (tab. 1) composed of a pelleted concentrate.

Table 1.

Chemical composition ($g.kg^{-1}$) of the experimental diet

Component	
Dry matter	926.26
Crude protein	192.06
Fat	36.08
Fibre	135.79
Non-nitrogen compounds	483.56
Ash	78.78
Organic matter	847.49
Calcium	9.73
Phosphorus	6.84
Magnesium	2.77
Sodium	1.81
Potassium	10.94
Metabolizable energy	12.35 $MJ.kg^{-1}$

Animals were divided into two control groups (C1 and C2) and experimental groups (E1 – E6). Experimental groups received quercetin (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) in injectable form (intramuscularly) at 10 $\mu g.kg^{-1}$ in E1 and E2 group, 100 $\mu g.kg^{-1}$ in E3 and E4 group and 1000 $\mu g.kg^{-1}$ $mg.kg^{-1}$ in E5 and E6 group without T-2 toxin for 90 days. T-2 toxin (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria) to C2, E2, E4 and E6 group at dose 0.08 mg per kg of body weight 72 hours before slaughter intramuscularly was applied.Control groups received injection water (Imuna Pharm a.s. Šarišské Michaľany, Slovak Republic).

In this animal study, institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed, and all experimental procedures involving animals were approved by the State Veterinary and Food Institute of Slovak Republic, no. 3398/11-221/3.

Table 2.

Application of quercetin and T-2 toxin in rabbit blood *in vivo*

Group	Quercetin (μg.kg^{-1})	T-2 toxin (mg.kg^{-1} of body weight, 72 hours before slaughter)
C1	0	0.00
C2	0	0.08
E1	10	0.00
E2	10	0.08
E3	100	0.00
E4	100	0.08
E5	1000	0.00
E6	1000	0.08

C – control group, E1 – E6 – experimental groups with various doses of quercetin alone or in combination with T-2 toxin

Plate diluting method

Determination of CFU counts: Plate diluting method was applied for quantitative CFU counts determination of respective groups of microorganisms in 1 g of substrate. Gelatinous nutritive substrate in Petri dishes was inoculated with 1 mL of chyme samples pour plate method in three replications. Homogenized samples of faecal chyme (chyme was taken to sterile Petri dishes) were prepared in advance by sequential diluting based on decimal dilution system application. Enterococci were counted on Slanetz-Bartley agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 48-72 hours, lactobacilli were counted on MRS Lactobacillus agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 48-72 hours and coliforms bacteria were counted on MacConkey agar (Biolife, Italy) and incubated at 37 °C for 24-48 hours. Isolated species, genera and groups of microorganisms and their fundamental identification were performed as per standard norms (*Holt et al., 1994*).

Results and discussion

The digestive system of animals hosts several hundred species of bacteria. These bacteria (microbial flora or microflora) in the gastrointestinal tract form a complex ecosystem that plays an important role in maintaining the integrity of the host's enterocyte, providing enzymes for metabolism of ingested of foods, modulation of metabolic processes for host needs (such as converting steroids and unconjugating bilirubin into more water soluble forms of urobilinogen), and protecting the host epithelial cells from colonization by toxin-producing or invasive intestinal pathogens. The intestinal microflora also provide certain nutrients and vitamins that are beneficial to the host. The relationship between the non-harmful microbiota and the host is often viewed as symbiotic; therefore, the organisms in the gastrointestinal tract are commensals under normal conditions. A complete understanding of the balance and composition of the gut microflora in the host animal species remains incomplete (*Fortun-Lamothe and Boullier, 2007*).

While lactobacilli, coliforms and streptococci constitute the main components of the intestinal microflora in the majority of farm animals, in the rabbit these bacteria can be found in traces only. In the first week of life their number is usually between 10^2 and 10^8, but subsequently they "disappear" and their count falls below 100. In the present experiment, the free nursing method (Group A) resulted in higher lactobacillus counts throughout and also higher coliform counts in the first four days of life. In Group C, a major rise was found in the coliform count by day 6, and on day 10 the coliform count was still higher than in the other two groups. This was presumably due to the slower establishment of the main microflora (i.e. the slower rate of colonisation of the caecum by *Bacteroides*). Although it could be established that the *Lactobacillus* and coliform counts were in inverse ratio to the *Bacteroides*
count, a clear antagonism between the normal bacterial components of the microflora could still not be demonstrated (*Kovacs et al., 2004*).

In our study the number of coliforms bacteria ranged between 4.23 to 5.50 log CFU.g^{-1}. The higher number of coliforms bacteria was found in control group without any application. The lower number of coliforms bacteria was found in experimental group with 1000 µg.kg^{-1} of querticin without T2 toxin application.

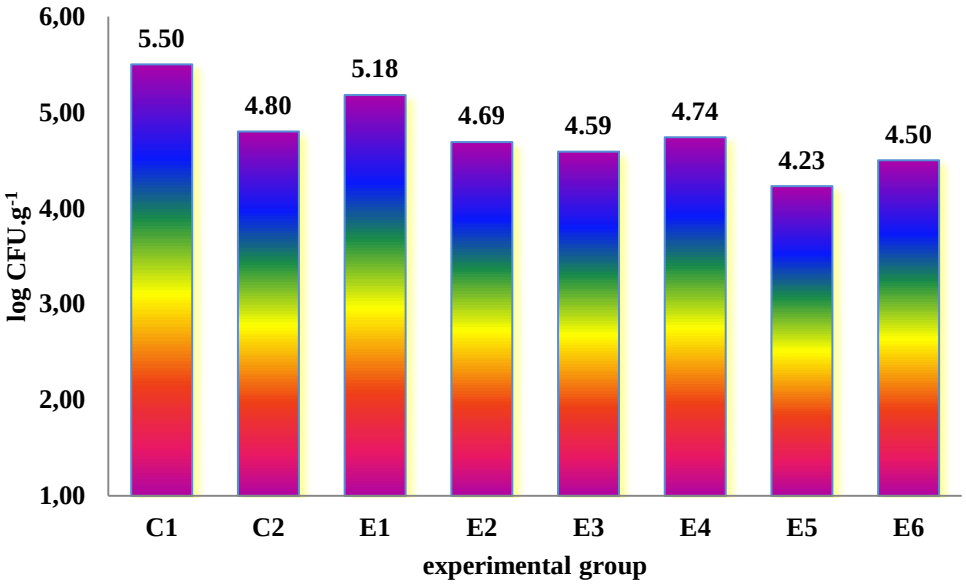


Figure 1:

The number of coliforms bacteria in caecum of rabbits

In our study the number of lactobacilli ranged between 3.20 to 4.54 log CFU.g^{-1}. The higher number of lactobacilli was found in experimental group with 100 application µg.kg^{-1} of quertecin without T2 toxin application. The lower number of lactobacilli was found in control group without quertecin with 0.08 mg.kg^{-1} T2 toxin application.

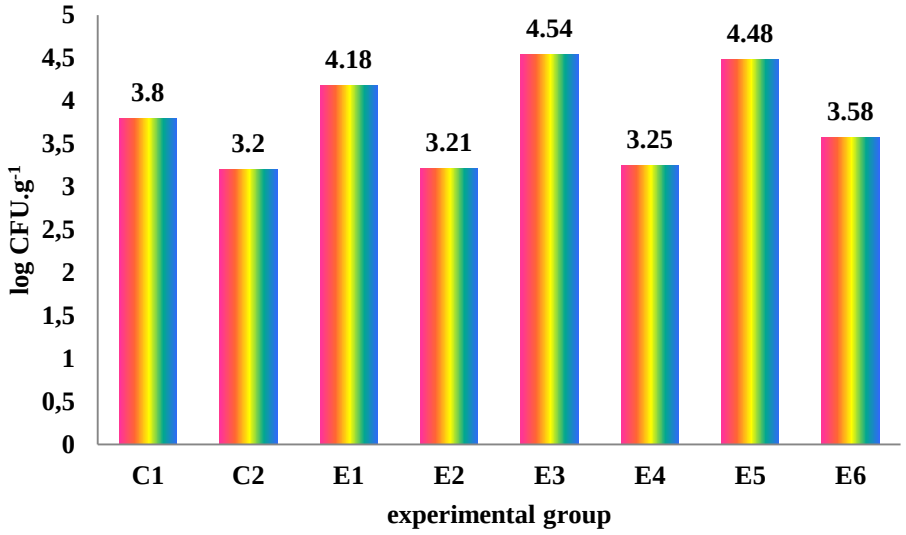


Figure 2:

The number of lactobacilli in caecum of rabbits

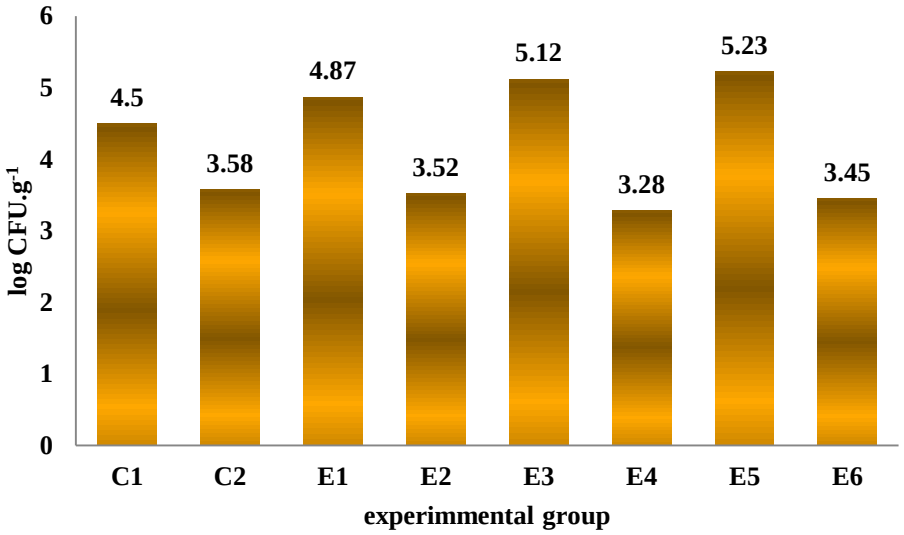


Figure 3:

The number of enterococci in caecum of rabbits

In our study the number of enterococci ranged between 3.28 to 5.23 log CFU.g^{-1}. The higher number of enterococci was found in experimental group with 100 application µg.kg^{-1} of quertecin with 0.08 mg.kg^{-1} T2 toxin application. The lower number of enterococci was found in control group with 1000 quertecin µg.kg^{-1} without toxin application.

The flora of the rabbit gastrointestinal tract varies with age, diet, and antibiotic use. The suckling rabbit maintains a relatively sterile stomach by the presence of a substrate in the doe's milk and an enzyme in the suckling rabbit's stomach. The predominant microflora in the lower gastrointestinal tract of young rabbits is streptococci and enterobacteria, whereas the predominant inhabitant of the adult rabbit small intestine, cecum, and colon is *Bacteroides.* The low gastric pH (1 to 1.9) of the adult maintains a relatively sterile stomach in this age group as well (*Funn, 2001*).

The adult rabbit GI tract is inhabited predominantly by the nonsporulated gram-negative bacilli *Bacteroides* (strict anaerobe) in the small intestine, caecum, and colon. A smaller number of sporulated anaerobes *(Endosporus* before weaning and *Acuformis* after weaning) can also be found in tile cecum and colon. Previous studies on *Lactobacillus* rarely identified this organism in any part of the rabbit's GI tract, regardless of age. A recent study, however, found *Lactobacillus confusus* in rabbit fecal samples (*Funn, 2001*).

Conclusion

The supply of rabbits with qertecin and T2 toxin and their access to the doe’s faeces have been shown to affect the development of the caecal microflora.

Acknowledgement

The Paper was supported by the project: Development of International Cooperation for the Purpose of the Transfer and Implementation of Research and Development in Educational Programs conducted by the Operational Program: Education, ITMS code: 26220220525, by grant of KEGA 013SPU-4/2012 and VEGA 1/0129/13.

References

Bouaziz, C., Sharaf el dein, O., El Golli, E., Abid-Essefi, A., Brenner, C., Lemaire, C., Bacha, H., 2008. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. Toxicol. 254:19–28.

Canganella, F., Zirletta, G., Gualterio, L., Massa, S. and Trovatelli, L.D. (1992). Anaerobic

facultative bacteria isolated from the gut of rabbits fed different diets. Zentralblatt fur Mikrobiologie 147:537–540.

Cetin, Y., Bullerman, L.B., 2005. Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. Food Chem. Toxicol. 43:755–764.

Chaudhari, M., Jayaraj, R., Bhaskar, A.S.B., Lakshmana Rao, P.V., 2009. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancercells. Toxicol. 262:153–161.

Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacol. Res. 51:117–123.

Crociani, F., Biavati, B., Castagnoli, P., Matteuzzi, D. (1984). Anaerobic ureolytic bacteria from cecal content, soft faeces of rabbit. J. Appl. Bacter. 57:83–88.

Forsythe, S.J., Parker, D.S. (1985). Nitrogen metabolism by the microbial flora of rabbit cecum. J. Appl. Bacter. 58:363–369.

Fortun-Lamothe, F., Boullier, S. (2007). A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. Livestock Sci. 107:1–18.

Holt, G. J., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins; 787.

Horská, E. (2012). New Consumerism and Trends at the Food Market: within and Beyond Visegrad Borders. In Horská, E. Food Sciences & Business Studies. Nitra : SPU, 2012, 410 p. ISBN 978-80-552-0815-2.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am. J. Clin. Nutr. 76:560–568.

Lelkes, L.. Chang, Ch.L. (1987) Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy. Lab. Anim. Sci. 37, 757–764.

Milon, A. (1996). Weaned rabbit colibacillosis: a model for study of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). In Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, vol. 3. pp. 13–22. Toulouse, France.

Romero,M., Jiménez, R., Hurtado,B ., Moreno, J.M., Rodríguez-Gómez, I., López-Sepúlveda, R., Zarzuelo, A., Pérez-Vizcaino, F., Tamargo, J., Vargas, F., Duarte, J. (2010). Lack of eneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. Europ. J. Pharmacol. 627: 242–250.

Straw, T.E. (1988). Bacteria of rabbit gut and their role in the health of the rabbit. J. Appl. Rabbit Res. 11:145–150.

Yu, B., Tsen, H.Y. (1993) Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. J. Appl. Bacter. 75:269–275.

Zomborszky-Kovacs, M., Gyarmati, T., Parizs, T., Szendro, Z.S., Kametler, L., Toth, A. (2000) Some physiological properties of the digestive tract in traditionally reared and exclusively milk-fed young rabbits. In 7th World Rabbit Congress, Nutrition and digestive physiology short papers. Valencia, Spain.

THE EFFECT OF RESVERATROL ON PORCINE OVARIAN GRANULOSA CELL FUNCTIONS

Attila Kádasi[*1], Adriana Kolesárová[1], Nora Maruniaková[1], Roland Grossmann[3], Richard Alexa[4], Aneta Štochmaľová[4], Alexander V. Sirotkin[2]*

[1] Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Department of Animal Physiology Tr. A. Hlinku2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; [2] Institute for Genetics and Reproduction of Farm Animals, Animal Production Research Centre Nitra, Lužianky, Slovak Republic;
[3]Department of Functional Genomics and Bioregulation, Institute of Animal Science, Mariensee, 31535 Neustadt, Germany;
[4]Constantine the Philosopher University in Nitra, Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology and Anthropology,
*: attila.kadasi@gmail.com

Abstract

The aim of our study was to elucidate the role of resveratrol in control of ovarian functions. For this purpose, we have examined its effect (at the doses 0, 1, 10, 100 μg/ml) on proliferation, apoptosis and steroidogenesis in porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. Accumulation of PCNA (marker of proliferation), BAX (marker of apoptosis) and the release of steroid hormones (progesterone and testosterone) were analysed by immunocytochemistry and RIA respectively. It was observed, that resveratrol addition decreased the percentage of proliferative (PCNA-positive) and increased the percentage of apoptotic (BAX-positive) cells at all used doses (1, 10 and 100 μg/ml). On the other hand decreased progesterone release (at all doses of resveratrol) and stimulated testosterone release (at 10 and 100 μg/ml but not at 1 μg/ml of resveratrol) by porcine granulosa cells was detected. Our results suggest a direct effect of resveratrol on proliferation, apoptosis and steroidogenesis in porcine ovaries. Taken together, these data suggest that resveratrol can affect reproductive (ovarian) functions of pigs.

Keywords: resveratrol, proliferation, apoptosis, progesterone, testosterone, porcine granulosa cells

Introduction

Phytoalexins are antimicrobial substances under natural conditions not found in plants. Their creation occurs in plants attacked by pathogens (Dixon and Paiva, 1995). Resveratrol (RSV) was chemically 3,4',5-trihydroxystilbene and is one of the natural phytoalexins (Hain et al., 1990). It is a naturally occurring phytoestrogen and antioxidant that is found in grapevines, but also in soft fruits and hazelnut (Frémont, 2000). RSV is well known for its phytoestrogenic, antioxidant properties, growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities (Joe et al., 2002; Jiang et al., 2005; Baur and Sinclair, 2006). It is able to inhibit PI3K/Akt Protein Kinase/ mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway in various types of cells (Jiang et al., 2005; Shankar et al., 2007; Bai et al., 2010). RSV is favourable for biological processes in the body to protect against cardiovascular diseases. It also has anti-cancer properties because RSV inhibits proliferation and induces apoptosis in cells at different levels (Ferry-Dumazet et al, 2002, Haider et al, 2003).

Cell proliferation is the amount of cells in culture or in the body can be divided. The extent of DNA synthesis is marker for proliferation (Wyllie et al., 1998). Involving the protein to cell proliferation include PCNA (Tomanek and Chronowska, 2006). This protein is localized in the cell nucleus (Makarevich et al., 2000; Nahryzny and Lee, 2001) and located in granulosa cells of gilts (Sanislo et al. 2001).

Apoptosis is programmed death of cells. This process eliminates unnecessary and useless cells from the body (Wyllie et al., 1998). Apoptosis is supported by group of caspases, which include BAX

(Zwain and Amato, 2001). This protein is localized especially in mitochondria (Markström et al., 2002) and located in granulosa cells of gilts (Sanislo et al. 2001).

Progesterone (P4) is an ovarian steroid produced by ovarian granulosa cells (Kolesárová et al., 2010a; Kolesárová et al., 2010b; Medvedová et al., 2011) and *corpus luteum* (Gregoraszczuk, 1992; Gregoraszczuk, 1997) of pigs and contributes to regulation of ovarian follicular development and remodelling (Mahajan, 2008). It is a local paracrine or autocrine factor regulating luteal function (Gregoraszczuk, 1992; Gregoraszczuk, 1997). This progestin is essential for normal ovarian cycle of females (Hagan et al., 2009). Another hormone produced in ovary is testosterone (T) (Delort et al., 2009). T is steroid hormone as well as P4 are necessary as a precursor for the synthesis of estrogen (Mindnich et al., 2004).

The aim of our study was to research the effect of RSV treatment at doses 1, 10 and 100 µg/ml on accumulation of markers of proliferation (PCNA) and apoptosis (BAX) and secretory activity (steroid hormones of P4 and T) of porcine ovarian granulosa cells (GCs) *in vitro*.

Material and method

Preparation, culture and processing of granulosa cells from ovaries

Granulosa cells were collected from the ovaries of prepubertal Slovakian White gilts, after slaughter at a local abattoir. After aspiration and isolation of granulosa cells, these cells were then washed in sterile DMEM/F12 1:1 medium (BioWhittakerTM, Verviers, Belgium), resuspended in the same medium supplemented with 10% fetal calf serum (BioWhittakerTM) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a final concentration 10^6 cells/ml medium. Portions of the cell suspension were dispensed to 24-well culture plates (Nunc^{TM}, Roskilde, Denmark, 1 ml suspension/well; for RIA) or 16-well chamber slides (Nunc Inc., International, Naperville, USA, 200 µl/well, for immunocytochemistry). Both, the plate wells and chamber slides were incubated at 37 ° C and 5% CO_2 in humidified air until 60-75% confluent monolayer was formed (3-5 days), at which point the medium was renewed. Further culture was performed in 2 ml culture medium in 24-well plates (medium for RIA) or 200 µl/medium in 16-well chamber slides, (cells for immunocytochemistry) as described previously. After medium replacement experimental cells were cultured in the presence of RSV (Changsha Sunfull Bio-tech. Co, Hunan China) at concentrations of 0, 1, 10 and 100 µg/ml. RSV was dissolved in culture medium immediately before their addition to the cells. After two days in culture, the medium from the 24-well plates was gently aspirated and frozen at -24°C to await RIA. After removing the medium from chamber slides, cell were washed in ice-cold PBS (pH 7.5), fixed in paraformaldehyde (4% in PBS, pH 7.2-7.4; 60 min) and held at 4°C to await immunocytochemistry.

Immunocytochemical analysis

Following washing and fixation, the cells were incubated in the blocking solution (1% of goat serum in phosphate-buffered saline – PBS) at room temperature for 1 h to block nonspecific binding of antiserum. Afterwards, the cells were incubated in the presence of monoclonal antibodies against either PCNA (marker of proliferation) and BAX (marker of apoptosis) (all from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA; dilution 1:500 in PBS) for 2 h at room temperature at overnight at 4°C. For the detection of binding sites of primary antibody, the cells were incubated in secondary swine antibody against mouse IgG labelled with horse-radish peroxidase (Servac, Prague, Czech Republic, dilution 1:1000) for 1 h. Positive signals were visualized by stanning with DAB-substrate (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany). Following DAB-staining, the cells on chamber-slides were washed in PBS, covered with a drop of Glycergel mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark); then coverslip was attached to a microslide. Cellular presence and localization of PCNA and BAX positivity in cells was proved on the basis of DAB-peroxidase brown staining. A ratio of DAB-HRP-stained cells to the total cell number was calculated.

Immunoassay

Concentrations of P4 and T were determined in 25-100 µl samples of incubation medium by RIA. The concentrations of P4 and T were assayed using Radioimmunoassay (RIA) according to the manufacturer's instructions. All RIA were validated for use in samples of culture medium.

Statistical Analysis

Significant differences between the experiments were evaluated using Student´s T-test and one/two-way ANOVA followed by paired Wilcoxon-Mann Whitney test, Sigma Plot 11.0 software (Systat Software, GmbH, Erkhart, Germany). Differences from control at $P< 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

Proliferation and apoptosis (Immunocytochemistry)

The results of immunocytochemistry are showed in Tab.1. In our study all used doses of RSV significantly ($P<0.05$) decreased the percentage of cells containing PCNA. Wong et al. (2010) published diminished proliferative activity of interstitial theca cells after RSV addition at doses 30, 50, 70 and 100 µmol/ml. Antiproliferative activity of RSV in rat ovarian granulosa cells was confirmed by Ortega et al. (2012). A number of porcine granulosa cells containing BAX was improved by RSV treatment at doses 1, 10 and 100 µg/ml. Previous studies confirmed pro-apoptotic effect of RSV (at 30, 50, 70 and 100 µmol/ml) in theca cells (Wong et al., 2010) and rat ovarian granulosa cells (Ortega et al., 2012) via activation of apoptotic peptide caspase 3/7.

Tab.1.

The percentage of cells containing markers of proliferation (PCNA) and apoptosis (BAX) after RSV treatment (Imunocytochemistry)

Supplement	% of cells containing			
	PCNA		BAX	
RSV 0 µg/ml (control)	51.00±1.43	(1404)	49.88±1.72	(1980)
RSV 1 µg/ml	36.30±1.20*	(356)	67.50±1.04*	(453)
RSV 10 µg/ml	39.50±1.50*	(273)	67.00±3.34*	(472)
RSV 100 µg/ml	34.00±10.00*	(320)	66.50±2.02*	(441)

All the values represent % of cells containing particular antigen, means ± SEM, *- significant ($P<0.05$) differences with control (cells not treated with RSV). In the brackets is a number of counted cells.

Steoidogenesis (RIA)

Secretion of steroid hormones was detected by radioimmunoassay (Tab. 2). In our study doses 1, 10 and 100 µg/ml of RSV decreased the P4 secretion by porcine ovarian granulosa cells. We confirmed the findings of Basini et al. (2010), who published significant reduction of P4 secretion by porcine granulosa cells after treatment of polymethoxystilben 2 – analogue of RSV. On the other hand stimulatory effect of RSV on P4 release by porcine ovarian GCs was recorded after RSV treatment at the dose of 50 µg/ml, while doses of 30 and 10 µg/mL did not affect the release of the steroid hormone (Kolesarova et al., 2012). RSV in combination with mycotoxin – deoxynivalenol (DON) at the highest doses (50 µg/ml of RSV and 5000 ng/ml of DON) stimulated P4 release by GCs. In the case of secretion of T by porcine ovarian GCs stimulatory effect of RSV (at the doses 10 and 100 µg/ml but not at 1 µg/ml) was found in our study. Decreased P4 release by rat granulosa cells after resveratrol treatment was described in previous study (Ortega et al., 2012).

Tab.2.

The secretion of steroid hormones by porcine ovarian granulosa cells after RSV treatment (RIA)

Supplement	P4 secretion ng/10^6 cells/day	T secretion pg/10^6 cells/day
RSV 0 µg/ml (control)	78.10±5.75	420.70±54.90
RSV 1 µg/ml	52.00±2.26*	496.70±27.50
RSV 10 µg/ml	50.80±3.03*	777.00±15.00*
RSV 100 µg/ml	41.40±5.90*	1932.00±41.90*

All the values represent P4 or T release, means ± SEM, *- significant (P<0.05) differences with control (cells not treated with RSV).

Conclusion

The present study suggest a possible inhibitory effect of resveratrol on proliferation (PCNA), stimulatory influence on apoptosis (BAX), inhibitory effect on the release of progesterone and stimulatory impact on testosterone release by porcine ovarian GCs. Our results suggest a direct effect of resveratrol on proliferation, apoptosis and steroidogenesis in porcine ovaries. Taken together, these data suggest that resveratrol can affect reproductive (ovarian) functions of pigs.

Acknowledgments: We would like to thank Mrs. Katarína Tóthová and Ing. Žofia Kuklová (Animal Production Research Centre in Nitra – Lužianky), to Mrs. Iris Stelter (Institute of Animal Genetics, Neustadt, Germany), to Mr. Yani Deng (Changsha Sunfull Bio-tech. Co, Hunan China) for kind of providing of resveratrol. This work was financially supported by the the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic projects no. 1/0022/13, APVV no. 0137-10, 0854-11 and APVV-0304-12, and no. 740531-OPVaV-2011/2.2/07-SORO. This publication was written during realization of the project "ZDRAVIE“ no. 26220220176 supported by the Operational Programme Research and Development funded from the European Regional Development Fund.

References

Bai, Y. et al. (2010): Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder 588 cancer cells in vitro and inhibits tumor growth *in vivo*. Cancer Science, 101, 488-493.

Basini, G., Tringali, C., Baioni, L., Bussolati, S., Spatafora, C., Grasselli, F. (2010): Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. Mol Nutr Food Res., 54, 2, 236-43.

Baur, J.A., Sinclair, D.A. (2006): Therapeutic potencial of resveratrol: the *in vivo* evidence. Natrure reviews Drug Discovery, 5, 493-506.

Delort, L., Kwiatkowski, F., Chalabi, N., Satih, S., Bignon, Y-J., Bernard-Gallon, D. J. (2009): Central Adiposity as a Major Risk Factor of Ovarian Cancer. Anticancer research, 29, 5229-5234.

Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, 7, 1085-1097.

Ferry-Dumazet, H., Garnier, O., Mamani-Matsuda, M., Vercauteren, J., Belloc, F., Billiard, C., Dupouy, M., Thiolat, D., Kolb, J. P., Marit, G., Reiffers, J., Mossalayi, M. D. (2002): Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. Carcinogenesis, 23, 8, 1327-1333.

Frémont, L. (2000): Biological effects of resveratrol. Life Sciences, 66, 8, 663-673.

Gregoraszczuk, E. L. (1992): Interrelations between steroid hormone secretion and morphological changes of porcine corpora lutea at various periods of luteal phase. Endocrine Reg., 26, 189–194.

Gregoraszczuk, E.L. (1997): Progesterone, androgen and estradiol production by porcine luteal cell subpopulations: dependence on cell composition and periods of luteal phase. Endocrine Reg., 31, 41–46.

Hagan, R. C., Faivre, A. E., Lange, A. C. (2009): Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. Steroids, 74, 7, 568-572. ISSN 0039-128X.

Haider, U. G., Sorescu, D., Griendling, K. K., Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2003): Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. Molecular Pharmacology, 63, 4, 925-932.

Hain,R., Bieseler, B., Kindl, H., Schroder, G., Stocker, R. (1990): Expression of a stilbene synthase gene in Nicotiana tabacum results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Molecular Biology, 15, 325-335.

Jiang, H. et al. 2005. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. Molecular Cancer Therapy, 4, 554-561.

Joe, A. K. et al. (2002): Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. Clinical Cancer Research, 8, 893-903.

Kolesarova, A., Roychoudhury, S., Slivkova, J., Sirotkin, A., Capcarova, M., Massanyi, P. (2010a): In vitro study on the effect of lead and mercury on porcine ovarian granulosa cells. J. Environ. Sci. Health Pt. A, 45, 320–331.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Sirotkin, A., Medvedova, M., Kovacik, J. (2010b): Cobalt-induced changes the IGF-I and progesterone release, expression of proliferation- and apoptosis-related peptides in porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. J. Environ. Sci. Health Pt A, 42, 7, 810-817.

Kolesarova, A.; Capcarova, M.; Maruniakova, N.; Lukac, N.; Ciereszko, R. E.; Sirotkin, A.V. (2012): Resveratrol inhibits reproductive toxicity induced by deoxynivalenol. In J Environ Science and Health, part A, 2012, 47(9), 329-34.

Mahajan, D.K. (2008): Pig Model to study dynamics of steroids during ovarian follicular growth and maturation. Sourcebook of Models for Biomedical Research: Humana Press, 778 p, ISBN 978–1–58829–933–8.

Makarevich , A., Sirotkin, A., Chrenek, P., Bulla, J., Hetenyi, L. (2000): The role of IGF-I, c AMP-protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion, cyclidnucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 73, 123-133.

Markström, E., Svensson, E. Ch., Ruijin, S., Svanberg, B., Billig, H. (2002): Survival facators regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. Reproduction, 123, 23-30

Medvedova, M., Kolesarova, A., Capcarova, M., Labuda, R., Sirotkin, A. V., Kovacik, J., Bulla, J. (2011): The effect of deoxynivalenol on the secretion activity, proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. J. Environ. Sci. Health B, 46, 3, 213-219.

Mindnich, R., Moller, G. et al. (2004): The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 218, 1-2, 7-20.

Nahryzny, S. N., Lee, H. (2001): Protein profiles of the Chinese hamster ovary cells in the resting and proliferating stages. Electrophoresis, vol. 22, 9, 1764-1775.

Ortega, I., Wong, D. H., Villanueva, J. A., Cress, A. B., Sokalska, A., Stanley, S. D., Duleba, A. J. (2010): Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells. Fertil Steril., 98, 6, 1563-73.

Sanislo, P., Sirotkin, A. V., Budacova, A., Florkovicova, I., Schaeffer, H. J. (2001): Úloha thrombopoetínu a rozličných proteinkináz v regulácii proliferácie, apooptózy a steroidogenézy ovariálnych buniek ošípaných in vitro. Acta fytotechnica et zootechnica, vol. 4, 2, 31-34.

Shankar, S. et al. (2007): Molecular mechanisms and therapeutic potential. Frontiers in Bioscience, 12, 4839-4854.

Tomanek, M., Chronowska, E. (2006): Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclearantigen (PCNA) in the pig ovary. Folia Histochem. Cytobiol., 44, 269-274.

Wong, D. H., Villanueva, J. A., Cress, A. B., Duleba, A. J. (2010): Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. Molecular Human Reproduction, 16, 4, 251–259.

Wyllie, A. , Donahue, M. S. , Fischer, B. , Hill, D., Keesey, J., Manzow, S. (1998): Apoptosis and cell proliferation. Manheim: Boehringer, 1998, 1-5, 64-66

Zwain, I. H., Amato, P. (2001): cAMP-induced apoptosis in granulosa cells is associated with up-regulation of P53 and BAX down-regulation of closterin. Endocr Res., 27, 1-2, 233-249.

EFFECT OF 8-WEEK NICKEL AND ZINC CO-ADMINISTRATION ON CHOSEN HAEMATOLOGICAL PARAMETERS IN RABBITS.

Anna Kalafová[1], Jaroslav Kováčik[1], Marcela Capcarová[1], Peter Massányi[1], Adriana Kolesárová[1], Ľubica Chrastinová[2], Norbert Lukáč[1], Monika Schneidgenová[1], Jozef Čurlej[3], Vladimír Parkányi[2] , *Rastislav Jurčík[2], Ľubomír Ondruška[2]*

[1] Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology,
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic
[2]Animal Production Research Centre Nitra, Slovakia,
Hlohovecka 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic
[3]Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety,
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

Abstract
Changes in some blood parameters after 8-week administration of nickel (E1 17.5 g $NiCl_2$ per 100 kg of feed mixture) and nickel and zinc (E2 17.5 g $NiCl_2$+30 g $ZnCl_2$.100 kg^{-1} of feed mixture) in granular mixture were studied in female broiler rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) (5 rabbits/each group). Groups of rabbits without nickel and–zinc addition served as control (C). In whole blood selected haematological parameters as total white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV) were measured using haematological analyser Abacus junior VET (Diatron®, Vienna, Austria). Zinc supplementation in group E2 caused significant decrease ($P<0.05$) in lymphocytes number count (6.93±1.42 $10^9.l^{-1}$) in comparison with group E1 (11.08±3.24 $10^9.l^{-1}$) and control group (12.72±1.86 $10^9.l^{-1}$). The white blood cell is a possible site of interaction between the two elements. Of the others haematological parameters investigated in this study statistically insignificant changes ($P>0.05$) were observed.

Keywords: Nickel, zinc, haematological parameters, rabbits

ACKNOWLEDGMENTS:
This work was financially supported by the VEGA scientific grant 1/0790/11, VEGA scientific grant 1/0084/12, and APVV grant 0304-12.

Determination of hemoglobin content in whole blood and in dried blood spots in lambs

Annamária Kerti[1], Zsófia Márta Morlin[1,2], Ferenc Pajor[2], László Bárdos[1]

[1]Department of Animal Physiology and Health, Szent István University, Gödöllő, Hungary
[2]Institute of Animal Husbandry, Szent István University, Gödöllő, Hungary
* kerti.annamaria@mkk.szie.hu

Abstract
The use of filter paper for the collection and analysis of human blood has begun in the 1960s. In those days Dr. Robert Guthrie used dried blood spot (DBS) specimens to measure phenylalanine in newborns. DBS are whole blood samples collected from blood obtained by finger-sticks or heel pricks and placed onto filter paper, dried and eluted later for laboratory analyses.
The purpose of this study was to develop and evaluate a capillary filter paper method that could be employed as a reliable technique for hemoglobin (Hb) determination in animals.
Heparinised blood (10 ml) was taken from healthy lambs (n=20). DBS were prepared as venous whole blood samples were aliquoted (20 μL) onto Whatman 903 (Schleicher & Schuell GmbH Inc., Germany) filter paper. Either the entire DBS were cut from the paper card with scissors for extraction, or DBS punches were removed from each DBS by using a standard paper hole punch. The discs were placed into test tubes for elution in Drabkin reagent and the eluates were measured spectrophotometrically. Hb values obtained on filter paper were compared with values from fresh whole blood samples.
As our results indicate the standard punches gave identical results as the whole blood determinations under similar conditions (2.5 ml reagent and 20 min elution time). After 10 day storage period the elution required more time (40 or 60 min) for the same results.
The use of DBS offers certain advantage over using traditional methods and conventional samples. Not only in case of infants but also in animal investigations the DBS are a promising alternative to venipuncture.

Key words: dried blood spot, DBS, hemoglobin, lamb

Introduction
The use of filter paper for the collection and analysis of human blood has begun in the 1960s. In those days Dr. Robert Guthrie used dried blood spot (DBS) specimens to measure phenylalanine in newborns for the identification of inborn errors for the detection of phenylketonuria (Mei et al., 2001). Since that time additional possibilities of using DBS cards for inborn errors of metabolism in neonates are proceed. These include investigations of disorders of amino acid metabolism, fatty acid oxidation, organic acid metabolism, congenital hypothyroidism, and more recently cystic fibrosis (Lacher et al., 2013). Nowadays, thanks to the development of new techniques, the possible applications of DBS have greatly been widened (Snijdewind et al., 2012).
DBS are whole blood samples collected from blood obtained by finger-sticks or heel pricks and placed onto filter paper, dried and eluted later for laboratory analyses. The general procedure is that the well formed blood drop should be applied on the filter paper card to allow an appropriate quantity of blood to steep and entirely fill a pre-printed circle. Blood should consistently penetrate and soak through the filter paper to ensure reliable result. Due to the minimal invasiveness of sampling and small sample requirement collecting blood on DBS cards also offer the chance to obtain specimens from infants and young children in whom venipuncture is problematic to perform.

The purpose of this study was to develop and evaluate a capillary filter paper method that could be employed as a reliable technique for hemoglobin (Hb) determination. In this study the DBS samples were tested as an alternative method of Hb measurement in whole blood samples. Objective of this investigation also was to optimize Hb measurement from DBS by measuring the stability of Hb in filter paper dried blood spots collected from lambs. The optimal extraction time required for the measurement of Hb from DBS was also defined.

Materials and Methods

Specimen collection

Heparinised blood (10 ml) was taken from healthy lambs (n=20). In the laboratory DBS were prepared from anticoagulated venous blood samples taken for routine measurement of Hb.

The Hb values were studied in filter paper blood spots that were stored at room temperature (25 °C) for different time (1 day and 11 days).

DBS analyses

The venous whole blood samples were aliquoted (20 μL) onto Whatman 903 (purchased from Schleicher & Schuell GmbH Inc., Germany) filter paper. This paper is made from high purity cotton linters that absorb a fixed volume of blood in a given diameter of paper.

Ten DBS were made from each sample using standard filter paper. Blood spots were created by dispensing blood on the filter paper using a pipette with constant pipetting speed and pressure.

After preparation all DBS cards were placed in a place away from direct sunlight in horizontal position on a non-absorbent surface and allowed to dry overnight at ambient temperature before measurement of the Hb concentration by the cyanmethemoglobin procedure. After thorough air-drying DBS cards were put in plastic bags with desiccant packs, sealed and stored at room temperature.

Hemoglobin assays

Control whole blood samples used to monitor DBS extraction efficiencies were prepared by conventional volumetric dilution of whole blood (20 µl blood + 2.5 ml Drabkin reagent). After 20 minutes incubation period the samples were measured spectrophotometrically (Sós, 1974).

In case of DBS samples two pretreatments were used. Either the entire DBS were cut from the paper card with scissors for extraction, or DBS punches were removed from each DBS by using an ordinary standard paper hole punch. For “small” DBS samples 1/8 inch diameter discs were punched from the center of the blood spot. For Hb determination the punches were placed into test tubes for elution and then analyzed by the specific assay (cyanmethemoglobin method). As in case of conventional Hb determination equivalent amount of Drabkin reagent (2.5 ml) was added to DBS discs. After mixing each disc was eluted for different times (20, 40 or 60 minutes) at room temperature in Drabkin reagent. Finally the hemoglobin concentrations of DBS eluates were measured spectrophotometrically. After establishing the stability over a ten days period, Hb values obtained on filter paper were compared with values from fresh whole blood samples.

Results

The Hb concentrations of the lamb’s blood samples are shown in Table 1. The expected Hb content of the standard (1/8 inch) punches was established by measuring the width of a single 20 µL blood spots.

Table 1

Comparison of the Hb concentrations of the fresh whole blood samples and the DBS spots in lambs

2.5 ml Drabkin reagent Elution time: 20 min			Hb cc. (g/L)	Diameter (mm)	Estimated Hb cc. based on area (%)
Whole blood	(20 µl blood)		118.37±10.19		
DBS	whole spot (20 µl blood)	1st day	95.26±9.90	7.33±0.37	100
DBS	punched spot (1/8 inch)	1st day	21.69±2.62	3.175	121.90±16.35

The results of the established necessary elution times after 10 days storage of DBS samples are found in Table 2.

As our results indicate on the 1st day the standard punches gave identical results as the whole blood determinations under similar conditions (2.5 ml reagent and 20 min elution time). At later investigations (after 10 day storage periods) the elution required more time (40 or 60 min) for the same results.

Table 2

Hb concentrations of the DBS samples after storage

2.5 ml Drabkin reagent			Hb concentration			
				Elution time		
				20 min	40 min	60 min
Whole blood	(20 µl blood)		(g/L)	118.37±10.19		
			(%)	100		
DBS	whole spot (20 µl blood)	10 day storage	(g/L)		104.40±11.85	117.38±11.37
			(%)		88.52±9.52	99.59±9.94
DBS	punched spot (1/8 inch)	10 day storage	(g/L)		20.25±1.87	24.84±2.21
			(%)		91.84±13.08	112.57±15.54

Discussion

Filter paper sampling has several important advantages in contrast to similar technologies. Compared to conventional methods (venipuncture), DBS can be collected by non-phlebotomists in non-clinical settings (Lacher et al., 2013). The DBS sampling offer opportunities to measure and analyze samples in resource-limited settings, in areas lacking specialized laboratories. To prevent degradation DBS do not need to be handled in the laboratory on the same day and centrifuged or immediately refrigerated or frozen following collection in contrast to serum or plasma samples (Snijdewind et al., 2012).

DBS card samples are easy to collect and require a relatively small amount of blood; it can be prepared from a few drops of blood, obtained from a capillary blood stab, i.e. a finger prick.

A filter paper disk punched from a blood-filled circle provides a volumetric measurement that is similar to liquid measuring devices. It was agreed that 3.2 mm punch (universal punch size) normally contain the equivalent of 3.2 µl of whole blood. Increasing the number of disks may be used to enlarge the sample volume.

The effect of haematocrit (Ht) must be evaluated as part of any method development because it has a considerable effect on blood viscosity and may thereby affect flux and diffusion properties of the blood through the paper and hence the size of the blood spots. In our investigation the Ht values were identical in lambs (0.32±0.03 L/L). In addition, due to chromatographic effects there may be a substantial difference of metabolite concentrations between central and peripheral areas within the DBS (Holub et al., 2006).

Storage and transport of DBS cards provides some important advantages over the traditionally used liquid forms of whole blood, serum and plasma. DBS samples are very easy to store, they can be stored at ambient temperature for a prolonged period of time when stored with desiccant in closed bags. A maximum storage of 2 weeks at room temperature is suggested. Freezing at -20 °C is recommended when DBS cards are stored for more than 2 weeks for maintaining enzyme activities for longer durations (Mei et al., 2001). Therefore, the cards are stable and can be sent by regular mail to a laboratory in a tightly sealed thick envelope at room temperature safely. DBS specimens can be kept at -20°C for many weeks or years.
For the appropriate analyses and results in case of DBS sampling reliable and reproducible spots need to obtain. The limitations of the small sample sizes in DBS cards require sensitive methods. DBS methods need to be carefully developed and validated against venous methods.

Conclusions

Based on our results the advantages of DBS Hb method compared to whole blood assay could be summarized as follows. Using venous whole blood method as a reference, the Hb concentration correlated well between DBS and venous method in case of adequate elution time. Taken together, these results indicate that this blood-spot procedure is a useful means of monitoring blood Hb level in animals.
The use of DBS offers certain advantage over using traditional methods and conventional samples. Not only in case of infants but also in animal investigations the DBS are a promising alternative to venipuncture. Development of a quantitative method for determining blood parameters in small amounts of blood will be very important also in animal investigations.

Acknowledgement

The authors thank the support of Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL

References

Margareta Holub, Karin Tuschl, Rene Ratschmann, Kristina Anna Strnadová, Adolf Mühl, Georg Heinze, Wolfgang Sperl, Olaf A. Bodamer: Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 2006. 373: 27-31.

David A. Lacher, Lewis E. Berman, Te-Ching Chen, Kathryn S. Porter: Comparison of dried blood spot to venous methods for hemoglobin A1c, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and C-reactive protein. *Clinica Chimica Acta*, 2013. 422: 54-58.

Joanne V. Mei, J. Richard Alexander, Barbara W. Adam and W. Harry Hannon: Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *Journal of Nutrition*, 2001. 131: 1631S–1636S.

Ingrid J.M. Snijdewind, Jeroen J.A. van Kampen, Pieter L.A. Fraaij, Marchina E. van der Ende, Albert D.M.E. Osterhaus, Rob A. Gruters: Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Research*, 2012. 93: 309-321.

Sós J.: Laboratóriumi diagnosztika. Medicina Könyvkiadó, Budapest. 1974.

Pasta preparation by coloured natural antioxidants

*Zsuzsanna Kiss, Annamária Kerti, Csaba Szabó, Krisztina Karchesz, László Bárdos**

Department of Animal Physiology & Health, Szent István University, Gödöllő, Hungary
*bardos.laszlo@mkk.szie.hu

Abstract
Our aim was to prepare pastas with different colours by using natural antioxidant containing foods as additives. The tomato and paprika contain red colours ingredients lycopene and capsanthin and capsorubin respectively. Spinach is chlorophyll rich food plant and it contains a lot of lutein too. These model pasta beside their uncommon colours have better biological activities and can be used as functional food.
Wheat flour was used for the preparation of pastas. The spinach puree for the green pasta, tomato puree, and red paprika powder for the red coloured pasta.
The surface colours of paste were determined by handy spectrometers (Micromatch™ Sheen Ltd) which use the international standard of CIELAB values. The coloration was successful by the additives and can be seen before and after cooking.
It was a fact that the colouring by paprika has not changed. In the other cases there were more or less alterations of CIELAB values. The chlorophyll content of spinach and lycopene content of tomato puree was analyzed. Three antioxidant reactions of pastas were characterized by ABTS, DPPH and FRAP methods respectively.
The measurements of antioxidant capacity of different components showed a ranking order. These additives increase the antioxidant capacity of paste that they have health protective effects.

Keywords: coloured pasta, antioxidant capacity, ABTS, DPPH, FRAP

Introduction

Functional foods are foods that have a potentially positive effect on health beyond basic nutrition. To produce such a foods sometimes new ingredients has been added to it and the new product has a new function often related to health-promotion or disease prevention. Epidemiological and experimental evidence associating diets rich in fruits and vegetables with prevention of chronic diseases such as cancer has stimulated interest in plant food phytochemicals as physiologically active dietary components.
Our aim was to prepare pastas with different colours by using natural antioxidant containing foods as additives. The tomato and paprika contain red colours ingredients (lycopene and capsanthin and capsorubin respectively. Spinach is chlorophyll rich food plant and it contains a lot of lutein too. These model pasta beside their uncommon colours have better biological activities and can be used as functional food.
Lycopene is a carotenoid and phytonutrient found in red fruits and vegetables such as tomatoes, pink grapefruits, watermelons etc. It is the compound that is responsible for the red colour in these foods. Numerous studies have shown that ingesting lycopene-rich foods can result in positive health benefits. (Britton, et al. 2009).
Oxidative stress is one of the major contributors to increased risk of some diseases. Lycopene is a very effective antioxidant. A diet rich in lycopene containing tomato products has been found to protect against these chronic diseases by mitigating oxidative damage. (Rao, 2004). Considerable evidence suggests that lycopene, has significant antioxidant potential in vitro and may play a role in preventing prostate cancer and cardiovascular disease in humans. (Arab and Steck 2000)
Prostate cancer is the most common cancer in men population in the industrialized countries. Recent epidemiological studies have suggested a potential benefit of this carotenoid against the risk of prostate cancer (Giovannucci, 2002).

The green colour chlorophyll and its various derivatives are believed to be among the family of phytochemical compounds that are potentially responsible for such associations. (Ferruzzi and Blakeslee, 2007).
Diets high in red meat and low in green vegetables are associated with an increased risk of colon cancer. The red meat, containing high quantity of heme, increases colonic cytotoxicity and proliferation of the colonocytes, whereas addition of chlorophyll from green vegetables inhibits these heme-induced effects. Chlorophyll completely prevented these heme-induced effects (De Vogel et al 2005). The bioavailability of lutein from spinach is very good independently of the dietary fiber content (Castenmiller et al. 1999).

Materials and Methods

Preparation of pasta

Wheat flour was used for the preparation of pasta. The common and special additives were the next: frozen spinach puree for the green pasta, tomato puree, and red paprika powder for the red coloured pasta. The composition and rations of different pasta are in the Table 1.

Table 1.

Composition of model paste

Mark	flour (g)	additive (g)	whole egg	Water* (ml)
Control	100	0	1	6,0
Tomato 5		5		6.8
Tomato 10		10		1.8
Paprika 5		5		10
Paprika 10		10		12
Spinach 5		5		6,8
Spinach 10		10		2.0

*Differences of water due to the different dry material contents of additives

Colour measurement

The surface colours of paste were determined by handy spectrometers (Micromatch™ Sheen Ltd) which use the international standard of CIELAB values (Figure 1.)

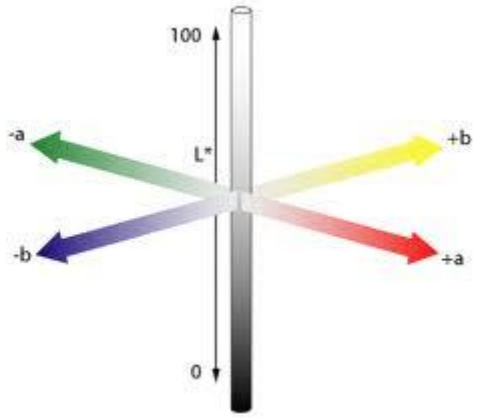


Figure 1.

The coordinates of the CIELAB principles

L = Luminosity, (surface) (0-100); a* =red – green; b* = yellow - blue

The CIELAB values were recorded every week for a month.

Analytical procedures

The chlorophyll content of spinach was measured by the „actual-trophic value" which is commonly used by the characterizations of phytoplankton chlorophyll contents (Felföldy, 1987).

The lycopene content of tomato puree was analyzed by the specific molar absorption coefficient of lycopene at 504 nm (Rodrigez-Amaya, 2001).

Characterization of antioxidant activities
Tree antioxidant reactions were used:

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) procedure (Ozgen et al. 2006) which was characterized by Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) reaction (Ozgen et al. 2006)
- FRAP-(Ferric Reducing Ability of Plasma) (Benzie and Strain, 1996)

Statistical analysis
The statistical calculations were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com".

Results and Discussion
The coloration was successful by the additives. This can be seen before and after cooking in the pictures 1 and 2.



Picture 1.

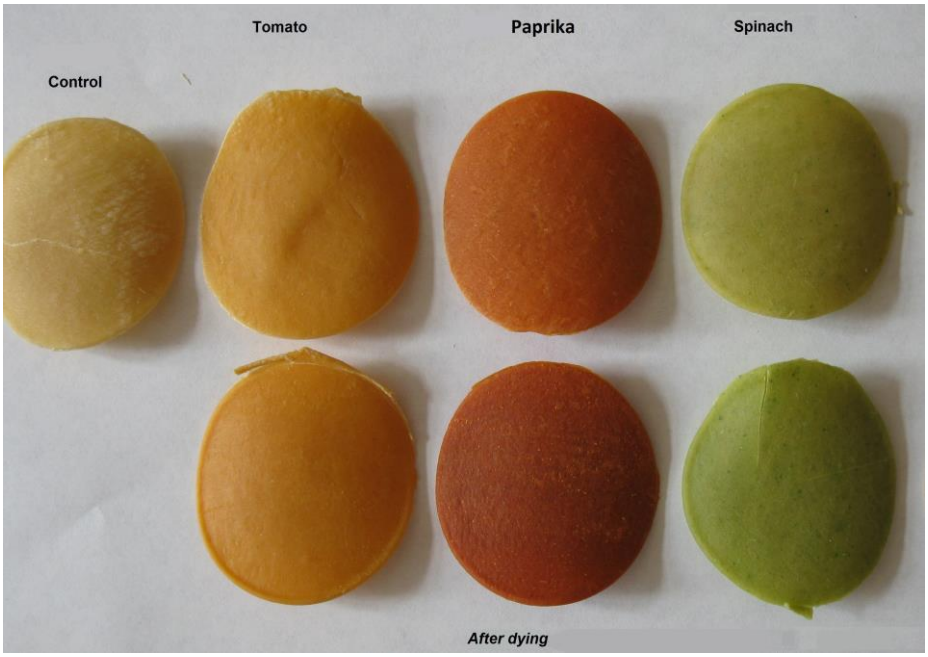
The coloured pastas before cooking



Picture 2.

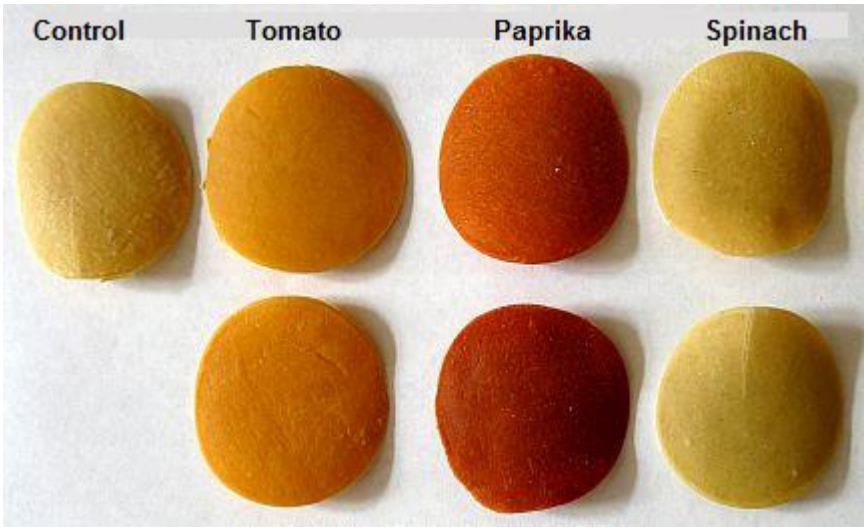
The coloured pastas after cooking

The picture 3 shows the original colours of paste after the dry. On the pictures 5 and 6 show the same pasta after one month of storage. The environmental conditions of storage were different. One group of dry pasta was stored in the laboratory (*Picture 4 and 5.)* and the other in dark place. The other storage environment (humidity and temperature) was the same. Those paste which were made by spinach additives become more pale in the case of day light than dark storage.



Picture 3.

The coloured pastas after drying
Top: 5 g additives, bottom: 10 g additives



Picture 4.

The coloured pastas after 30 days stored in daylight
Top: 5 g additives, bottom: 10 g additives



Picture 5.

The coloured pastas after 30 days stored in dark

Top: 5 g additives, bottom: 10 g additives

The spectrophotometric measurements by Micromatch™ result an objective numeric data of the colours. The measurements were taken by 5 repetitions in all type of paste in every week.

The colorants of additives (tomato: lycopene, paprika: capsanthin and capsorubin, spinach: chlorophyll) have shoved very different colour changes during the 4 weeks of investigation. These changes are summarized in the Table 2. The arrows indicate the tendency, and the background colours the dimension of the CIELAB coordinates.

Table 2.

The tendencies of colour changes during the 30 days storage

CIELAB	storage	Cont	Tom 5	Tom 10	PAP 5	PAP 10	SP 5	SP 10
L	L			→	→		→	→
	D	←		→			←	←
a*	L						→	→
	D	←	←	←				
b*	L	←	→	→				←
	S	←	→	→			←	←

L daylight, D dark

It was a fact that the colouring by paprika has not changed. In the other cases there were more or less alterations of CIELAB values.

The measurements of antioxidant capacity of different components showed a ranking order. This ranking was little bit different by the methods (Table 3). The ABTS radical cation is reactive towards most antioxidants including phenols and thiols of paste. The FRAP reaction indicates the poliphenols.

The DPPH is used as an indicator of the radical nature materials and prefers the lipoids in the reaction environment.

Table 3.

The ranking of antioxidant values* of different components of paste

	ABTS		FRAP		DPPH	
1.	paprika	142,22	paprika	105,00	paprika	9,84
2.	spinach	34,44	spinach	24,58	egg	3,06
3.	tomato	33,33	tomato	20,42	tomato	1,80
4.	flour	6,67	egg	8,00	spinach	0,49
5.	egg	3,22	flour	5,00	flour	0,00

*Trolox unit

The differences among the antioxidant capacities can be explained by the basic values of additives (*Table 3.)* and the content of additives in the paste. The different storage (day light vs. dark) has also influence on the antioxidant values (*Table 4.*).

Table 4.

The antioxidant capacities of different paste by different methods in different conditions of storage

(at 4th w., Trolox unit)

Rank	ABTS					
			day light		dark	
1.	paprika 10	11,811	tomato 10	7,18	paprika 5	8,73
2.	paprika 5	5,811	paprika 5	6,82	control	7,09
3.	tomato 10	4,264	spinach 5	6,27	paprika 10	5,91
4.	tomato 5	1,811	spinach 10	6,18	tomato 10	5,18
5.	spinach 10	1,434	paprika 10	5,27	spinach 5	4,55
6.	control	0,943	control	3,73	tomato 5	4,45
7.	spinach 5	0,717	tomato 5	3,73	spinach 10	3,91

Rank	FRAP					
			day light		dark	
1.	paprika 10	30	paprika 10	22,50	paprika 10	26,67
2.	paprika 5	19	paprika 5	17,50	paprika 5	18,33
3.	spinach 10	14	spinach 10	10,00	tomato 10	10,83
4.	spinach 5	13	tomato 10	10,00	spinach 10	10,00
5.	tomato 10	13	control	10,00	spinach 5	9,17
6.	tomato 5	13	tomato 5	9,17	tomato 5	8,33
7.	control	13	spinach 5	9,17	control	8,33

Conclusions

- Red and green coloured paste can be prepared by 5-10 % tomato puree or paprika powder and spinach puree due to their bioactive colour compounds lycopene, capsanthin/capsorubin and chlorophyll respectively.
- These additives increase the antioxidant capacity of paste that they have health protective effects.

Acknowledgements

The authors thank the support of Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL and the project KMR_12-A 2012-0181

References

ARAB, L. , STECK, S. (2000): Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; 71(suppl):1691S–1695S.

BENZIE, F.F., STRAIN, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem*. 239: 70-76.

BLOIS M. S.(1958): Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. *Nature*, 1958. (4617): 1198-1200.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (2009): Carotenoids. Nutrition and Health. Birkhäuser Verlag, Basel, Volume 5.

CASTENMILLER, J.J.M., WEST, C.E., ET. AL. (1999) The Food Matrix of Spinach Is a Limiting Factor in Determining the Bioavailability of ß-CAROTENE and to a Lesser Extent of Lutein in Humans. *Journal of Nutr;* **129**:349-355.

DE VOGEL,J., JONKER-TERMONT, D.S.M., VAN LIESHOUT, E.M.M., KATAN,M.B., VAN DER MEER, R. (2005): Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis* **26:**387—393.

FELFÖLDY L. (1987): A biológiai vízminősítés (4. javított és bővített kiadás). Vízügyi Hidrobiológia 16., 1-258. - VGI, Budapest.

FERRUZZI,M.G., BLAKESLEE, J.(2007): Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr. Res*.,**27:** 1– 12.

GIOVANNUCCI, E. (2002): A Review of Epidemiologic Studies of Tomatoes, Lycopene, and Prostate Cancer. *Exp.Biol. Med.,* **227**:852-859.)

HAE-YUN CHUNG ET. AL. (2004): Lutein Bioavailability Is Higher from Lutein-Enriched Eggs than from Supplements and Spinach in Men. .*J. Nutr*. **134:** 1887–1893.

KRINSKY, N.I., LANDRUM, J.T., BONE,R.A.: Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann. Rev. Nutr*., **23**: 171-201. 2003.).

OZGEN, M., REESE, N.R., TULIO, A.Z., SCHEERENS, J.C., MILLER, R. (2006): Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2¢-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem*. 54, 1151-1157

RAO, A.V. (2004): Processed Tomato Products as a Source of Dietary Lycopene:Bioavailability and Antioxidant Properties**.** *Canad. J.Diet. Practice Res*., **65**: 161-165.

RODRIGEZ-AMAYA,D.B. (2001): A guide to carotenoid analysis in food, ILSI Press, Washington, D.C.

WHO/FAO (2003):Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases, 2003.

ASSESSMENT OF BENEFICIAL AND TOXIC EFFECTS OF NATURAL SUBSTANCES ON OVARIAN FUNCTIONS

Adriana Kolesárová[*1], Nora Maruniaková[1], Marína Medveďová[1], Marek Halenár[1], Attila Kádasi[1,2], Andreia Filipa Tomás Marques[3], Jozef Bulla[1]*

[1]Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovak Republic;
[2]Institute for Genetics and Reproduction of Farm Animals, Animal Production Research Centre Nitra, Lužianky, Slovak Republic;
[3]Tropical Research Institute, Lisboa, Portugal,
*Corresponding author: Adriana.Kolesarova@uniag.sk

ABSTRACT

The dynamics of a stress response of the organism towards potential stressors – mycotoxins underlines the need to define limits in which animals develop a state without compromising their health and maintain a stable internal milieu. Tissue and cell cultures are of increasing interest in the evaluation of toxicological risks of toxic compounds and their possible elimination. It is for this reason the solution of the problem in the field of examining effects of the potential protective natural substances in the animal organism and their mechanism of the effect is highly relevant. Ovarian granulosa cells are sensitive to the effects of mycotoxin – trichothecenes but bioactive substances of natural origin may be important in the prevention of reproductive alterations induced by exogenous and endogenous factors.

Keywords: ovary, deoxynivalenol, resveratrol, steroidogenesis, proliferation, apoptosis

INTRODUCTION

The environmental stress is one of the main factors that change the reproductive functions (Kolesarova et., 2010a,b,c; 2011a,b; 2012). Previous reports describe the influence of beneficial (Kolesarova et al., 2011c, 2012) and toxic (Kolesarova et al., 2009; 2010a,b,c; 2011a,b; Medvedova et al., 2011) substances on porcine ovarian (GCs) focused on processes of steroidogenesis, proliferation and apoptosis in these reproductive cells (Kolesarova et al., 2009; 2010a,b,c; 2011a,b; Medvedova et al., 2011). On the other hand the bioactive substances of natural origin may be important in the prevention of reproductive alterations induced by exogenous and endogenous factors (Kolesarova et al., 2012).

Characteristic of Trichothecenes - Deoxynivalenol

Mycotoxins are natural and very stable toxins, with relatively low-molecular weight secondary metabolites of fungal origin, which can contaminate a large variety of feed mixtures (Labuda et al., 2009; Tancinova et al., 2009), grains and foodstuffs worldwide (Schollenberger et al., 2007; Ranzenigo et al., 2008). They are found in a variety of foods and beverages, including both plant-based products and animal products. Among the first ones, its presence in cereal grains (corn, wheat, barley, oats, rye, rice, etc.) and beans (coffee, cocoa, soy, etc.) are harmful to animals and humans (Abouzied et al., 1991). However, not all fungi produce mycotoxins and among the toxigenic species, some only produce one type of mycotoxin, while others are able to produce several. Cereals can be mostly contaminated by Fusarium species, a group of toxin-producing molds (Tiemann et al., 2003a,b; Larsen et al., 2004; Giraud et al., 2010).

Trichothecenes, such as deoxynivalenol (DON), are the major mycotoxins of *Fusarium species* (Larsen et al.,2004; D´Mello et al., 1999). DON ($C_{15}H_{20}O_6$; mol. wt. = 296.32) is also called Dehydronivalenol, 4-Deoxynivalenol, 4-Desoxynivalenol or Vomitoxin. DON can be acutely or

chronically toxic, or both, depending on the kind of toxin and the dose. Also, it could be rapidly absorbed after oral administration passively throughout the gastrointestinal tract and actively in the kidneys (Marquardt and Frohlich, 1992), liver, muscle, adipose tissue (Gareis et al., 2000) and reproductive tissues (Ranzenigo et al., 2008). Major *Fusarium* mycotoxin, DON, negatively influences the establishment of pregnancy in pigs in part because of its ability to inhibit oocyte maturation (Alm et al., 2002; 2006). Thus, mycotoxin exposure that alters granulosa cells and steroid hormone production may also alter oocyte development (Alm et al., 2002), ovulation (Kumagai et al., 1982), reproductive functions and pregnancy outcome (D´Mello et al., 1999; Alm et al., 2002).

Mechanism of the effect of Trichothecenes - Deoxynivalenol

Trichothecene toxicity at the cellular level is characterized by inhibited protein synthesis (Rotter et al., 1994), impairment of membrane functions, altered intercellular communication and deregulation of calcium homeostasis (Pestka and Smolinski 2005). Trichothecenes not only bind eukaryotic ribosomes and interfere with translation (Ueno 1983), but also activate intracellular protein kinases that both mediate selective gene expression and apoptosis, ultimately contributing to downstream pathologic sequelae (Pestka et al., 2004). Moreover, it has been demonstrated that trichothecenes rapidly activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) which modulates physiological processes including cell growth, differentiation and apoptosis (Kouadio et al., 2007 , Marzocco et al., 2009; Luongo et al., 2010). In addition to inhibiting translation, trichothecenes can simultaneously activate p38, Jun N-terminal Kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK), MAPK *in vitro* and *in vivo* (Chung et al., 2003; Moon and Pestka, 2003; Moon et al., 2003; Yang et al., 2000; Zhou et al., 2003a,b, 2005a,b) via a process referred to as ‘‘ribotoxic stress’’ (Iordanov et al., 1997). Oxidative stress is certainly involved in the toxicities of trichothecene mycotoxins (El Golli et al., 2006). Oxidative stress in the form of *r*eactive oxygen species (ROS) generation or disruption of the redox balance in the cell not only induces apoptosis but also involved in cell proliferation and signalling (Martindale and Holbrook, 2002).) Oxidative stress is the underlying mechanism by which trichotecene causes DNA damage and apoptosis v. At the cellular level, DON induces ribotoxic stress thereby disrupting macromolecule synthesis, cell signaling, differentiation, proliferation, and death (Pestka, 2010).

Trichothecenes affect ovarian functions

Secretory activity: The influence of mycotoxin - DON on secretory activity was detected by Medvedova et al. (2011) and Kolesarova et al. (2012). Dose-response of DON on ovarian granulosa cells was examined in these studies. Isolated ovarian GCs were able to survive in culture and release hormonal substances insulin-like growth factor I (IGF-I) and progesterone after experimental DON addition at the doses 10, 100 and 100 ng/ml. These data confirm previous reports concerning the influence of toxic substances on porcine cellular processes (Ranzenigo et al., 2008; Kolesarova et al., 2009, 2010a,b,c,d; 2011a,b). The effect of DON in relation to IGF-I release by ovarian granulosa cells have been examined previously by Ranzenigo et al. (2008) but the time of cell culture with mycotoxin application lasted 2 days and in the study of Medvedova et al. (2011) it was 24 h. DON had inhibitory effects on IGF-I –induced steroid production and decreased cell numbers at the dose of 1000 ng/ml (Ranzenigo et al., 2008). Medvedova et al. (2011) have shown that the mycotoxin DON decreased IGF-I secretion by cultured GCs at a dose of 1000 ng/ml but it was not affected by the doses of 10 ng/ml and 100 ng/ml. Ranzenigo et al. (2008) have demonstrated inhibited progesterone production induced by FSH plus IGF-I at the doses 100 ng/ml (0.337 μM) and 1000 ng/ml (0.37 μM) of DON. In the study of Medvedova et al. (2011) visible mitosis of GCs after 24 h DON effect at the dose of 10 ng/ml was observed. Progesterone release was stimulated by DON at the dose 1000 ng/ml but not at 10 and 100 ng/ml. (Medvedova et al., 2011). Similarly progesterone release was stimulated by toxic doses of DON (2000, 3000 and 5000 ng/ml) used in the experiment (Kolesarova et al., 2012). The effect of the DON was found to be concentration dependent as it was described in previous study (Ranzenigo et al., 2008; Medvedova et al., 2011; Kolesarova et al., 2012).

Proliferation and apoptosis: Expressions of proliferation (cyclin B1 and PCNA)- associated peptides were stimulated by DON (Medvedova et al., 2011). Analyses of porcine endometrial cells cultivated (for 24h) with different doses of DON were done by Tiemann (2003a). These results point out to significant decrease of proliferation at the concentrations of 1.88 µM and 3.76 µM of DON. These authors also observed expression of PCNA protein, which significantly decreased at the doses of 1.88 µM (for 24h) and 0.94 µM (for 48h) of DON. In the study of Medvedova et al. (2011) expression of cyclin B1 was stimulated by DON (at 1000 ng/ml but not at 10 and 100 ng/ml). Similarly PCNA expression was stimulated by DON (at 100 and 1000 ng/ml but not at 10 ng/ml). On the other hand caspase-3 expression was not influenced by DON treatment (at doses 10, 100 and 1000 ng/ml) (Medvedova et al., 2011).

Conclusion: Porcine ovarian GCs are sensitive to the effects of mycotoxin - trichothecenes. The results indicate, (1) a direct effect of DON on secretion of hormones, (2) expression of markers of proliferation (cyclin B1 and PCNA) but not (3) expression of marker of apoptosis (caspase-3) in porcine ovarian granulosa cells. This in vitro study suggests the dose-dependent association of DON on porcine ovarian functions (Medvedova et al., 2011).

Characteristic of Phytoalexins- Resveratrol

Phytoalexins are antimicrobial substances under natural conditions not found in plants. Their creation occurs in plants attacked by pathogens (Dixon and Paiva, 1995). Resveratrol (RSV, 3,5,4´-trihydroxystilbene) was the first isolated from the roots of white hellebore (Veratrum grandiflorum O. Loes) in 1940 (Takaoka, 2006) and later in 1963, from the roots of (Polygonum cuspidatum) a plant used in traditional Chinese and Japanese medicine (Nonomura et al., 1963). It is a natural polyphenol widely present in plants and in particular in the skin of red grapes and in wine, resveratrol antioxidant properties have been well demonstrated, with a wide range of biological effects (Karuppagounder et al., 2009). It is beneficial against diverse cardiac diseases including ischemic heart disease, hypertrophy, heart failure, atherosclerosis, hypertension, diabetes and obesity (Bertelli and Das, 2009; Mukherjee et al., 2009). Resveratrol is well known for its phytoestrogenic, antioxidant properties, growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities (Joe et al., 2002; Jiang et al., 2005; Baur and Sinclair, 2006). It also has protective role in endothelial cells by modulating mitochondrial oxidative stress (Ungvari et al., 2009).

Mechanism of the effect of Phytoalexins- Resveratrol

Resveratrol is able to inhibit PI3K/Akt Protein Kinase/ mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway in various types of cells (Jiang et al., 2005). It inhibits proliferation and induces apoptosis in cells at different levels (Ferry-Dumazet et al, 2002, Haider et al, 2003). Resveratrol can alter a variety of genes thereby changing the ‘‘death signal’’ into a ‘‘survival signal’’ (Das and Maulik, 2004). Svechnikov et al. (2009) present investigation has demonstrated that resveratrol and its analogues structure-dependently attenuated steroidogenesis in Leydig cells through suppression of the expression of StAR and cytochrome P450c17.

Phytoalexins affect ovarian functions

Secretory activity: Stimulatory effect of RSV on progesterone release by GCs was recorded after resveratrol treatment at the dose of 50 µg/ml, while doses of 30 and 10 µg/mL did not affect the release of the steroid hormone (Kolesarova et al., 2012). RSV in combination with DON at the highest doses (50 µg/ml of RSV and 5000 ng/ml of DON) stimulated progesterone release by GCs. Stimulatory effect of alone DON on the progesterone release by GCs was lower in comparison with RSV in combination with DON (Kolesarova et al., 2012). The effect of the DON (Medvedova et al., 2011; Ranzenigo et al., 2008) and DON combined with resveratrol (Kolesarova et al., 2012) was found to be concentration dependent.

Conclusion: The results of Kolesarova et al. (2012a) indicate, (1) the dose-depended stimulatory effects of RSV, DON and combination of RSV with DON on release of steroid hormone progesterone and (2) reduction of the stimulatory effect of DON by RSV. The in vitro results suggest that reproductive toxicity of animals induced by mycotoxin - deoxynivalenol can be inhibited by protective natural substance – resveratrol.

Conclusion

In conclusion, it is important to highlight that the impact of fungal toxins upon animals extends beyond their clinical features. Despite the ever-increasing understanding of mycotoxins, they still have a continuous and severe economic impact worldwide (Marquardt, 1996; Hussein and Brasel, 2001). Although acute ingestion of high levels of mycotoxins can be very harmful to the animal, long term consumption of low concentrations of mycotoxins can also be damaging. There are several ways of reducing mycotoxin concentrations both pre and post-harvest, including the addition of feed additives such as, but not limited to, natural clays, yeasts, and enzymes. Since mycotoxins can be so detrimental to swine industry, further determination of sustainable way to combat the global mycotoxin problem is important for maintaining animal health, as well as reducing economic impacts on farmers and producers (Chaytor et al., 2011). Tissue and cell cultures are of increasing interest in the evaluation of toxicological risks of contaminated compounds and their possible elimination. It is for this reason the solution of the problem in the field of examining effects of the potential protective natural substances in the animal organism and their mechanism of the effect is highly relevant.

Acknowledgments:
The results shown in this review were obtained financially supported by the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic projects no. 1/0790/11, 1/0022/13 and APVV-0304-12, KEGA 030SPU-4/2012, RGB Net (COST Action TD1101), European Community under project no 26220220180: Building Research Centre „AgroBioTech".

REFERENCES

Abouzied, M.M., Azcona, J.I., Braselton, W.E., Pestka, J.J. (1991): Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: Evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57, 3672–3677.

Alm, H., Greising, T., Brüssow, K.P., Torner, H., Tiemann, U. (2002): The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. Toxicol. In Vitro, 2002, 16, 643–648.

Alm, H., Brussow, K.P., Torner, H., Vanselow, J., Tomek,W., Danicke, S., Tiemann, U. (2006): Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. Reprod. Toxicol., 2006, 22**,** 44–50.

Baur, J.A., Sinclair, D.A. (2006): Therapeutic potencial of resveratrol: the *in vivo* evidence. Natrure reviews Drug Discovery, 5, 493-506.

Bertelli, A.A, Das, D.K. (2009): Grapes, wines, resveratrol, and heart health. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2009, 54, 468–476.

Chaudhari**,** M., Jayaraj, R., Bhaskar, A.S., Lakshmana Rao, P.V. (2009): Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. Toxicology, 2009, 262(2), 153-61.

Chaytor, A.C., Hansen, J.A., Heugten, E., Todd See, M., Woo Kim, S. (2011): Occurence and decontamination of mycotoxins in swine feed. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 2011, 24(5), 723-738.

Chung, Y.J., Zhou, H.R., Pestka, J. (2003): Transcriptional and post-transcriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF-alpha expression by deoxynivalenol (vomitoxin). Toxicol. Appl. Pharmacol., 2003, 193, 188–201.

Das, D.K., Maulik, N. (2004): Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. Biochemistry (Mosc), 2004, 69, 10–17.

Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, 7, 1085-1097.

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C. (1999): Fusarium mycotoxins, a review of global implications for animal health, welfare and productivity, Anim. Feed Sci. Technol., 1999, 80, 183–205.

El Golli, E., Hassen, W., Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ladjimi, M.M., Bacha, H. (2006): Induction of Hsp 70 in Vero Cells in Response to Mycotoxins Cytoprotection by Sub-Lethal Heat Shock and by Vitamin E. Toxicol. Lett., 2006, 166, 122-130.

Ferry-Dumazet, H., Garnier, O., Mamani-Matsuda, M., Vercauteren, J., Belloc, F., Billiard, C., Dupouy, M., Thiolat, D., Kolb, J. P., Marit, G., Reiffers, J., Mossalayi, M. D. (2002): Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. Carcinogenesis, 23, 8, 1327-1333.

Gareis**,** M., Wolff, J. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin. Mycoses, 2000, 43 Suppl 1:79-83.

Giraud, F., Pasquali, M., El Jarroudi, M., Vrancken, C., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Delfosse, P., Bohn, T. (2010): Fusarium head blight and associated mycotoxin occurrence on winter wheat in Luxembourg in 2007/2008. Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control Expo. Risk. Assess., 2010, 26, 1–11.

Haider, U. G., Sorescu, D., Griendling, K. K., Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2003): Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. Molecular Pharmacology, 2003, 63, 4, 925-932.

Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 2001, 167, 101–134.

Iordanov, M.S., Pribnow, D., Magun, J.L., Dinh, T.H., Pearson, J.A., Chen, S.L., Magun, B.E. (1997): Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. Mol Cell Biol., 1997, 17(6), 3373–3381.

Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., Kuo, K., Gautam, S.C., Groc, L., Rodriguez, A.I, Koubi, D., Hunter, T.H., Corcoran, G.B., Seidman, M.D. Levine, R.L. (2005). Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. Molecular Cancer Therapy, 4, 554-561.

Joe, A.K, Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D., Weinstein, I.B. (2002): Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. Clinical Cancer Research, 8, 893-903.

Karuppagounder, S.S., Pinto, J.T., Xu, H., Chen, H.L., Beal, M.F., Gibson, G.E. (2009): Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. Neurochem Int., 2009, 54, 111–118.

Kolesarova, A., Slivkova, J., Sirotkin, A., Massanyi, P., Capcarova, M. (2009): The release of insulin-like growth factor-I by ovarian granulosa cells of pregnant sows after lead and mercury administration in vitro. Slovak J. Anim. Sci., 2009, 42, 35–41.

Kolesarova, A., Roychoudhury, S., Slivkova, J., Sirotkin, A., Capcarova, M., Massanyi, P. (2010a): In vitro study on the effect of lead and mercury on porcine ovarian granulosa cells. Journal of Environmental Science and Health*,* Part A Toxic hazardous substances and environmental engineering, 2010a, 45, 320-331.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Sirotkin, A., Medvedova, M., Kovacik, J. (2010b): Cobalt-induced changes in the IGF-I and progesteron release, expression of proliferation- and apoptosis-related peptides in porcine ovarian granulosa cells in vitro. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2010b, 45, 810-817.

Kolesarova, A., Sirotkin, A., Roychoudhury, S., Capcarova, M. (2010c): Puberty related changes in hormonal levels, productive performance, carcass traits, and their interactions in Slovakian White gilts. Asian–Australian Journal of Animal Science, 2010c, 23, 182-187.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Roychoudhury, S. (2010d): Metal induced ovarian signaling. - Nitra : Slovak Agricultural University, 2010d, 135p. ISBN 978-80-552-0456-7.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Medvedova, M., Sirotkin, A.V., Kovacik, J. (2011a) In vitro assessment of iron effect on porcine ovarian granulosa cells: secretory activity, markers of proliferation and apoptosis. Physiol Res., 2011a, 60(3), 503-10.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Sirotkin, A.V., Medvedova, M., Kovacik, J. (2011b): In vitro assessment of silver effect on porcine ovarian granulosa cells. J Trace Elem Med Biol., 2011b, 25(3), 166-70.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Bakova, Z., Galik, B., Juracek, M., Simko, M., Sirotkin, A.V. (2011c) The effect of bee pollen on secretion activity, markers of proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. J Environ Sci Health B. 2011c, 46(3), 207-12.

Kolesarova, A.; Capcarova, M.; Maruniakova, N.; Lukac, N.; Ciereszko, R. E.; Sirotkin, A.V. (2012): Resveratrol inhibits reproductive toxicity induced by deoxynivalenol. In J Environ Science and Health, part A, 2012, 47(9), 329-34.

Kouadio, J. H., Sebastien, D. D., Moukha, S. (2007): Effect of combinations of fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation and viability in Caco-2 cells. Toxicon, 2007, 49, 306–317.

Kumagai, S., Shimizu, T. (1982): Neonatal exposure to zearalenone causes persistent anovulatory estrus in the rat. Arch. Toxicol., 1982, 50, 279–286.

Labuda, R., Parich, A., Vekiru, E., Tancinova, D. (2009): Incidence of fuminosins, moniliformin and Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med., 2009, 12(1), 81–86.

Larsen, J.C., Hunt, J., Perrin, I., Ruckenbauer, P. (2004): Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. Toxicol. Lett., 2004, 153(1), 1–22.

Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., D'arienzo, R., Rossi, M. (2010): Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells. Toxicon., 2010, 55, 73–80.

Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. (1992): A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. Journal of Animal Science, 1992, 70, 3968–3988.

Marquardt, R.R. 1996. Effects of molds and their toxins on livestock performance: a western Canadian perspective. Animal Feed Sci. Technol., 1996, 58, 77–89.

Martindale, J.L., Holbrook, N.J. (2002): Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell Physiol., 2002, 192, 1–15.

Marzocco, S., Russo, R., Bianco, G., Autore, G., Severino, L. (2009): Pro-apoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages. Toxicol. Lett., 2009, 189, 21–26.

Medvedova, M., Kolesarova, A., Capcarova, M., Labuda, R., Sirotkin, A.V., Kovacik, J., Bulla, J. (2011): The effect of deoxynivalenol on the secretion activity, proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. J. Environ. Sci. Health B, 2011, 46(3), 213-219.

Moon, Y., And Pestka, J.J. (2003a): Deoxynivalenol-induced mitogen-activated protein kinase phosphorylation and IL-6 expression in mice suppressed by fish oil. J. Nutr. Biochem., 2003a, 14, 717–726.

Moon, Y., Uzarski, R., Pestka, J. (2003b): Relationship of trichothecene structure to COX-2 induction in the macrophage: selective action of Type B (8-keto) trichothecenes. J. Toxicol. Environ. Health, 2003b, 66, 1967–1983.

Mukherjee, S., Lekli, I., Gurusamy, N., Bertelli, A.A., Das, D.K. (2009): Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. Free Radic. Biol. Med., 2009, 46, 573–578.

Nonomura, S., Kanagawa, H., Makimoto, A. (1963): Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon (Polygonum cuspidatum Sieb. Et Zucc.). Yakugaku Zasshi, 1963, 83, 988-990.

Pestka, J., Zhou, H.R., Moon, Y., Chung, Y.J. (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. Toxicology Letters, 2004, 153, 61–73.

Pestka, J.J., Smolinski, A.T. (2005): Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev., 2005, 8(1), 39–69.

Pestka, J.J. (2010): Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Arch. Toxicol., 2010, 84(9), 663-679.

Ranzenigo, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P.Y., Spicer, L.J. (2008): Effects of Fusarium mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. Anim. Reprod. Sci., 2008, 107(1–2), 115–130.

Rotter, B.A., Thompson, B.K., Lessard, M., Trenholm, H.L., Tryphonas, H. (1994): Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. Fundam. Appl. Toxicol., 1994, 23, 117–124.

Schollenberger, M., Muller, H.M., Rufle, M., Terry-Jara, H., Suchy, S., Plank, S., Drochner, W. (2007): Natural occurrence of Fusarium toxins in soy food marketed in Germany. Int. J. Food Microbiol., 2007, 113, 142–146.

Svechnikov, K., Spatafora, C., Svechnikova, I., Tringali, C., Soder, O. (2009): Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. J. Appl. Toxicol., 2009, 29, 673-680.

Takaoka, M.J .(1940): Of the phenolic substances of white hellebore (Veratrum grandiflorum Loes. Fil.). J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University, 1940, 3, 1-16.

Tancinova, D., Labuda, R. (2009): Fungi on wheat bran and their toxinogenity. Ann. Agric. Environ. Med., 2009, 16(2), 325–331.

Tiemann, U., Tomek, W., Schneider, F., Vanselow, J. (2003a): Effects of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. Reprod. Toxicol., 2003a, 17(16), 673–681.

Tiemann, U., Viergutz, T., Jonas, L., Schneider, F. (2003b): Influence of the mycotoxins α- and β-zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. Reproductive Toxicology, 2003b, 17, 209-218.

UENO, Y. (1983): General toxicology. In: Ueno, Y. (Ed.), Developments in food science. Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects. Elsevier, Tokyo, 135–146.

Ungvari, Z., Labinskyy, N., Mukhopadhyay, P., Pinto, J.T., Bagi, Z., Ballabh, P., Zhang, C., Pacher, P., Csiszar, A. (2009): Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2009, 297, 1876–1881.

Yang, G., Jarvis, B.B., Chung, Y., Pestka, J.J. (2000): Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK and SAPK/JNK activation. In Toxicol. Appl. Pharmacol., 2000, 164, 149–160.

Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka, J.J. (2003a): Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin. Toxicol. Sci., 2003a, 72, 130–142.

Zhou, H.R., Lau, A.S., Pestka, J.J. (2003b): Role of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in deoxynivalenolinduced ribotoxic stress response. Toxicol. Sci., 2003b, 74, 335– 344.

Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka J.J. (2005a): Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. Toxicol. Sci., 2005a, 87(1), 113–122.

Zhou, H.R., Jia, Q., Pestka, J.J. (2005b): Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kinase Hck. Toxicol. Sci., 2005b, 85 (2), 916–926.

Analysis of Na+/K+ ATPase activity in selected brain structures of mice after intra-peritoneal injection of Streptozotocin

Kopańska M., Formicki G.*, Kraska K.*, Slanina T. **, Lukáčová J.**, Čupka P.***

*Department of Animal Physiology and Toxicology, Institute of Biology Pedagogical University of Cracow, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków
** Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic.

ABSTRACT

The sodium-potassium pump (Na,K-ATPase) is a critical protein found in the membranes of animal cells. It functions in the active transport of potassium and sodium ions across the cell membrane against their gradients of concentrations **(Morth *et al., 2007).*** The aim of our work was to estimate the Na,K-ATPase activity in selected brain structures (right hemisphere, the left hemisphere, cerebellum and trunk of the brain) after streptozotocin. The level of ions was measured in the mixture of supernatant on the EasyLyte Na/K/Cl analyzer. We noticed influence of streptozotocin on the sodium-potassium pump activity in selected brain structures. Although no high significant changes after each time, we noticed decreased tendency in the activity. Significantly decreased of Na,K-ATPase activity occures in diabetic patients.

Key words: Na+/K+ ATPase, brain, streptozotocin, oxidative stress, diabetes

INTRODUCTION

Sodium-potassium adenosine triphosphatase (Na+/K+ ATPase) is also known as Na+/K+ pump, sodium pump or sodium-potassium pump.

The Na/K-ATPase is a critically and important membrane protein. This pump transports 2 K+ ions into and 3 Na+ions out of the cell against the electrochemical gradient by using the energy of the hydrolysis of 1 ATP molecule per transport cycle. Na+/K+ ATPase has many functions. It creates and maintains the transmembrane Na+ and K+gradients that contribute to the membrane excitability and potential, determining a significant fraction of the cellular metabolic rate via ATP hydrolysis and driving secondary active transport systems coupled to Na+ fluxes. 30–70 % of the cell's ATP is used for this transporter **(Hall *et al.,* 2006).** Furthermore, the Na/K-ATPase is the pharmacological receptor for cardiac glycosides.

In the last decade, many researches demonstrated different functions of the pump. In addition to the classical ion transporting, this membrane protein can also relay extracellular ouabain-binding signalling into the cell through regulation of protein tyrosine phosphorylation. Ouabains signals activate protein kinase (MAPK) signal cascades, activation of phospholipase C (PLC) and inositol triphosphate (IP3) receptor (IP3R) as well as mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production in different intracellular compartments **(Howarth et al., 2012; Morth *et al.,*2007).** The sodium-potassium pump was discovered by Jens Christian Skou - Danish scientist in the 1950s. It was an important step to our understanding of how ions get into and out of cells. Moreover, it has a particular significance for excitable cells such as nervous cells, which depend on this pump for transmitting impulses and responding to stimuli (**Morth *et al.,*2007).**

The aim of our work was to estimate the Na,K-ATPase activity in selected brain structures after streptozotocin in: the: right hemisphere, the left hemisphere, cerebellum and trunk of the brain.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out on 24 male mice of Swiss strain. At the beginning, we determined the level of Na and K, then we calculated the ratio of Na/K which helped to show Na,K-ATPase activity.

The measurements were performed after 48, 72 hours, 8 days and 16 days after streptozotocin injection in single dose – 65 mg/kg b.w in: the: right hemisphere, the left hemisphere, cerebellum and trunk of the brain.

The level of ions was measured in the mixture of supernatant on the EasyLyte Na/K/Cl analyzer. Statistical analysis was performed using analysis of variances ANOVA. Homogoneity of variances was estimated using Wilcoxon signed rank test.

RESULTS

We noticed influence of streptozotocin on Na+/K+ ATPase activity in selected brain structures.

Moreover, we can notice many fluctuations in Na+/K+ ATPase activity. It was probably the result of the body's attempt to adapt to the inject dose of streptozotocin.

Taking into account Na/K ATPase activity there were no significant changes in the right hemisphere but we can notice decrease tendency of this activity (Fig.1). The mean of Na/K ATPase and standard deviation are shown in Tabele1.

Table 1.

Mean and Standard deviation of Na/K ATPase activity in the right hemisphere.

GROUPS AND TIME	MEAN [µMOL/L]	SD
48H		
Control RH	13,54	1,238
Streptozotocin RH	12,73	1,122
72H		
Control RH	12,40	2,756
Streptozotocin RH	9,401	1,935
8D		
Control RH	14,65	2,794
Streptozotocin RH	11,30	2,454
16D		
Control RH	16,48	1,465
Streptozotocin RH	16,79	2,678

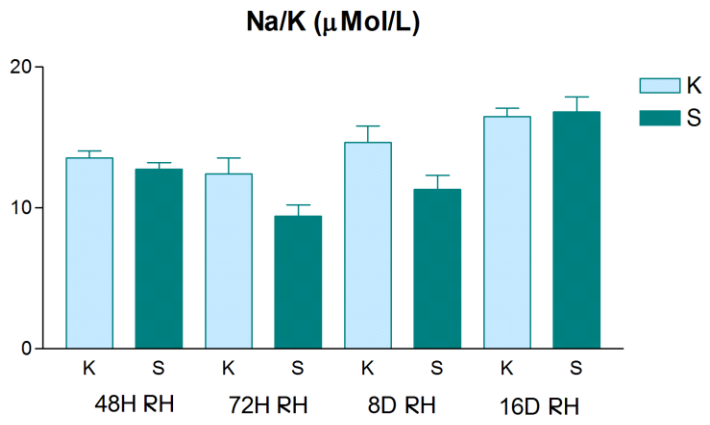


Fig.1.

Na/K-ATPase activity in the right hemisphere.

Taking into account Na/K ATPase activity there were no significant changes in the left hemisphere but we can notice decrease tendency of this activity too (Fig.2). The means of Na/K ATPase and standard deviation are shown in Tabele 2.

Table 1.

Mean and Standard deviation of Na/K ATPase activity in the left hemisphere

GROUPS AND TIME	MEAN [µMOL/L]	SD
48H		
Control LH	17,05	4,935
Streptozotocin LH	11,56	4,952
72H		
Control LH	14,98	4,787
Streptozotocin LH	15,83	5,256
8D		
Control LH	12,08	2,882
Streptozotocin LH	9,792	3,113
16D		
Control LH	18,90	3,780
Streptozotocin LH	15,45	2,836

.

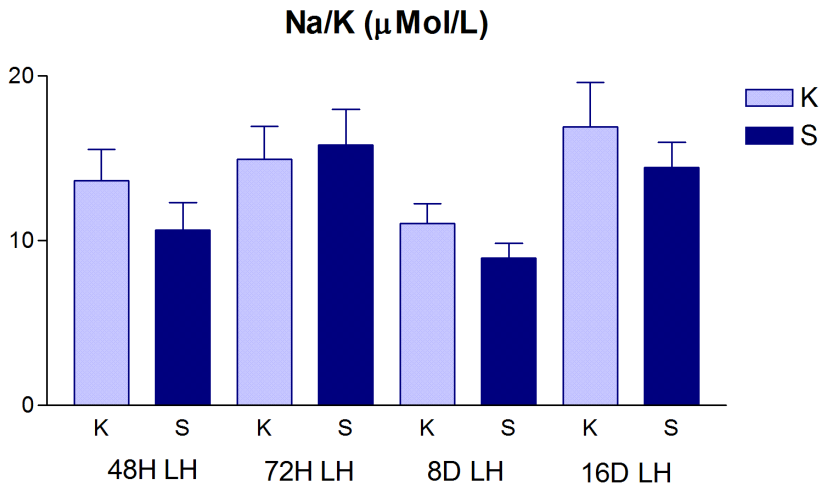


Fig.2. **Na/K-ATPase activity in the left hemisphere.**

Taking into account Na/K ATPase activity there were two significant changes in the cerebellum after 8 days (p=0,0313, r=0,4781) and after 16 days (p=0,0313, r=0,5429). Generally, we can notice decrease tendency of this activity (Fig.3). The means of Na/K ATPase and standard deviation are shown in Tabele 3.

Table 1.

Mean and Standard deviation of Na/K ATPase activity in the cerebellum.

GROUPS AND TIME	MEAN [µMOL/L]	SD
48H		
Control CB	25,20	6,103
Streptozotocin CB	27,51	6,680
72H		
Control CB	25,30	7,926
Streptozotocin CB	22,66	2,651
8D		
Control CB	25,57	5,151
Streptozotocin CB	20,84	5,840
16D		
Control CB	39,59	5,461
Streptozotocin CB	24,71	2,392

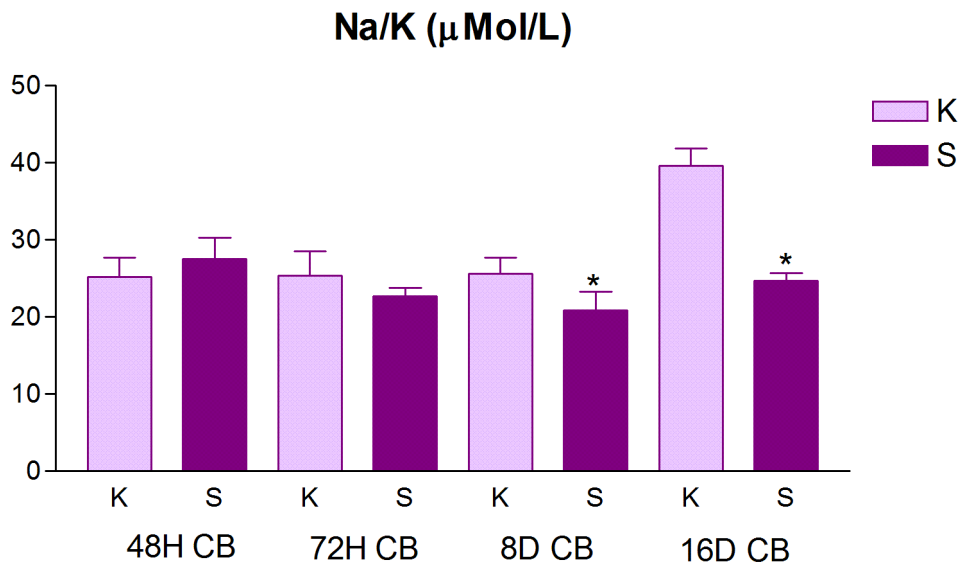


Fig.3.

Na/K-ATPase activity in the cerebellum.

Taking into account Na/K ATPase activity there were no significant changes in the trunk of the brain but we can notice decrease tendency of this activity (Fig.4). The means of Na/K ATPase and standard deviation are shown in Tabele 4.

Table 4.

Mean and Standard deviation of Na/K ATPase activity in the trunk of the brain.

GROUPS AND TIME	MEAN [µMOL/L]	SD
48H		
Control TB	35,90	10,87
Streptozotocin TB	25,43	5,528
72H		
Control TB	22,50	5,090
Streptozotocin TB	20,59	6,551
8D		
Control TB	25,57	5,151
Streptozotocin TB	19,31	5,674
16D		
Control TB	33,03	6,691
Streptozotocin TB	30,33	5,440

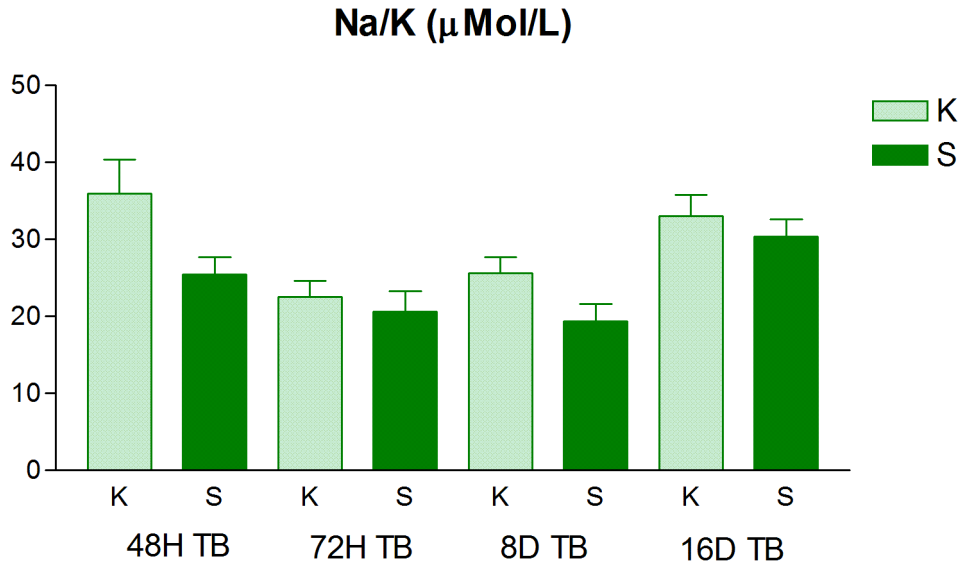


Fig.4.

Na/K-ATPase activity in the trunk of the brain.

DISCUSSION

We know the fundamental role of $K^+$and Na^+ transport in maintaining ionic gradients. This ions regulate cell metabolism and nervous system. Despite of this, our understanding of the regulation of Na/K ATPase remains incomplete.

Many researches on diabetes have based on the neuropathy of nervous system (**Górski *et al.*, 2000).** Moreover, that studies have shown that the NA/K ATPase in this system is reduced **(Flekac *et al.*, 2008).** Glucose utilization have been albo reduced. Glucose decrease is also associated with a reduced myo-inositol concentration in the nerve **(Drzewoski *et al.*, 2008).**

In contrast to many researches about peripherial nervous system, the changes in Na/K ATPase activity in selected brain structures are largely not known.

In order to defend against the damaging effects of free radicals your body has developed protective mechanisms in the form of antioxidant defense systems: non-enzymatic and enzymatic.

The enzyme system is responsible for antioxidant defense. This system is composed of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase **(Fraczek *et al.,* 2005).**
It was found that hyperglycemia promotes the formation of reactive oxygen species **(Mrowicka, 2011).**

Diabetes is associated with an increased level of free radicals and disturbances of the enzymatic antioxidant defense system. Furthermore, these abnormalities lead to a redox imbalance called oxidative stress **(Mrowicka, 2011).** The activity of sodium-potassium pump is impaired by oxidative stress. It is of great importance in the pathogenesis of diabetes. In normal conditions there is a balance between the emerging reactive oxygen species (ROS) and endogenous antioxidant systems. Oxidative stress is a condition characterized by excessive reactive oxygen species. As a result of elevated blood glucose increased occurs the impairment of remove free radicals. The blood vessels are and enhances the oxidative stress. It inhibits the sodium-potassium pump. In addition, the source of reactive oxygen species in diabetes is a mitochondrial respiratory chain **(Giugliano *et al.,* 1996).** It has been shown that increasing glycolysis and the Krebs cycle in response to hyperglycemia leads to a huge increase in the pool of protons, which then cause an increase in proton gradient and consequently there is a formation of free radicals. Sodium potassium pump activity is also reduced by decreasing of energy in cells **(Brownlee, 2001).**
Hyperglycemia also causes an increased conversion of glucose to sorbitol and fructose by the polyol pathway **(Dickinson *et al.,* 2002).** Decreasing ratio of reduced to oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - NADPH / NADP +, and increases the ratio of nicotinamide adenine dinucleotide - NADH / NAD +, which leads to activation of growth cycle of transformations of arachidonic acid, which determines the additional production of free radicals **(Brownlee, 2001).**

The streptozotocin initiated first step of diabetes. It was the reason of starting production of free radicals and occurrenced oxidative stress. In our opinion, it was not enough time to induced full diabetes. We need to continue our experiment. It could be the reason of no significant changes in Na/K ATPase activity.

Although not many significant changes after each time, we noticed decreased tendency in Na/K ATPase activity. Significantly decreased of Na+/K+ ATPase occures in diabetic patients.

CONCLUSIONS

The present study has confirmed other reports decreasing activity of Na/K ATPase. Further studies involving streptozotocin and much time are necessary to clarify the results of the present study.

REFERENCES

BROWNLEE M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, 414: p.813–820.

DICKINSON P.J., CARRINGTON A.L., FROST G.S., BOULTON A.J. 2002. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.,* 2002; 18: p. 260–272

DRZEWOSKI J. 2008. Gliclazide, inflammation and atherosclerosis. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.,* 2008; 7: p. 224–230

EVANS J.L., GOLDFINE I.D., MADDUX B.A., GRODSKY G.M. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and b-cell dysfunction? *Diabetes*, 2003; 52: 1–8

FLEKAC M., SKRHA J., HILGERTOVA J., LACINOVA Z., JAROLIMKOVA M. 2008. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med. Genet.,* 2008; 9: 30

FRACZEK M., KURPISZ M. 2005. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postępy Hig. Med. Dośw.,* 2005; 59: 523–534

GIUGLIANO D., CERIELLO A., PAOLISSO G. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care, 1996; 19: 257–267

GÓRSKI J., KNAPP M., MUSIAŁ W. 2000. Metabolizm substratów energetycznych w mięśniu sercowym. Wpływ niedotlenienia i cukrzycy. Czynniki Ryzyka, 2000; 2–3: 18–23

HALL, JOHN E.; GUYTON, ARTHUR C. 2006. *Textbook of medical physiology*. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders.

HOWARTH C, GLEESON P, ATTWELL D. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012. 32 (7): p. 1222–32.

MORTH JP, PEDERSEN BP, TOUSTRUP-JENSEN MS, SORENSEN TLM, PETERSEN J, ANDERSEN JP, VILSEN B, NISSEN P. 2007. Crystal Structure of the Sodium-Potassium Pump. *Nature* 2007; 450: p. 1043-1049.

YUAN Z, CAI T, TIAN J, IVANOV AV, GIOVANNUCCI DR, XIE Z. 2005. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex "*Molecular Biology of the Cell* 16 (9): p. 4034–45.

THE ACTIVITY OF CATALASE AND CONTENT OF REDUCED GLUTATHIONE IN TESTES OF MICE EXPOSED TO ACRYLAMIDE

Kraska K., Formicki G., Kapusta E., Goc E., Kopańska M.

Acrylamide (ACR) monomer is mutagenic and causes disturbances in male reproductive organs. Acrylamide is used in various industries for example polymer industry, cosmetic, paper and textile industries. It is also used in laboratory gels. Most important is the fact that acrylamide was found in food. Daily intake of acrylamide from foodstuff was estimated in the range of 0.3-0.8 mg/kg bw per day. The International Agency for Research on Cancer classifies acrylamide as 2A, which means that acrylamide is a probable human carcinogen. Glutathione is in a constant state of metabolic turnover because is actively synthesized and degraded. Reduced glutathione enters the oxidation and reduction reactions with electrophilic reagents such as xenobiotics, free radicals, toxins, organic hyperoxides. Catalase is an enzyme catalyzing decomposition of H_20_2.

The aim of our work was to investigate concentration of reduced glutathione and activity of catalase in testes of mice exposed to acrylamide. The research was conducted on SWISS mice 8 week old, weight 26 g. Animals were fed with standard diet and grow in 12/12 light/dark photoperiod. The animals were segregated into two experimental and one control group. Animals of experimental groups were injected intraperitoneally with ACR in the dose of 80 mg/kg. Mice from the control group were injected with physiological saline. The measurements were performed 24, hours and 2 weeks after acrylamide injection.

GSH concentration decreased along with the duration the experiment. The activity of catalase also decreased with duration of the experiment. Significant differences in GSH content occurred after two weeks of ACR injections.

IN VITRO EFFECT OF TAURINE ON RABBIT SPERM MOTILITY

KROČKOVÁ Jiřina, MASSÁNYI Peter, PAÁL Dušan, KOVÁČIK Anton

Slovac University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 94901 Nitra
Email: cipko26@yahoo.com

Abstract
Taurine (2-aminoethane sulphonic acid), a ubiquitous β-amino acid is conditionally essential in man, also it has multiple biological and metabolic functions: is an antioxidant, it conjugates biliary acids, detoxifies some xenobiotics and modulates intracellular calcium levels. Secretion of the taurine takes place also in mammalian reproductive tract, it preserves the motility of the spermatozoa, supports their capacitation, improve the chances of success of fertilization and the early embryonic development. In our study we investigated the effect of taurine on rabbit sperm motility *in vitro*. We used semen of six adult rabbits (New Zealand White rabbits, CVŽV Lužianky, Nitra, Slovakia). Samples were mixed together to create one heterospermic sample. We weighed 10 mg of taurine and dissolved it in 10 mL of saline. The taurine solution was added in various amounts to the semen which were created experimental groups (A, B, C, D, E). The control group (K) was no added taurine. The measurements were performed using the method a Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system – Sperm Vision. Total motile spermatozoa and progressively motile spermatozoa were evaluated at time 0 (immediately after samples preparation), at time 1 (after 2 hours of incubation) and at time 2 (after 24 hours of incubation). The results of our experiments shows that the addition of taurine increase motility and progressive motility of rabbit sperm. With the increase of its concentration and prolonging the period of cultivation the parameters of motility were stimulated almost in all experimental groups.

Key words: rabbit, spermatozoa, taurine, CASA

Introduction

Taurine (2-aminoethane sulphonic acid), a ubiquitous β-amino acid is conditionally essential in man. It is not utilized in protein synthesis but found free or in some simple peptides. Derived from methionine and cysteine metabolism, taurine is known to play a pivotal role in numerous physiological functions (Stapleton et al., 1998). Taurine has multiple biological and metabolic functions: is an antioxidant, it conjugates biliary acids, detoxifies some xenobiotics and modulates intracellular calcium levels. Moreover, taurine plays an important part in osmoregulation, neuromodulation and stabilization of the membranes. Taurine is looked upon as an "essential amino acid" in some particular situations associating inadequate intake or synthesis and major loss of biliary salts. Clinically, taurine has been used with varying degrees of success in the treatment of several pathologies (cardiovascular diseases, cystic fibrosis, alcoholism, retinal degeneration, hepatic disorders). Being found in the secretions of the mammalian reproductive tract, it preserves the motility of the spermatozoa, supports their capacitation, improves the chances of success of fertilization and the early embryonic development. This is why it can be found in some culture media for *in vitro* fertilization (Bidri and Choay, 2003; Guérin and Ménézo, 1995). Intracellular taurine is maintained at high concentrations in a variety of cell types and alteration of cell taurine levels is difficult. The role of taurine within the cell appears to be determined by the cell type. Plasma murine levels are also high, although decreases are observed in response co surgical injury and numerous pathological conditions including cancer and sepsis. Although commonly used as a dietary supplement in the Far East, the potential advantages of dietary taurine supplementation have

not as yet been fully recognized in the Western World (Stapleton et al., 1998). Recent and past studies suggested that taurine might be a pertinent candidate for use as a nutritional supplement to protect against oxidative stress, neurodegenerative diseases or atherosclerosis (Bouckenooghe et al., 2006). Fan et al. (2009) and Yang et al. (2010) reported that male accessory sex glands are able to synthesize taurine through the cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) pathway. Also Li et al. (2006) reported that male genital organs have the function to produce taurine through the CSD pathway, although quantifying the relation of CSD expression to taurine synthesis and the exact functions of taurine in male genital organs still need to be elucidated in future studies. Taurine and hypotaurine have been found in spermatozoa and seminal plasma of numerous species and are known to have beneficial effects on sperm characteristics in mammals. Taurine is considered an essential dietary constituent in cats. Dietary deficiency has been associated with a range of serious clinical disorders. The concentrations of taurine measured in serum samples confirmed that the cats were not deficient in taurine. Significant amounts of taurine and hypotaurine were found in spermatozoa, seminal plasma and epididymal flushing fluid (Buff et al., 2001). Lobo et al. (2000) observed taurine distribution in male rat reproductive organs by immunohistochemical methods. In the testis, taurine was found in Leydig cells, vascular endothelial cells, other interstitial cells and epithelial cells from the intratesticular segments of the rete testis. The possible functional roles for taurine in these cells are discussed. Holmes et al. (1992) investigated taurine, and hypotaurine levels in human sperm and seminal fluid. Sperm hypotaurine content was significantly correlated with sperm morphology, sperm relative forward progression, the percentage of motile sperm, and the total number of sperm in the ejaculate. By contrast, sperm taurine content was negatively correlated with these parameters. Hypotaurine, an antioxidant, may play an important role in protecting sperm from reactive oxygen species. Higher concentrations of taurine in the sperm of infertile men suggest that accelerated oxidation of hypotaurine to taurine may accompany the observed decline in other sperm parameters. Das et al. (2012) investigated the protective effect of taurine against doxorubicin- induced testicular oxidative stress and apoptosis was investigated in rats. Authors found that taurine could effectively prevent nearly all of doxorubicin-induced testicular abnormalities, thereby proving to be an effective cytoprotectant.

Material and methods

In this study semen of six adult rabbits (New Zealand White rabbits, CVŽV Lužianky, Nitra, Slovakia) was evaluated. After sampling, the samples were transported to the laboratory and mixed together to create one heterospermic sample. We weighed 10 mg of taurine and dissolved it in 10 mL of saline. Then the taurine solution was added in various amounts to the semen which were created experimental groups (Table 1). The control group (K) was no added taurine. The measurements were performed using the method a Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system – Sperm Vision (Minitub, Tiefenbach, Germany) equipped with a microscope (Olympus BX 51, Japan). Each sample was placed into Makler Counting Chamber (depth 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Germany). Using the rabbit specific set up the following parameters were evaluated – total motile spermatozoa and progressively motile spermatozoa at time 0 (immediately after samples preparation), at time 1 (after 2 hours of incubation) and at time 2 (after 24 hours of incubation). Incubation between each measurement was carried in conditions 2-5 °C. Obtained data were statistically analyzed with the help of the PC program Excel and a statistics package SAS 9.1 (SAS Institute Inc., USA) using Student`s t-test and Scheffe`s test. Statistical significance was indicated by *p* values of less than 0.05; 0.01 and 0.001.

Table 1

Experimental groups preparation.

Experimental group	Semen (µL)	Taurine solution (µL)	Saline solution (µL)
K	50	-	
A	50	18.75	131.25
B	50	37.5	112.5
C	50	75	75
D	50	112.5	37.5
E	50	150	-

Results

The measurements of the parameters of sperm motility (Fig. 1) at time 0 showed a significant increase in the experimental group C (84.45±4.15%), D (81.68±4.57%) and E (82.83±2.89%)

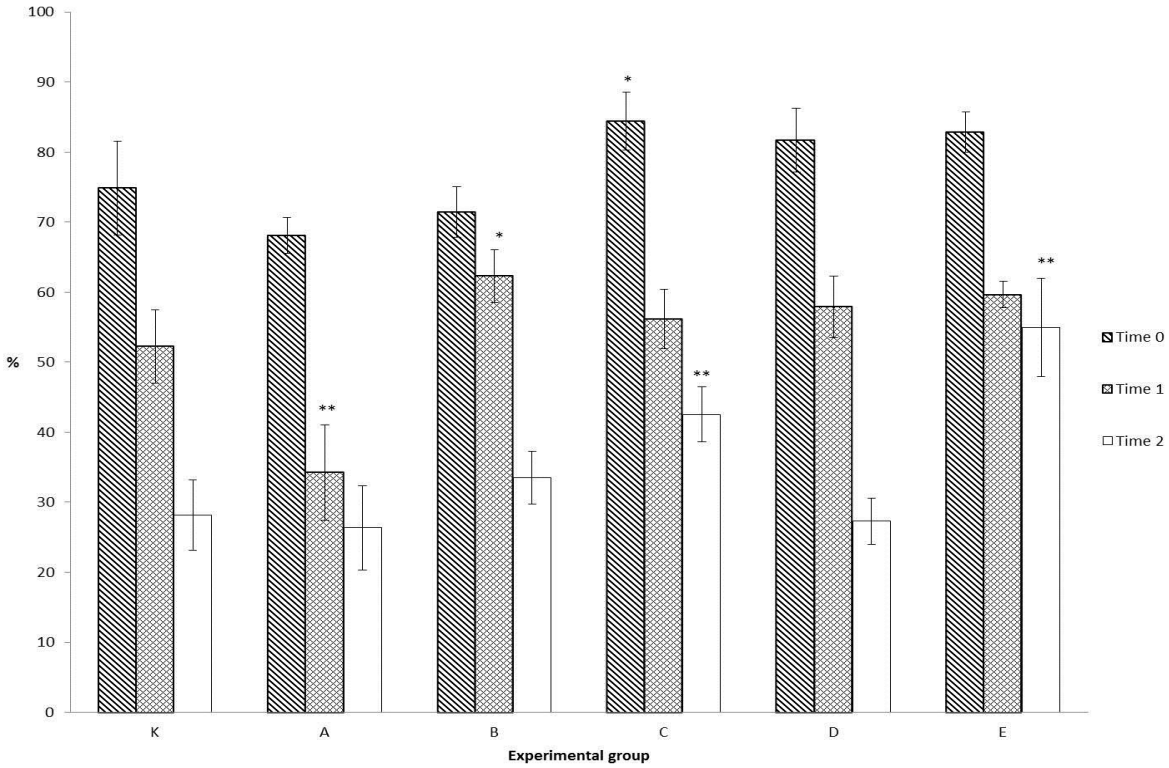


Fig. 1

Sperm motility after taurine addition

Legend: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

with the addition of the highest concentrations of taurine. Significant difference was in the experimental group C ($p < 0.01$) compared with the control group (74.84±6.66%). At the time 1 the motility increased in all experimental groups except for group A (34.23±6.08%). Motility was significantly higher in group B (62.27±3.74%; $p < 0.01$) as compared with the control group (52.25±5.24%). At the time 2 we recorded marked motility increase in the experimental group C (42.53±3.90%; $p < 0.001$) and E (54.95±7.00%; $p < 0.001$) compared to the control group (28.18±5.00%). Progressive motility (Fig. 2) was similar to the motility. At time 0, there was a

significant increase in experimental group C (66.53±5.19%; $p < 0.01$), D (67.48±3.72%; $p < 0.01$) and E (71.27±3.64%; $p < 0.001$) compared with the control group (55.49±8.18%). At the time 1 progressive sperm motility increased in all experimental groups except for group A (13.21±3.78%) compared with the control group (28.72±6.08%). At the time 2 we recorded marked increase of progressive motility in the experimental group C (21.67±4.41%; $p < 0.001$) and E (19.73±5.43%; $p < 0.05$) compared to the control group (12.19±4.25%).

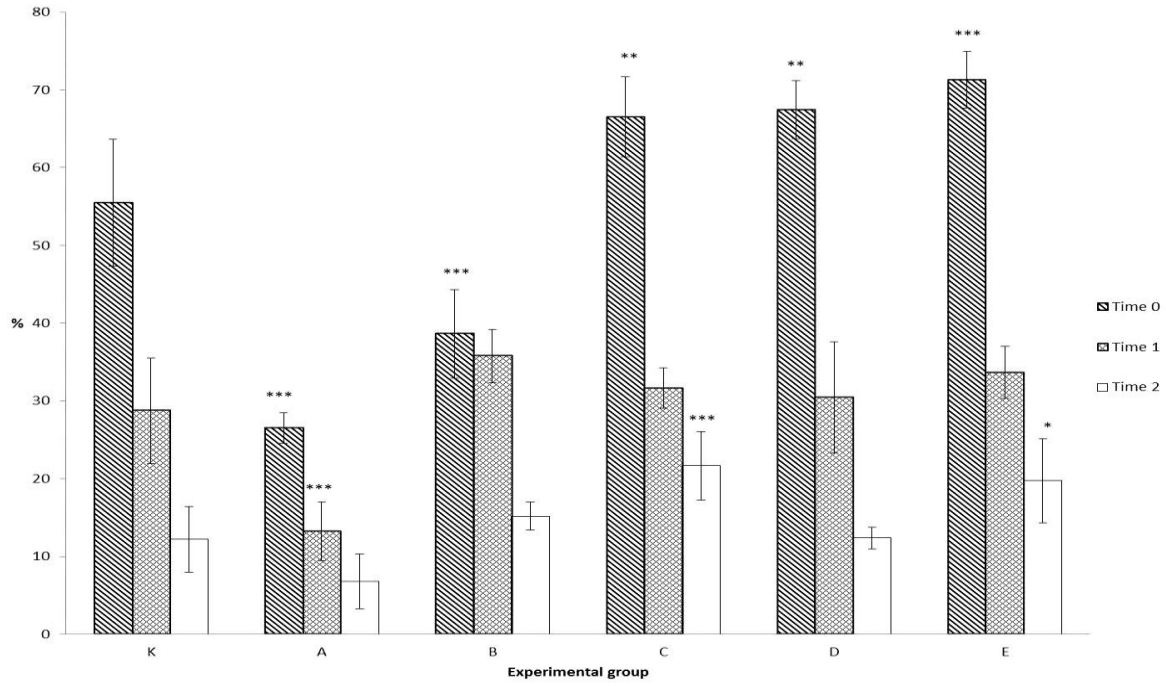


Fig. 2

Progressive sperm motility after taurine addition

Legend: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Discussion

The results of our experiments shows that the addition of taurine increase motility and progressive motility of rabbit sperm. With the increase of its concentration and prolonging the period of cultivation the parameters of motility were stimulated almost in all experimental groups. Taurine and β-alanine (taurine transport inhibitor) were offered in water to male rats of different ages. The motility of spermatozoa was obviously increased by taurine supplement in adult rats. The numbers and motility of spermatozoa, the rate of live spermatozoa were significantly increased by taurine supplement in aged rats (Yang et al., 2010). Chhillar et al. (2012) studied the effects of taurine or trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. The results obtained clearly indicated that supplementation of taurine (50 mM) or trehalose (100 mM) to tris-egg yolk citrate (EYTC) extender prior to cryopreservation improves Karan Fries sperm quality. Martínez-Páramo et al. (2013) evaluated taurine and hypotaurine as potential additives to improve European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm quality after cryopreservation. For cryopreservation, three different extenders were used: control extender (NAM), supplemented with 1mM taurine or supplemented with 1mM hypotaurine, all of them containing 10% Me_2SO as cryoprotectant. To evaluate sperm quality of fresh and thawed sperm, motility (CASA), viability (SYBR Green/propidium iodide), lipid peroxidation (malondialdehyde level), protein oxidation (carbonyl content), glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase activities and DNA fragmentation (comet assay) were quantified. The result demonstrated that 1mM hypotaurine supplemented extender increased total motility (30.1±3.2%), and that 1mM

taurine extender produced higher velocity (18.1±2.6µm/s) and linearity (46.0±4.8%) than the control extender (21.8±3.2%, 15.5±1.3µm/s, 41.8±2.4%, respectively). Cell viability, lipid peroxidation and protein oxidation were not statistically different between treatments. Similar results were obtained for glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities. Only glutathione reductase showed differential activity before and after freezing, increasing its activity in thawed sperm. Regarding the comet assay results, taurine and hypotaurine significantly reduced DNA fragmentation (52.8±0.9% and 51.8±0.9%, respectively) in comparison to the control (55.7±0.8%). Authors reported that extenders supplemented with 1mM taurine and 1mM hypotaurine improved some parameters of sperm quality after thawing, resulting in better motility and lower DNA damage than the control, two very important factors related to fertilization success Alam et al. (2011) treated mice with taurine orally (100. mg/kg. b.wt.) for nine days. Treatment with taurine showed increases sperm count and motility, and decreases the incidence of sperm abnormalities. Das et al. (2009) reported that oral administration of taurine (at a dose of 100 mg/kg body weight for 5 days) to rats was found to be effective in counteracting arsenic-induced oxidative stress, attenuation of testicular damages and amelioration of apoptosis in testicular tissue. Taurine was also found to play similar beneficial role via mitochondrial dependent pathways in arsenic-induced testicular damages leading to apoptotic cell death. Cabrita et al. (2011) analyzed the effect of extender supplementation with taurine on post-thawed sperm motility, viability and DNA integrity of two commercial species, gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Sperm was cryopreserved in ten different extenders containing taurine (1 and 10. mM). Taurine slightly increased the percentage of motile cells and significantly reduced both DNA fragmentation parameters, protecting DNA against strand breaks.

Conclusion

At the end of our experiment, we observed that the addition of small amounts of taurine in rabbit sperm has a stimulating effect on sperm motility. The increasing of taurine concentrations and extension of its period of exposure, taurine has positive effect on sperm motion parameters.

Acknowledgments

We would like to thank Ing. Ondruška from CVŽV Lužianky for providing of samples.

References

Alam, S.S., Hafiz, N.A., Abd El-Rahim, A.H. 2011. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxfine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 143-152.

Bidri, M., Choay, P. 2003. Taurine: A particular aminoacid with multiple functions (Short Survey) [La taurine: Un aminoacide particulier aux fonctions multiples]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 61, 385-391.

Bouckenooghe, T., Remacle, C., Reusens, B. 2006. Is taurine a functional nutrient? (Review). *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9, Issue 6, 728-733.

Buff, S., Donzé, A., Guérin, P., Guillaud, J., Fontbonne, A., Ménézo, Y. Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, 93-95.

Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., Dinis, M.T. 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*, 125, 189-195.

Chhillar, S., Singh, V.K., Kumar, R., Atreja, S.K. 2012. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Animal Reproduction Science*, 135, 1-7.

Das, J., Ghosh, J., Manna, P., Sil, P.C. 2012. Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino Acids*, 42, 1839-1855.

Das, J., Ghosh, J., Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C. 2009. Taurine protects rat testes against $NaAsO_2$-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicology Letters*, 187, 201-210.

Fan, J.J., Zhou, J.L., Li, J.H., Cui, S. 2009. Accessory sex glands of male mice have the ability to synthesize taurinevia the cysteine sulfinate decarboxylase pathway. *Cell Biology International,* 33, 684-689.

Guérin, P., Ménézo, Y. 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote (Cambridge, England)*, 3, 333-343.

Holmes, R.P., Goodman, H.O., Hurst, C.H., Shihabi, Z.K., Jarrow, J.P. 1992. Hypotaurine in male reproduction. In: Lombardini, J.B., Schaffer, S.W., Azuma, J. Taurine. First edit. New York : Plenum Press, 437–441 p.

Li, J.H., Ling, Y.Q., Fan, J.J., Zhang, X.P., Cui, S. 2006. Expression of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) in male reproductive organs of mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 125, 607-613.

Lobo, M.D.V.T., Alonso, F.J.M., Martín Del Río, R. 2000. Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48, 313-320.

Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M.T., Soares, F., Sarasquete, C., Cabrita, E. 2013. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (Dicentrarchus labrax) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 66, 333-338.

Stapleton, P.P., O'Flaherty, L., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J. 1998. Host defense - A role for the amino acid taurine? (Review). *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 22, 42-48.

Yang, J., Wu, G., Feng, Y., Lv, Q., Lin, S., Hu, J. 2010. Effects of taurine on male reproduction in rats of different ages. *J Biomed Sci*., 17, 9.

EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON ACROLEIN-INDUCED OXIDATIVE PROTEIN DAMAGE IN THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISAE*

Magdalena KWOLEK-MIREK, Renata ZADRĄG-TĘCZA*

Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland
*Corresponding author: mkwolek@univ.rzeszow.pl

Abstract
Acrolein is an important environmental and endogenous toxin. It is an electrophile showing high reactivity with biological nucleophiles leading to a decrease in the level of glutathione as well as protein and DNA modification. Our previous results showed that 1-h incubation of both wild-type and Δ*sod1* mutant cells with allyl alcohol (precursor of acrolein) caused concentration-dependent increase in the level of carbonyl groups. The aim of this study was to determine if antioxidants are able to protect proteins from oxidation. We discovered that several thiol antioxidants such as glutathione, *N*-acetylcysteine, cysteine and dithiothreitol can decrease the level of carbonyl groups in yeast cells exposed to acrolein. Similar effect wasn't observed in case of ascorbic acid and Tempo.

Key words: acrolein, allyl alcohol, oxidative stress, protein carbonyls, antioxidant, yeast

Abbreviations: AA, allyl alcohol; ASC, ascorbic acid; CYS, cysteine; DTT, dithiothreitol; GSH, glutathione; NAC, *N*-acetylcysteine; Tempo, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl

Introduction

Acrolein is the simplest, unsaturated aldehyde commonly occurring in the environment. It is formed during incomplete combustion of petrol, coal, wood, cotton and plastic materials. It is a by-product in many branches of the chemical industry and is also a constituent of tobacco smoke. Acrolein can be also formed endogenously as a product of lipid peroxidation, during degradation of threonine and polyamines as well as during activation of cytostatic drugs. Being electrophilic, acrolein shows high reactivity with biological nucleophiles leading to a decrease in the level of glutathione as well as protein and DNA modification **(Stevens and Maier, 2008)**. The studies on the effect of acrolein on cells are carried out using various experimental models. Our team has proposed a simple eukaryotic model for such studies, viz. the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* **(Bilinski *et al.*, 2005)**. A definite advantage of this model is the lack of occurrence of lipid peroxidation, which is the main endogenous source of acrolein. This allows to track acrolein and its metabolites in the cell and better define the toxic and lethal doses for cells.

Our previous results **(Bilinski *et al.*, 2005; Kwolek-Mirek *et al.*, 2009; Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011)** show that the yeast strains defective in antioxidant defense: Cu,Zn-superoxide dismutase (Δ*sod1*), γ-glutamylcysteine ligase (Δ*gsh1*), thioredoxins 1 and 2 (Δ*trx*1Δ*trx2*) and transcription factor Yap1p (Δ*yap1*) are hypersensitive to acrolein which is formed in cells from allyl alcohol. The proposal of replacement of direct introduction of acrolein with its metabolic precursor allyl alcohol has been put forward by our team and allows to eliminate extracellular effects of acrolein resulting from its high reactivity. The data obtained demonstrate that incubation of yeast cells with allyl alcohol causes a range of negative effects: a decrease of glutathione content, a decrease of total antioxidant capacity and an increase of the content of reactive oxygen species. The metabolic activation of allyl alcohol causes also activation and relocation of Yap1p from cytoplasm to the nucleus, which evidences a stress reaction. Other

acrolein effects in a cell include alteration in actin cytoskeleton, morphological changes and disintegration of mitochondria, an increase in the level of thiobarbituric acid-reactive substances (damage of lipids) and an increase in the level of carbonyl groups (damage of proteins). The consequence of that damage was a reduction in metabolic activity, arrested cell cycle and decreased survival of yeast cells (Fig. 1).

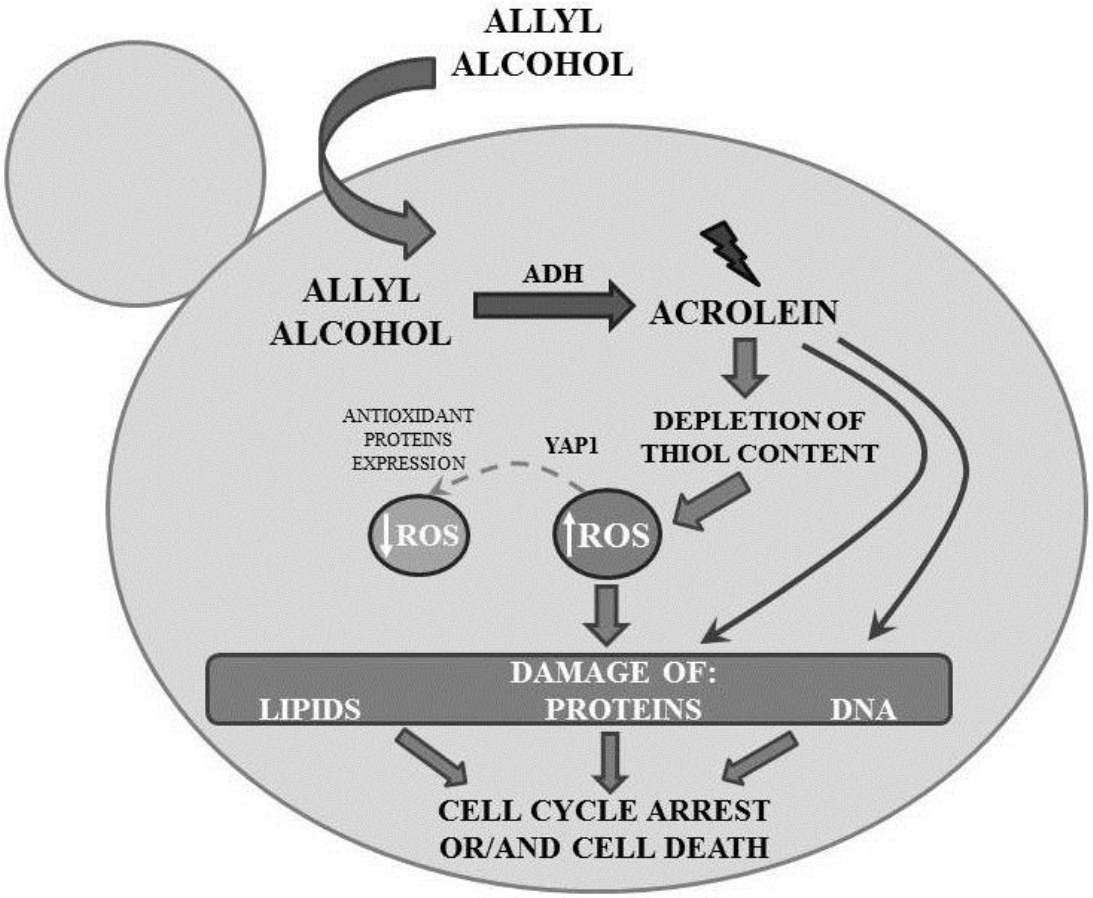


Figure 1.

Mechanisms of acrolein toxicity in yeast cells.

1-h incubation of both wild-type and Δ*sod1* mutant cells with allyl alcohol (precursor of acrolein) causes concentration-dependent increase in the level of oxidative protein damages **(Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011)**. In this study we demonstrate that several thiol antioxidants such as glutathione, *N*-acetylcysteine, cysteine and dithiothreitol can definitely decrease the level of carbonyl groups in yeast cells exposed to acrolein.

Material and methods

Yeast strains and growth conditions

The following yeast strains were used: wild-type SP4 MATα *leu1 arg4* **(Bilinski *et al.*, 1978)**, and Δ*sod1* mutant, isogenic to SP4, MATα *leu1 arg4 sod1::natMX* **(Koziol *et al.*, 2005)**. The yeast was grown in a standard liquid YPD medium (1% yeast extract, 1% yeast bacto-peptone, 2% glucose) on a rotary shaker at 150 rpm, at a temperature 28°C.

Incubation conditions and preparation of cell extracts

Cells from exponential phase culture were centrifuged, washed and suspended in 100 mM phosphate buffer, pH 7, containing 0.1% glucose and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA) with 0.4 mM allyl alcohol and various concentration of antioxidants, viz. 25 mM ASC, 5 mM GSH, 5 mM NAC, 5 mM CYS, 5 mM DTT or 1 mM Tempo at a density of 10^8 cells/ml. After 1 h incubation the cells were centrifuged and washed twice with sterile cold water. The cell extracts were prepared according to the manufacturer's protocols (Cell Biolabs, Inc.). Protein concentration was determined using the Bradford method **(Bradford, 1976)**.

Determination of protein carbonyls

Quantification of carbonyl groups content in the yeast cell extracts was performed using OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay (Cell Biolabs, Inc.) according to the manufacturer's protocols. The fluorescence was measured using a TECAN Infinite 200 microplate reader at λ_{ex} = 480 nm and λ_{em} = 530 nm.

Immunodetection of protein-bound 2,4-dinitrophenylhydrazones in the yeast cell extracts was conducted as described by **Levine *et al.* (1994)** with modification **(Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011)**. The anti-2,4-dinitrophenyl antibody (rabbit, ab6306, Abcam) was used at a 1:20 000 dilution. The secondary antibody (goat anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase, 111 035 003, Jackson Immuno Research) was used at a 1:20 000 dilution.

Results and discussion

Protein oxidation is defined as the covalent modification of a protein, induced either directly by reactive oxygen species (ROS) or indirectly by reaction with secondary by-products of oxidative stress. The most sensitive to damage are: cysteine, methionine, lysine, proline, histidine, tryptophan, phenylalanine, tyrosine and arginine residues of proteins **(Bartosz, 2003; Lushchak, 2006)**. The formation of carbonyl groups in the proteins leads to irreversible damage and loss of their biological activity. The accumulation of this damage in the cell may impair its function and it is associated with aging, several diseases and cell death **(Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman and Levine, 2000; Nystrom, 2005)**.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* a higher level of carbonyl groups occurs in case of growth on fructose as a carbon source **(Semchyshyn *et al.*, 2011)**, and under aerobic condition (aerobic respiration) **(Cabiscol *et al.*, 2000)**. Many compounds such as hydrogen peroxide, menadione **(Cabiscol *et al.*, 2000)**, crotonaldehyde, and acrolein **(Trotter *et al.*, 2006)**, also cause increase of proteins oxidation in the yeast cells.

Our results show that 1-h incubation of both wild-type and Δ*sod1* mutant cells with allyl alcohol causes concentration-dependent increase in the level of carbonyl groups **(Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011)**. In this study we demonstrate that several thiol antioxidants such as 5 mM glutathione, 5 mM *N*-acetylcysteine, 5 mM cysteine and 5 mM dithiothreitol can protect against proteins oxidation caused by 1-h incubation with 0.4 mM allyl alcohol (Fig. 2 and 3). We have observed that the most powerful protective effect in case of cysteine, the level of carbonyl groups reaches control level (in absence of allyl alcohol) (Fig. 2 and 3). 25 mM ascorbate and 1 mM Tempo doesn't have a protective effect (Fig. 2 and 3). The results obtained using both methods (fluorometric and immunoblotting assay) are comparable (Fig. 2 and 3).

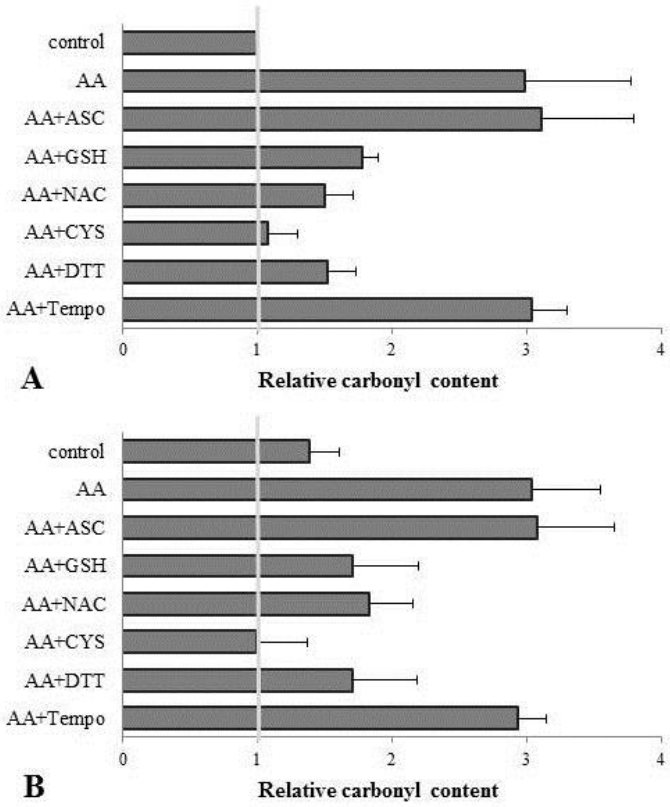


Figure 2.

The effect of antioxidants on the level of carbonyl groups in yeast cells exposed to acrolein. Quantification of carbonyl groups content for wild-type (A) and Δ*sod1* mutant (B) cell extracts was performed using OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay. The fluorescence was measured using a TECAN Infinite 200 microplate reader at λ_{ex} = 480 nm and λ_{em} = 530 nm. Data represent mean ± SD from three independent experiments.

The effect of cellular action of acrolein is the induction of oxidative stress. The major pathway for the detoxification of acrolein in cell is its reaction with glutathione and the formation of GS-acrolein conjugates. Acrolein can reacts not only with glutathione but also with other sulfur-containing compounds such as cysteine, *N*-acetylcysteine, 2-mercaptoethane sulfonate, lipoic acid or 2,6-dithiopurine **(Zhu *et al.*, 2011)**. Acrolein can react also with nitrogen (amino)-containing compounds, naturally occurring polyphenols as well as ascorbic acid **(Zhu *et al.*, 2011)**. When this pathway for the detoxification is exhausted, it occurs the formation of ROS and modification of macromolecules (Fig. 1; **Kwolek-Mirek *et al.*, 2009; Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011)**.

Low molecular weight antioxidants such as GSH, NAC, CYS and DTT, which decrease the level of carbonyl groups in the yeast cells exposed to acrolein (Fig. 2 and 3), can be both effective ROS scavengers and prevent changes in the level of glutathione.

Lack of differences in the level of carbonyl groups in the cells incubated with 0.4 mM allyl alcohol in case of both tested strains (Fig. 2) suggests that this type of protein damages is not responsible for increased sensitivity of Δ*sod1* mutant to acrolein. However, an increased level of carbonyl groups under control condition (absence of allyl alcohol) in case of Δ*sod1* mutant compared to wild-type strain (Fig. 2), confirms the protective effect of Cu,Zn-superoxide dismutase against ROS and proteins oxidation.

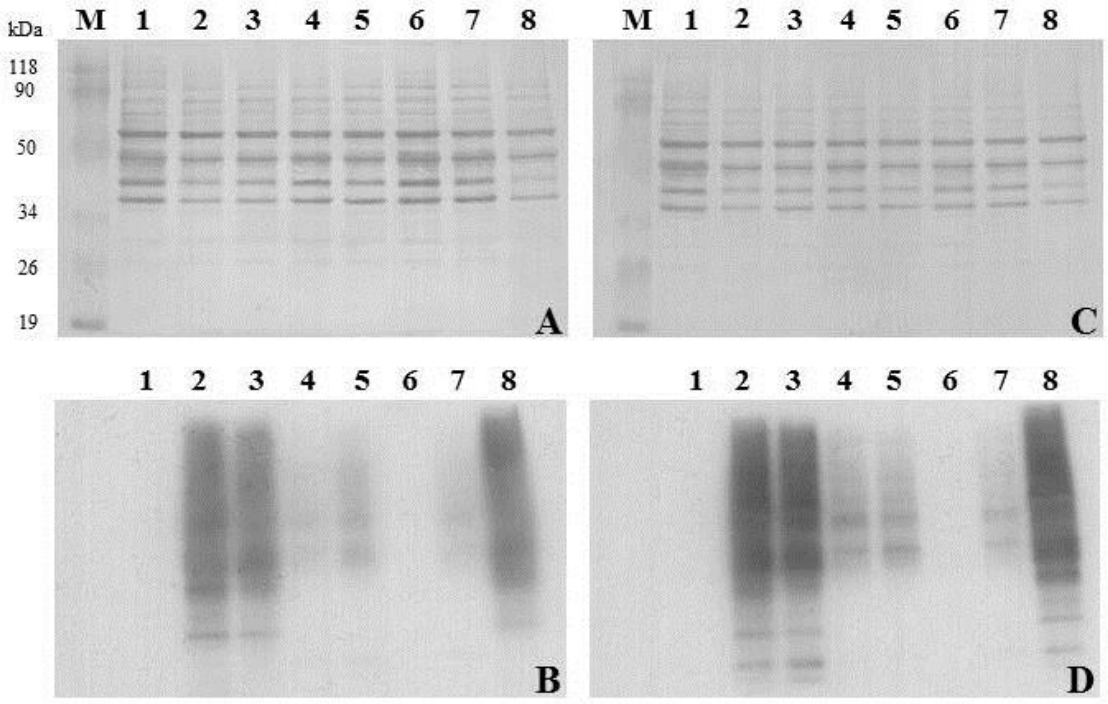


Figure 3.

The effect of antioxidants on the level of carbonyl groups in yeast cells exposed to acrolein. Image A and B presents the results for wild-type, C and D for Δ*sod1* mutant cell extracts. Line M – Prestained Protein Molecular Weight Marker, line 1 – control cells (in absence of allyl alcohol), line 2 – cells incubated with 0.4 mM AA, line 3 – cells incubated with 0.4 mM AA and 25 mM ASC, line 4 – cells incubated with 0.4 mM AA and 5 mM GSH, line 5 – cells incubated with 0.4 mM AA and 5 mM NAC, line 6 – cells incubated with 0.4 mM AA and 5 mM CYS, line 7 – cells incubated with 0.4 mM AA and 5 mM DTT and line 8 – cells incubated with 0.4 mM AA and 1mM Tempo. Image A and B Coomassie Brilliant Blue staining PVDF membranes, C and D Immunoblotting analysis using anty-2,4-dinitrophenyl antibodies. The figure shows representative images recorded during one of the two independent experiments.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Iuventus Plus No. 0289/IP1/2011/71 of Polish Ministry of Science and Higher Education.

References

BARTOSZ, G. 2003. The other face of oxygen, Published by the PWN.

BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272(33), 20313-16.

BILINSKI, T., KWOLEK, M., SAS, E., KRYNICKA, M., KOZIOL, S., OWSIAK-TELEON, A., KRZEPILKO, A., BARTOSZ, G. 2005. A novel test identifying genes involved in aldehyde detoxification in the yeast. Increased sensitivity of superoxide-deficient yeast to aldehydes and their metabolic precursors. *Biofactors*, 24, 59-65.

BILINSKI, T., LUKASZKIEWICZ, J., SLEDZIEWSKI, A. 1978. Demonstration of anaerobic catalase synthesis in the cz1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm*, 83, 1225-33.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

CABISCOL, E., PIULATS, E., ECHAVE, P. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275, 27393-98.

KOZIOL, S., ZAGULSKI, M., BILINSKI, T., BARTOSZ, G. 2005. Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic Res*, 39, 365-71.

KWOLEK-MIREK, M., BARTOSZ, G. 2011. Biochemical and cellular effects of acrolein toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Xenobiotics. Environmental exposure, toxicity and physiological response*, Published by the University of Rzeszow, 271-81.

KWOLEK-MIREK, M., BEDNARSKA S., BARTOSZ, G., BILINSKI, T. 2009. Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Toxicol*, 25(4), 363-78.

LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., SHACTER, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 233, 346-57.

LUSHCHAK, V.I. 2006. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. *Acta Biochim Pol*, 53, 679-84.

NYSTROM, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24, 1311-17.

SEMCHYSHYN, H.M., LOZINSKA, L.M., MIEDZOBRODZKI, J., LUSHCHAK, V.I. 2011. Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Carbohydrate Research*, 346, 933-38.

STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L. 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Science*, 899, 191-208.

STEVENS, J.F., MAIER, C.S. 2008. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res*, 52, 7-25.

TROTTER, E.W., COLLINSON, E.J., DAWES, I.W., GRANT, C.M. 2006. Old yellow enzymes protect against toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 4885-92.

ZHU, Q., SUN, Z., JIANG, Y., CHEN, F., WANG, M. 2011. Acrolein scavengers: reactivity, mechanism and impact on health. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1375-90.

Effect of α-tocopherol *in ovo* supplementation on chick embryo development

Lis M.W., Cichy A., Trzeciak K.B., Pawlak K., Dżugan M. and Niedziółka J.W.

[1]Department of Poultry and Fur Animal Breeding and Animal Hygiene, University of Agriculture in Krakow, Poland
[2]Department of Chemistry and Food Toxicology, University of Rzeszów, Rzeszów, Poland

α-tocopherol (vitamin E) effects on the reproductive processes, participating in the synthesis of sex hormones. Vitamin E is not synthesised by intestinal microflora of birds and its deficiency can disturb of pre- and post- hatch chicken development. However, in the available literature there is lack of data concerning the effect of high dose of α-tocopherol on embryogenesis and endocrine glands in avian species.

In 4th day of incubation (E4) the fertilized chicken eggs were injected with 0, 0.5 and 5 mg/egg of α-tocopherol, dissolved in 50 µl peanut oil. In E14 and E20 the blood samples and gonads, heart and liver were collected from 20 embryos of each group. The organs were weighted and frozen in -80°C to further histological measures while blood samples were centrifuged and blood plasma was stored in -20°C for the determination of testosterone, progesterone and estradiol by RIA.
The results of experiment indicate that α-tocopherol *in ovo* supplementation on the E4 decreased embryo mortality between E4-E6 but increased during hatching period ($P \leq 0.05$). Moreover there was disturbed in sex ratio which ranged as 7 males to 3 females. Simultaneously, supplementation α-tocopherol at a dose of 0.5 and 5 mg per egg decreased about 30% of estradiol concentration in the blood female embryos in E20.

Concluded, *in ovo* supplementation of α-tocopherol can disturb embryogenesis of chicken embryos.

APPLICATION OF THERMOGRAPHY IN COWS PRODUCTIVITY EVALUATION: THE CORRELATION BETWEEN THE BODY TEMPERATURE AND MILK YIELD

Lisowska-Lis A[1]., Lis M.W.[2]

[1]Polytechnical Institute, State Higher Vocational School in Tarnow, ul. Mickiewicza 8, 33-100 Tarnow. Poland.
lisowskalis@pwsztar.edu.pl
[2]Department of Poultry and Fur Animal Breeding and Animal Hygiene, Agricultural University of Kraków. al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Poland.
rzlis@cyf-kr.edu.pl

The aim of this work was an attempt of using thermography measurements to monitoring cows productivity. The changes in the temperature of the cow's udder were analysed. The temperature measurements as thermograms for the individual cows (HF breed) were taken before and after the milking, in the milking parlor (364 thermograms). Measurements were taken by InfraCAM SD (FLIR system) camera. Thermograms were analysed using the FLIR-QUICK-REPORT program. Thermal analysis results for every individual were compared with the stage of lactation, the number of lactation and the milk yield (productivity). Statistical analysis were done using SIGMASTAT 3.5 (two-way ANOVA, Tukey test).

Results of experiment showed no differences between the temperature (measured for the cows` udder) at the beginning and at the end of milking. Temperature at the beginning was T= 37,8±0,59°C, and at the end of milking was T= 37,8±0,59°C ($P>0,05$). Temperature did not depend on the cows age (number of lactation), ($P>0,05$). It was observed correlation between temperature and month of lactation($P\leq0,05$). The highest temperature was observed in the second part of the first month of lactation. The high temperature of the cows udder was observed since the second part of the first month till the seventh month of the lactation. Cows productivity for the first month of lactation was between 30 – 45 l milk per day, and in the seventh month it ranged between 15 – 40 l. At the seventh month of lactation the rapid decrease of the temperature was observed. The lower temperature of the udder was typical for the cows between 7^{th} up to 12^{th} month of lactation (or more). It is probably correlated with the natural decrease of cows productivity at that stage of the lactation.

CONCLUSION

The obtained results confirms possible application of thermography as an noninvasive method of assessing the productivity of farm animals.

CONCENTRATION OF MALONDIALDEHYDE (MDA) IN MEAT PRODUCTS DURING PRODUCTION

Lukáčová Anetta, Tvrdá Eva, Golian Jozef*
Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic;
*anettlukacova@gmail.com Phone: +421 37 6415826.

Abstract
Lipid oxidation is one of the major causes of quality deterioration in meat. Lipid oxidation is induced by oxy- and/or lipid free radical generation and results in the generation of toxic compounds such as the malondialdehyde and cholesterol oxidation products. The aim of this study was carried out to determine concentrations of malondialdehyde (MDA) in meat products (salami "Malokarpatska" and "Lovecka", frankfurter, Selected ham) during technological process. This study, we have demonstrated the presence of malondialdehyde a deleterious by product of lipid peroxidation in meat products. The results unequivocally showed that adding spice to homogenized samples significantly increased the formation of lipid-peroxidation products. Also in all samples were increased concentrations of MDA in beef as raw materials. The beef samples had higher MDA than the pork, pork bacon and leathery emulsion samples.

Key words: Malondialdehyde, meat, meat products, lipid oxidation

Introduction

Food lipids are principally triacylglycerides, phospoholipids and sterolsfound naturally in most biological materials consumed as food and added as functional ingredients in many processed foods. Lipids contribute many desirable qualities to foods, including attributes of texture, structure, mouth feel, flavour and colour. However, lipids are also one of the most chemically unstable food components and will readily undergo free-radical chain reactions that only deteriorate the lipids but also: produce oxidative fragments, some of which are volatile and are perceived as the off-flavors of rancidity **(German, 1999)**. Lipid oxidation is one of the major causes of quality deterioration in meat **(Jo and Ahn, 1998)**. Lipid oxidation is often responsible for quality loss via formation of rancid flavour and is affected by the duration and temperature of storage of meat. Lipid oxidation is the major form of deterioration in stored muscle foods. Oxidative reactions in meat are the most important factor in quality losses, including flavour, texture, nutritive value and colour. Lipid oxidation is induced by oxy- and/or lipid free radical generation and results in the generation of toxic compounds such as the malondialdehyde and cholesterol oxidation products **(Sun et al., 2002)**. Over the past 30 y, there has been accumulating evidence that lipid oxidation can play an important role in the processes of atherogenesis and carcinogenesis **(Li et al., 2010)**. **Fogelman et al. (1980)** reported that malondialdehyde an obligate product of the oxidation of arachidonic acid by lipoxygenase pathways. Dietary and environmental chemicals such as N-nitrosamines and their precursors (nitrate and nitrite) and malondialdehyde involved in the etiology of cancer and other related disease conditions are part of the challenges still facing the world today **(Okafor et al., 2007)**. One of the most important preservation methods for meat and meat products since compared with other methods is freezing, it leads to a minimal loss of quality during long-term storage **(Soyer et al., 2010)**.

Since the development of oxidation process in meat is important, related to its quality and consumer´s acceptance, the aim of this study was carried out to determine concentrations of malondialdehyde (MDA) in meat products (salami "Malokarpatska" and Lovecka", frankfurter, Selected ham) during technological process.

Materials and method

Sampling was done so that the samples were representative that to have the average composition and characteristics of the goods from which they were collected. The collection sample during the manufacturing process was carried out under the following scheme. ***"Lovecka salami"*** - was collected basic raw (beef, pork and pork bacon); than samples mixed meat with additives (salt,

Sodium Ascorbate, Erythorbic acid, ground black pepper, sugar, garlic, starter culture) and finally the actual sample of the finished product after heat treatment, cooling to 25°C and drying in climates with aw = 0.95. **"*Malokarpatska salami*"** – was collected basic raw (beef, pork and pork bacon); than samples mixed meat with additives (salt, spice extracts, Sodium Nitrite, highlighter flavor, */Lactobacillus/*) and finally the actual sample of the finished product after heat treatment. ***Frankfurter*** was collected basic raw (beef, pork, pork bacon, leathery emulsion), subsequent collection of homogenised meat product with additives (salt, ground sweet and hot peppers, polyphosphates and Ascorbic acid) and finally of sample with the finish product after smoked and free cooling to a core temperature of max. 4ºC. ***Selected ham*** was collected basic raw (pork thigh), than samples of homogenized meat with additives salt, Sodium Nitrite, sodium pyrophosphate, sodium tripolyphosphate, Ascorbic acid) and finish product after heat treatment. The randomly selected 115 samples of raw materials respectively finished products were prepared for analysis.

TBARS Analysis

Spectrophotometric Method : The meat homogenate (1 mL) prepared as above was taken into a disposable test tube (10 mL), and 2 mL of the TBA (Thiobarbituric acid, Sigma Aldrich) -TCA (Trichloroacetic acid, Sigma Aldrich) solution were added. The mixture was vortexed, heated in a 90°C water bath for 15 min, cooled in ice for 10 min and 4°C, and centrifuged at 2 000 g for 15 min. The absorbance of supernatant was measured at 531 nm with a microsample spectrophotometer. Values of TBARS were converted on mg MDA concentration on 1 kg meat.

Statistical analysis

We set the basic variation statistical values (arithmetic mean, standard deviation, coefficient of variation, standard error mean, minimum value, median and maximum value). One-way analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett´s multiple comparison test were used for statistical evaluations. The level of significance was set at A ($P<0.001$); B ($P<0.01$); C ($P<0.05$).

Results and Discussion

The development of lipid oxidation in Salami "Lovecka" is presented in Table 1. In raw materials the amounts of malondialdehyde (MDA) increase in beef meat 0.708±0.114 mg/kg meat. **Popova et al. (2009)** indicated, the amounts of MDA at beef meat during chilled storage were in the range 0.17-0.32 mg/kg meat and reached 0.64 mg/kg meat on the 90^{th} day. Significant influence ($P<0.05$) on the development of oxidation was between beef meat and pork bacon. The highest levels were measured when raw materials homogenized and added additives (salt, Sodium Ascorbate, Erythorbic acid, ground black pepper, sugar, garlic, starter culture) 0.717±0.152 mg/kg meat, while finish product contained levels 0.641 mg/kg meat. Similar situation as salami "Lovecka" was in the salami "Malokarpatska" and it is presented in Table 2. From raw materials contained the highest concentration of MDA (0.683±0.091 mg/kg meat) beef meat. **Okafor (2005, 2007)** express, that fresh beef contained non-detectable amounts of MDA even after exposure to air for 6 – 8 h. The different concentrations of this relevant lipid peroxidation product (MDA) in these analysed samples indicate the different degrees of their deterioration (rancidity). These variations in concentration may be a consequence of differences in the methods of handling, storage conditions, age and source of the samples. After blending homogenized samples with additives was concentration of MDA (0.824 mg/kg meat) increased. **Li et al., (2010)** indicated that the malondialdehyde content in the cooked burger was significantly decreased by 71% with the addition of the spice mix (1.79±0.17 µmol/250 g meat). The effects of all processing steps, including raw products, add additives, process heat treatment, storage, on the quality of lipids in the final commodity are considerable **(German, 1999).** The MDA values in finish product in salami "Lovecká" was in the range from 0.360 to 0.740 mg/kg meat and in finish product in salami "Malokarpatská" was in the range from 0.430 to 0.880 mg/kg meat. We found statistically significant differences ($P<0.05$) in the concentration of MDA between pork bacon and homogenized samples in the salami "Malokarpatská". Significantly higher concentrations of MDA are found in the pork bacon and itself finished product "Malokarpatska" salami.

Table 1

The extent of lipid oxidation (mg MDA) in *salami "Lovecka"* during technological processing

	Salami "Lovecka"					
	Beef	Pork	Pork bacon	homogenized samples	Sample before smoked	Finish product
$\bar{x}$	0.708^{A}	0.530	0.492^{A}	0.717	0.650	0.641
SD	0.114	0.221	0.143	0.152	0.101	0.103
CV	16.04	41.60	29.14	21.15	15.54	15.98
SEM	0.0328	0.0636	0.0414	0.0438	0.0292	0.02955
MIN	0.510	0.190	0.320	0.510	0.0410	0.360
Median	0.700	0.460	0.460	0.720	0.670	0.655
MAX	0.980	0.810	0.780	0.950	0.750	0.740

Legend: $\bar{x}$ - mean SD – standard deviation, CV(%) – coefficient of variation, MIN – minimum value, MAX – maximum value, ^{A}P<0.05

Table 2

The extent of l lipid oxidation (mg MDA) in *salami "Malokarpatska"* during technological processing

	Salami "Malokarpatska"					
	Beef	Pork	Pork bacon	homogenized samples	Sample before smoked	Finish product
$\bar{x}$	0.683	0.513	0.468^{AB}	0.824^{A}	0.724	0.711^{B}
SD	0.091	0.235	0.170	0.280	0.194	0.147
CV	13.45	45.79	36.36	33.97	26.73	20.62
SEM	0.027	0.068	0.049	0.081	0.056	0.042
MIN	0.550	0.190	0.320	0.360	0.360	0.430
Median	0.710	0.435	0.385	0.780	0.715	0.745
MAX	0.850	0.810	0.810	1.250	1.150	0.880

Legend: $\bar{x}$ - mean SD – standard deviation, CV(%) – coefficient of variation, MIN – minimum value, MAX – maximum value, AP<0.05;BP<0.01

In Table 3 is presented the development of MDA in the frankfurter during technological processing. There was a significant increase of MDA in beef meat 0.673 mg/kg meat and in sample before smoked frankfurter 0.592 mg/kg meat. Levels of MDA were decreased in pork bacon 0.468±0.170 mg/kg meat, leathery emulsion 0.477±0.162 mg/kg meat and finish product 0.448±0.110 mg/kg meat. There were statistically different between beef and finish product (P<0.05) and between sample before smoked and itself finish product frankfurter (P<0.01).

Table 3

The extent of lipid oxidation (mg MDA) in the *frankfurter* during technological processing

	Frankfurter					
	Beef	Pork	Pork bacon	Leathery emulsion	Sample before smoked	Finish product
$\bar{x}$	0.673^{B}	0.516	0.468	0.477	0.592^{A}	0.448^{AB}
SD	0.168	0.193	0.170	0.162	0.105	0.110
CV	24.93	37.37	36.33	33.96	17.78	24.35
SEM	0.049	0.056	0.049	0.047	0.030	0.032
MIN	0.360	0.250	0.310	0.230	0.360	0.270
Median	0.660	0.450	0.385	0.485	0.630	0.435
MAX	0.980	0.790	0.810	0.710	0.740	0.580

Legend: $\bar{x}$ - mean SD – standard deviation, CV(%) – coefficient of variation, MIN – minimum value, MAX – maximum value, ^{A}P<0.05;^{B}P<0.01

The highest levels of MDA were measured in the pork thigh as raw materials the production of selected ham (0.529±0.216 mg/kg meat)

Table 4

The extent of lipid oxidation (mg MDA) in *selected ham* during technological processing

	Selected ham			
	Pork thigh	Homogenized sample	Sample after heat treatment	Finish product
$\bar{x}$	0.529	0.524	0.493	0.473
SD	0.216	0.230	0.210	0.108
CV	40.89	43.81	42.60	22.78
SEM	0.063	0.066	0.061	0.031
MIN	0.270	0.240	0.210	0.310
Median	0.430	0.420	0.435	0.450
MAX	0.820	0.850	0.790	0.710

Legend: $\bar{x}$ - mean SD – standard deviation, CV (%) – coefficient of variation, MIN – minimum value, MAX – maximum value,

Lipid oxidation involves changes in meat colour which is one of the important quality parameters as well as is affected by the duration and temperature of storage meat **(Gatellier et al., 2005).** In order to reduce the negative impact of the oxidation on the meat quality retailers use vacuum packaging. On the other hand through vacuum packing meat continues its maturation process in a safe manner, becomes tender, with a better taste and excellent colour **(Smet et al., 2005)**.

This study, we have demonstrated the presence of malondialdehyde a deleterious by product of lipid peroxidation in meat products. The results unequivocally showed that adding spice to homogenized samples significantly increased the formation of lipid-oxidation products. **Li et al. (2010)** reported that inhibition of the formation of malondialdehyde by antioxidants during the cooking of meat products may result in reduces concentrations of malondialdehyde in plasma and urine. Also in all samples were increased concentrations of MDA in beef as raw materials. The beef samples had higher MDA than the pork, pork bacon and leathery emulsion samples. The different concentrations of this relevant lipids peroxidation product (that is MDA) in this products and samples indicate the different degrees of their deterioration. Although, the Acceptable Daily Intake (ADI) for malondialdehyde has not been set or its concentration that can cause toxicity established, increased levels of lipid peroxidation products have been associated with a variety of chronic diseases in both humans and animal model systems.

Acknowledgements

This study was supported with VEGA grant No. 1/2417/05 and KEGA 049SPU-4/2011 of the Slovak Ministry of Education.

References:

Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J., Edwards, P. 1980. malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholestryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,* 1980, 77: 2214-8

Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., Renerre, M. 2005. Effect of finishing mode on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *In: Meat Science,* 2005, 69(1), 175-186

German, B. J., .1999. Food Processing and Lipid oxidation. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Volume 459, pp 23-50

Jo, C., Ahn, D. U.. 1998. Fluorometric Analysis of 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Turkey. *In: Poultry Science*.1998, 77: 475-480

Li, Z., Henning, S. M., Zhang, Y., Zerlin, A:, Li, L., Gao, K. 2010. Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma and urine malondialdehyde concentrations. *In: The American Journal of Clinical Nutrition.* 2010, 91:1180

Okafor, P. N., Nwosu, O., Chukwu, J., Agbayi, j., Maduagwu, E. 2007. Occurrence of malondialdehyde and N-nitrosamines and their precursors in some Nigerian ice cremas, yogurts, meat and fish species. *In: African Journal of Biochemistry research*. 2007, 1: 1-5

Okofar, P. N., Nwaogbo, E. 2005. Determination of nitrate, nitrite and N-nitrosamines, cyanide and ascorbic acid content of meat products marketed in Nigeria. *In: African Journal of Biochemistry research.* 2005. 4 (10):1105-1108

Popova T., Marinova P., Vasileva V., Gorinov Y., Lidji K. 2009. Oxidative changes in lipids and proteins in beef during storage. *In: Archiva Zootechnica*. 2009, 12:3, 30-38

Smet, K., Raes, K., Huyghebaert, G., Haak, L., Arnoust, S., 2005. Influence of the feed enriched with natural antioxidants on the oxidative stability of frozen broiler meat. *In: Proc. 51-st ICoMST,* Baltimore, Maryland, USA, 7-12 August 2005. Section 4, F.18, p. 134

Soyer, A., Ozalp, B., Dalmis, U., Bilgin, V. 2010. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *In: Food chemistry*. 2010, 125: 1025-1030

Sun, Q., Senecal, A., Chinachoti, P., Faustman, C. 2002. Effects of water activity on lipid oxidation and protein solubility in freeze dried beef during storage. *In: Journal of Food Science.* 2002, 67:2512-6

THE EFFECT OF AN *IN VITRO* EXPOSURE TO OCTYLPHENOL ON BOVINE SPERMATOZOA

Jana Lukacova, Eva Tvrda, Norbert Lukac

Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences,
Department of Animal Physiology, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic

Abstract

Octylphenol (OP) is an endocrine disruptor, that can affect male reproductive system and induce reproductive abnormalities, such as a structural alterations of testes, epididymis and prostate, a lower of spermatozoa count and motility. The aim of the present study was to investigate the dose- and time-dependent effect of octylphenol (1, 10, 100 and 200 μg/mL) dissolved in 1% ethanol on the spermatozoa motility during several time periods (0 h, 2 h, 4 h and 6 h) and superoxide formation after 6 h of *in vitro* cultivation. The spermatozoa motility was determined by CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system using the Sperm Vision^{TM} program. The following parameters were evaluated: percentage of motile spermatozoa (motility > 5 μm/s) and percentage of progressive motile spermatozoa (motility > 20 μm/s). The nitroblue-tetrazolium (NBT) test was used to assess the intracellular superoxide production.

The results from CASA system showed the decreased spermatozoa motility in all experimental groups with the addition of OP during all time periods. Significant differences (P<0.001 and P<0.05) between the control groups and the experimental groups were recorded. The NBT test revealed that at the dose 1 μg/mL occurred the slightly decrease of superoxide production compared to the control group. Conversely, the higher doses 10, 100 and 200 μg/mL of OP increased intracellular superoxide production in the bovine spermatozoa. Significant differences (P<0.05 and P<0.001) were observed between the groups C and D containing the highest doses of OP in comparison to the control group.

In conclusion, the results from our *in vitro* experiments confirm that the high doses of octylphenol have the negative effect on bovine spermatozoa motility and can generate the increased intracellular superoxide production causing oxidative stress.

Keywords: endocrine disruption, octylphenol, spermatozoa motility, CASA system, NBT test

Introduction and Literature survey

Alkylphenols (APs) and their metabolites are lipophilic substances exerting apparent estrogenic action in *in vitro* and *in vivo* testing system. With the widespread industrial use of alkylphenols, these are disseminated in the environment with sewage sludge. Alkylphenols can accumulate in vivo, at least in fish (*Shiraishi et al*, 1989). Domestic animals and humas are likely to exposed via the food chain.

Octylphenol (OP) is a ubiquitous chemical in the environment. Octylphenol is an alkylphenol that is an important intermediate in the production of a number of commercial materials. The major use of OP is for the production of alkylphenol ethoxylates (APEs), a class of nonionic surfactants with a wide range of applications (*White et al*, 1994; *Pocar et al*, 2003). APEs are commonly found in industrial processing and in household and institutional cleaning products (*Ying et al*, 2002; *Qian et al*, 2006).

Exposure to OP is matter of concern because it is both estrogenic and toxic to cells (*Blake et al*, 2004; *Calafat et al*, 2008).

4-*tert*-octylphenol can affect invertebrates, amphibians and fish, possibly by endocrine disrupters through an estrogen mediated mode of action, with some evidence of thyroidal activity in amphibians (*ECETOC*, 2009, *Evans et al*, 2011).

4-tert-octylphenol accumulation was observed in liver, muscle and plasma up to 12 h whereas in testis 18 h post administration (*Madsen et al*, 2006).

OP is more persistent than its parent compounds and can mimic naturally produced estrogen by interacting with estrogen receptors (*Blake and Ashiru*, 1997).

OP is the most potent estrogenic alkylphenol i*n vitro* and displaying approximately 1/1000 the extragenicity of the potent estrogen 17β-estradiol (E_2) (*White et al*, 1994).

In male, OP can act as a „xenoestrogen" to disrupt testicular development and fertility (*Hossaini et al*, 2001). OP can reduce the size and weight of the rat testis (*Kim et al*, 2004; *Bian et al*, 2006; *Chen et al*, 2006), epididymis, and prostate (*Chen et al*, 2006), can decrease sperm count of rats (*Bian et al*, 2006; *Herath et al*, 2004) and rams (S*weeney et al*, 2007), can lower daily sperm production (*Vom Saal and Hughes*, 2005; *Bian et al*, 2006) and spermatozoa motility of rats (*Bian et al*, 2006; *Gregory et al*, 2009).

Octylphenol can generate reactive oxygen species (ROS) which are cytotoxic agents that lead to significant oxidative damage by attacking biomolecules such as membrane lipids and DNA in cells (*Kabuto et al*, 2003). When ROS are generated in living systems, a wide variety of antioxidants have a role to reduce the effects of oxidative stress. Antioxidants neutralize ROS by donating one of their own electrons, ending the electron-"stealing" reaction. They act as scavengers, helping to prevent cell and tissue damage that could lead to cellular damage and disease (*Halliwell*, 1996). But, when the excessive production of ROS for any reason, the oxidative damage occurs in the cells. Many environmental contaminants reported to disrupt the prooxidant/antioxidant balance of cells by inducing oxidative stress (*Ho et al*, 1998). One of these contaminants is OP that caused tissue injury in the liver, kidneys, brain, and other organs by leading to formation of ROS (*Bindhumol et al*, 2003; *Kabuto et al*, 2004; *Chitra et al*, 2003). Octylphenol can also cause oxidative stres and damage rat testes (*Aydogan et al*, 2010).

OP can cause apoptosis of testicular germ cells (*Zhou* e*t al*, 2001; *Kim et al*, 2004) and Sertoli cells (*Qian et al*, 2006).

The objective of this *in vitro* study was to investigate the effect of various concentrations of octylphenol dissolved in 1% ethanol during several time periods (0 h, 2 h, 4 h and 6 h) on the motility and the intracellular superoxide production in the bovine spermatozoa.

Material and methods

Semen samples

Bovine semen samples were obtained from 10 adult breeding bulls (Slovak Biological Services, Nitra, Slovak Republic). The samples had to accomplish the basic criteria given for the corresponding breed. After collecting the samples were stored in the laboratory at room temperature (22-25°C). Each sample was diluted in physiological saline solution (PS) (sodium chloride 0.9% w/v, Bieffe Medital, Italia), using a dilution ratio of 1:40, depending on the original spermatozoa concentration.

In vitro culture

Spermatozoa were incubated with various concentrations of octylphenol (4-OP; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dissolved in 1% ethanol (Sigma-Aldrich, Bratislava, Slovakia) (group A – 1; B – 10; C – 100; D – 200 µg/mL of OP). The control spermatozoa group was cultured with physiological saline solution. The positive control group was cultured with 1% ethanol. Spermatozoa were cultivated in the laboratory at room temperature (22-25°C). The control group (medium without OP) was compared to the experimental groups (exposed to different concentrations of OP).

Computer-assisted semen analysis (CASA)

The motility analysis was carried out using a CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) system – SpermVision™ program (MiniTűb, Tiefenbach, Germany) with the Olympus BX 51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at cultivation times 0 h, 2 h, 4 h and 6 h. Each sample was placed into the Makler Counting Chamber (deph 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Izrael) and the following parameters were evaluated: percentage of motile spermatozoa (motility > 5 µm/s; MOT) and percentage of progressive motile spermatozoa (motility > 20 µm/s; PROG). This study was performed

in ten replicates at each concentration (n = 10). 1000-1500 spermatozoa cells were analyzed in each sample.

Nitroblue-tetrazolium (NBT) test

The intracellular formation of superoxide radical was observed by the nitroblue-tetrazolium (NBT) test (*Esfandiari et al*, 2003). This assay is conducted by counting the cells containing blue NBT formazan deposits, which are formed by reduction of the membrane permeable, water-soluble, yellow-colored, nitroblue tetrazolium chloride (2,2´-bis(4-Nitrophenyl)-5,5´-diphenyl-3,3´-(3,3´-dimethoxy-4,4´-diphenylene)ditetrazolium chloride; Sigma, St. Louis, USA) and superoxide radical. Formazan can be measured spectrophotometrically at a measuring wavelenght of 570 nm as reference by a microplate ELISA reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, Finland). The data were expressed in percentage of control (i.e. optical density of formazan from cells not exposed to octylphenol). Results from the analysis were collected during four repeated experiments at each concentration (*Tvrdá et al*, 2013).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 3.02 program (GraphPad Software Incorporated, San Diego, California, USA). Descriptive statistical characteristics (mean, minimum, maximum, standard deviation and coefficient of variation) were evaluated. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett´s multiple comparison test were used for statistical evaluations. The level of significance was set at *** (P<0.001); ** (P<0.01) and * (P<0.05).

Results and discussion

Octylphenol is an environmental contaminant, that can induce male reproductive abnormalities, such as a reduction of the size and weight of testis, epididymis and prostate, lower daily sperm production and count or a decrease spermatozoa motility.

Evaluation of the percentage of spermatozoa motility showed slightly decreased values in all experimental groups with addition of octylphenol dissolved in 1% ethanol compared to the control group during time 0 h of *in vitro* cultivation. Medium with 1% ethanol (positive control group) didn´t significantly (P>0.05) influenced the spermatozoa motility during all time periods. In this time, the lowest spermatozoa motility and significant differences were recorded in the groups B, C and D (P<0.001) with the doses of OP (10 μg/mL; 100 μg/mL; 200 μg/mL) in comparison with the control group (84.02 ± 6.95%; 83.91 ± 9.96% and 82.00 ± 10.10% versus 93.62 ± 3.39%). The results are shown in the Table 1 and Figure 2.

The decreased spermatozoa motility was also found in all doses of OP in comparison with the control group after 2 h of cultivation and significant differences were observed between all experimental groups (P<0.001) compared to the control group. The lowest spermatozoa motility was detected at the dose 200 μg/mL of OP (69.12 ± 9.65%).

All doses of OP decreased the average spermatozoa motility also after 4 h, but significant differences (P<0.001) were found only between the group D and the control group.

After 6 h of *in vitro* cultivation a decrease of motility in all experimental groups in comparison to the control group was found. A significant decrease of spermatozoa motility (P<0.05 and P<0.001) was found in the groups B, C and D.

Table 1: Bovine spermatozoa motility (MOT; %) exposed to OP dissolved in 1% ethanol in various time periods

Groups	Control	Positive control	1 A	10 B	100 C	200 D
	µg/mL of OP					
Time 0						
x	93.62	92.00	92.36	84.02***	83.91***	82.00***
minimum	83.33	85.75	83.33	69.76	61.90	60.00
maximum	100.0	97.72	100.0	96.00	96.15	97.43
S.D.	3.39	3.25	3.38	6.95	9.96	10.10
CV (%)	3.62	3.58	3.66	8.27	11.87	12.32
Time 2						
x	87.05	83.36	80.60***	75.36***	72.94***	69.12***
minimum	70.76	69.23	57.89	56.66	46.15	42.85
maximum	98.27	94.91	93.22	94.85	91.46	89.18
S.D.	6.39	7.38	7.64	10.83	12.44	9.65
CV (%)	7.33	8.85	9.47	14.37	17.06	13.95
Time 4						
x	78.84	76.74	76.84	74.89	70.24	63.60***
minimum	67.39	50.00	54.16	60.00	41.17	43.24
maximum	93.75	95.74	88.88	92.98	89.65	89.74
S.D.	5.63	12.67	6.84	8.63	12.81	10.85
CV (%)	7.14	16.51	8.90	11.52	17.73	17.06
Time 6						
x	74.87	71.18	72.90	68.22*	65.59***	59.68***
minimum	64.86	56.00	55.55	51.42	39.17	34.48
maximum	88.23	87.05	88.46	87.09	88.88	78.46
S.D.	5.48	10.48	8.30	10.89	13.04	12.30
CV (%)	7.32	14.73	11.38	15.97	19.88	10.61

Legend: x – mean, SD – standard deviation, CV (%) – coefficient of variation
***=$P<0.001$; **=$P<0.01$; *=$P<0.05$

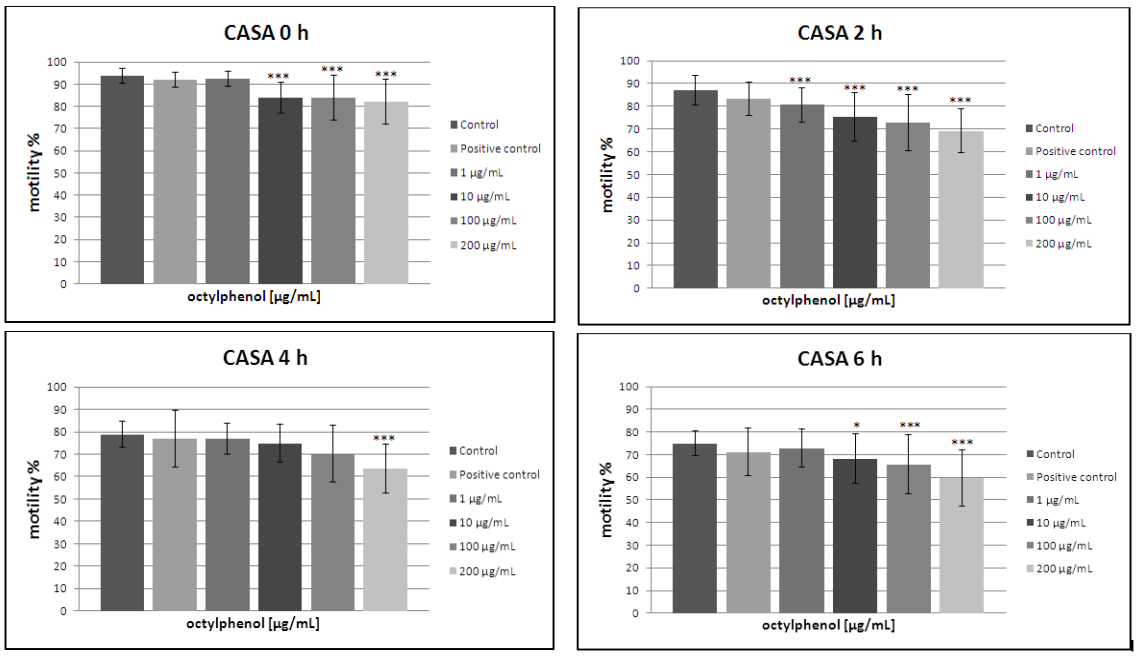


*Figure 1: Effect of various concentrations of octylphenol dissolved in 1% ethanol on bovine spermatozoa motility (%) at 0, 2, 4 and 6 h of in vitro cultivation. The level of significance was set at ***$P<0.001$; **$P<0.01$; *$P<0.05$.*

An identical decrease of spermatozoa motility was detected also for the percentage of progressive motile spermatozoa in all time periods. The results are shown in the Table 2 and Figure 2.

Table 2: Bovine progressive spermatozoa motility (PROG; %) exposed to OP dissolved in 1% ethanol in various time periods

Groups	Control	Positive control	1 A	10 B	100 C	200 D
	µg/mL of OP					
Time 0						
x	92.42	89.61	90.98	81.55***	80.68***	79.86***
minimum	81.31	76.56	75.86	63.82	50.00	59.45
maximum	98.88	95.65	96.96	94.00	93.10	93.54
S.D.	3.57	4.97	4.36	8.22	11.78	9.77
CV (%)	3.86	5.56	4.80	10.08	14.60	12.24
Time 2						
x	85.45	81.04	79.03***	73.54***	71.54***	67.75***
minimum	70.46	64.70	57.33	50.00	46.05	42.25
maximum	96.66	91.13	91.66	91.83	89.83	89.18
S.D.	6.28	6.95	7.78	13.53	11.98	10.04
CV (%)	7.36	8.57	9.85	18.40	16.74	14.82
Time 4						
x	76.14	74.72	75.36	71.22	68.77	61.41***
minimum	59.09	50.00	50.20	59.00	41.00	40.54
maximum	91.30	92.30	88.58	88.61	88.23	87.50
S.D.	6.14	12.49	7.67	7.27	12.24	10.84
CV (%)	8.06	16.72	10.18	10.22	17.30	17.66
Time 6						
x	71.36	70.47	69.35	65.24***	63.61***	58.03***
minimum	59.09	44.61	54.54	44.44	34.14	34.408
maximum	84.55	85.00	83.33	80.00	85.00	77.71
S.D.	6.42	10.17	8.07	11.08	14.76	12.21
CV (%)	9.82	14.02	10.18	13.95	14.42	9.51

Legend: x – mean, SD – standard deviation, CV (%) – coefficient of variation
*** =P<0.001; ** =P<0.01; * =P<0.05

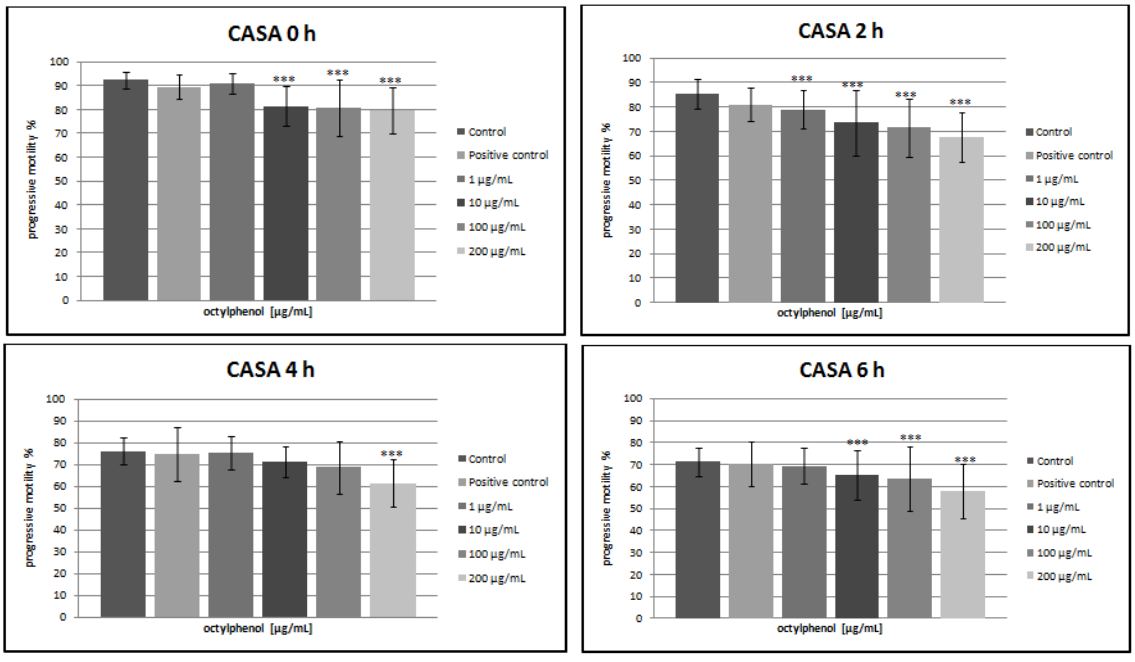


*Figure 2: Effect of various concentrations of octylphenol dissolved in 1% ethanol on bovine progressive spermatozoa motility (%) at 0, 2, 4 and 6 h of in vitro cultivation. The level of significance was set at *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$.*

Many *in vivo* and *in vitro* studies suggest that octylphenol induces abnormities in male reproductive system. The data obtained from our study indicate, that octylphenol has also a negative *in vitro* inhibitory effect on spermatozoa motility during short-term cultivation. Our results showed a decreased spermatozoa motility in all concentrations of OP (1, 10, 100 and 200 µg/mL) dissolved during all time periods. The similar results reached a study by *Bian et al.* (2006), that demonstrated the toxic effect of various concentrations of 4-tert-octylphenol (50, 150 and 450 mg/kg/d) on testicular functions of rats and found out, that the size and weight of the testis, epididymis and prostate were reduced in all the three dosages. The dose of 150 mg/kg/d of OP significantly lowered sperm motility, raising the dose to 450 mg/kg/d also significantly decreased testicular sperm count and daily sperm production.

Gregory et al. (2009) evaluated the effects of chronic exposure to OP on male reproduction and recorded a significant decrease in body weight in the 125 mg/kg group after 60 day of treatment. Total percent sperm motility was significantly lower in rats exposed to the intermediate dose (50 mg/kg of body weight).

Sweeney et al. (2007) determined if maternal exposure to octylphenol pre- and/or postnatally influenced FSH concentrations and semen quantity and quality in postpubertal rams. They found out, that the exposure to OP from birth to weaning increased the number of morphologically abnormal sperm cells in the ejaculates of these rams.

*Herath et al. (*2004) also confirmed that OP can reduce sperm counts resulting from lowered plasma testosterone in male rats just after puberty.

Vom Saal et al. (1998) found that mice exposed to OP experienced significantly lower daily sperm production.

Blake and Boockfor (1997) demonstrated that chronic administration of 4-tert-octylphenol (OP) to adult male rats resulted in lower levels of LH, FSH, prolactin and testosterone, and proposed that OP inhibited the secretion of reproductive hormones by mimicking estrogen. The same authors also established that chronic administration of 80 mg/kg OP caused shrinkage of the testis. Male accessory sex organs and spermatogenesis were disrupted, spermatozoa deformities were observed (*Boockfor and Blake*, 1996).

A study of *Kim et al.* (2004) looked at the effects of OP on the testicular development of prepubertal rats and showed that OP is able to reduce the size and function of the male reproductive organs due to increased apoptosis of testicular germ cells and the decreased biosynthesis of testosterone.

Raychoudhury et al. (1999) observed, that octylphenol is directly toxic to cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells and suggested that this toxic effect in Sertoli cells is exerted through Ca(2+)- independent apoptosis.

The NBT test revealed after 6 h of *in vitro* cultivation with observed endocrine disruptor that the doses 10, 100 and 200 µg/mL of OP increased intracellular superoxide production in the bovine spermatozoa (Figure 3). However, significant differences ($P<0.05$ and $P<0.001$) were found out only between groups C and D containing the highest doses of OP in comparison to the control group. At the dose 1 µg/mL we recorded slightly decrease of superoxide production compared to the control group.

Aydogan et al. (2010) demonstrated that OP at dose 25 mg/kg/day orally administered to rats three times a week for 45 days can generate reactive oxygen species that cause oxidative damage in testes of Wistar rats.

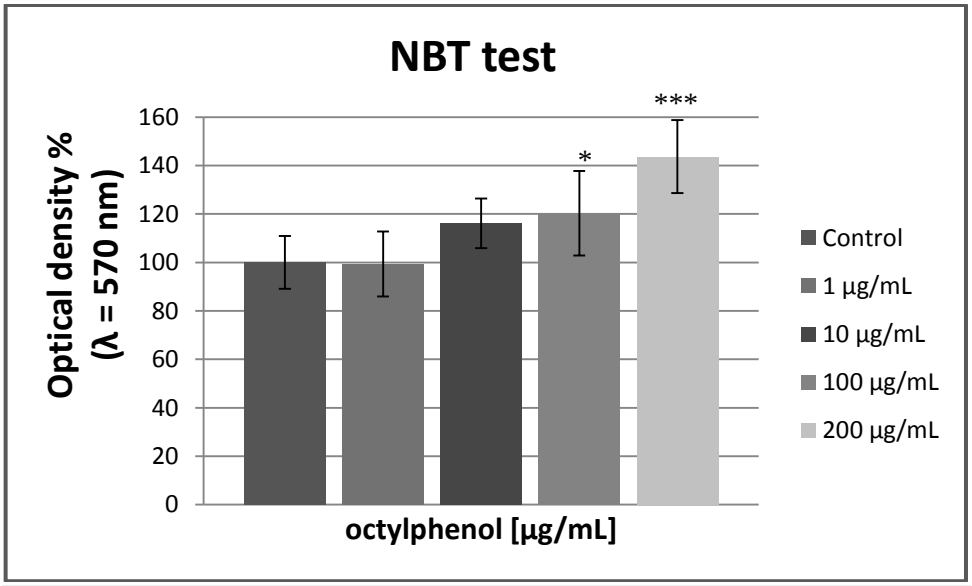


Figure 3: Effect of various doses of octylphenol on the superoxide production at 6 h. Each bar represents the mean (±SD) optical density as the percentage of control group, which represent 100 %. The level of significance was set at $^{***}P<0.001$; $^{**}P<0.01$; $^{*}P<0.05$.

Conclusion

The present data show that some endocrine disruptors may markedly affect the health and reproduction of animals or human. Octylphenol is one of these chemicals that can disrupt testicular development and ultimately reduce male fertility. The results obtained from our *in vitro* study confirm that the higher concentrations of octylphenol (100 and 200 µg/mL) have the toxic effect on spermatozoa motility during short-term cultivation. Octylphenol in these higher doses is also able to increase intracellular superoxide production causing oxidative stress.

Acknowledgments: This work was supported by the Scientific Agency of the Slovak Republic VEGA No. 1/0532/11.

References

Aydogan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D. (2010): Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. Drug and chemical toxicology, 33. 193-203.

Bian, Q., Qian, J., Xu, L., Chen, J., Song, L., Wang, X. (2006): The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 44. 1355-1361.

Bindhumol, V., Chitra, K.C., Mathur, P.P. (2003): Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. Toxicology, 188. 117–124.

Blake, C. A., ASshiru, O. A. (1997): Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 216. 446-451.

Blake, C. A., Boockfor, F. R. (1996): Exposure to the environmental pollutant octylphenol causes sperm deformities and shrinkage of the testes and male accessory sex organs. Molecular Biology of the Cell, 7. 7-11.

Blake, C. A., Boockfor, F. R., Nair-Menon, J. U.,Millette, C. F., Raychoudhury, S. S., McCoy, G. L. (2004): Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. Reproductive toxicology, 18. 43-51.

Boockfor, F. R., Blake, C. A. (1997): Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. Biology of reproduction, 57. 267-277.

Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., Needham, L. L. (2008): Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-*tertiary*-Octylphenol: 2003–2004. Environmental Health Perspectives, 116. 39-44.

ECETOC: Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects, (2009): Technical report No. 206, 1-137.

Esfandiari, N., Sharma, R. K., Saleh, R. A., Thomas, A. J. Jr., Agarwal, A. (2003): Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. Journal of Andrology, 24. 862-870.

Evans, R., Kortenkamp, A., Martin, O., McKinlay, R., Orton, F., Rosivatz, E. (2011): State of the Art Assesment of Endocrine Disrupters 2nd Interim Report, 135.

Gregory, M., Lacroix, A., Haddad, S., Devine, P., Charbonneau, M., Tardif, R., Krishan, K., Cooke, G. M., Schrader, T., Cyr, D. G. (2009): Effects of chronic exposure to octylphenol on the male rat reproductive system. Journal of toxicology and environmental health. Part A, 72. 1553-1560.

Halliwell, B. (1996): Antioxidants in human health and disease. Annual Review of Nutrition, 16. 33–50.

Herath, C.B., Jin, W., Watanabe, G., Arai, K., Suzuki, A.K., TAYA, K. (2004): Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. Endocrine, 25. 163-172.

Ho, Y.S., Magnenat, J.-L., Gargano, M., Cao, J.(1998): The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. Environmental Health Perspectives, 106. 1219–1228.

Hossaini, A., Dalgaard, M.,Vinggaard, A. M., Frandsen, H., Larsen, J. J. (2001): In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. Reproductive toxicology, 15. 537-543.

Chen, B., Duan, J. C., Mai, B. X., Luo, X. J., Yang, Q. S., Sheng, G. Y., Fu, J. M. (2006): Distribution of alkylphenols in the Pearl River Delta and adjacent northern South China Sea, China. Chemosphere, 63. 652-661.

Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, PP. (2003): Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. Toxicology, 185. 119-27.

Kim, S. K., Lee, H. J., Yang, H., Kim, H. S., Yoon, Y. D. (2004): Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. Archives of andrology, 50. 427-441.

Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori. T. (2003): Effects of bisphenol A on the active oxygen species in mouse tissues. Environmental Research, 93. 31–35.

Kabuto, H., Amakawa, M., Shishibori. T. (2004): Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. Life Science. 74. 2931–2940.

Madsen, L.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006): Oral single pulse exposure of flounder Platichthys flesus to 4-tert-octylphenol: Relations between tissue levels and estrogenic effects. Marine environmental research, 61. 352-362.

Pocar, P., Augustin, R., Gandolfi, F., Fisher, B. (2003): Toxic effects of in vitro exposure to p-tert-octylphenol on bovine oocyte maturation and developmental competence. Biology of reproduction, 69. 462-468.

Qian, J., Bian, Q., Cui, L., Chen, J., Song, L., Wang, X. (2006): Octylphenol induces apoptosis in cultured rat Sertoli cells. Toxicology letters, 166. 178-186.

Raychoudhury, S., Blake, C., Millette, C. (1999): Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertolli cells. Toxicology and applied pharmacology, 157. 192-202.

Shiraishi, H., Carter, D.S., Hites, R.A. (1989): Identification and determination of tert-alkylphenols in carp from the Trenton Channel of the Detroit River, Michigan, USA. Biomedical and environmental mass spectrometry, 18. 478-483.

Sweeney, T., Fox, J., Robertson, L., Kelly, G., Duffy, P., Lolergan, P., O'Doherty, J., Roche, J.F., Evans, N.P. (2007): Postnatal exposure to octylphenol decreases semen quality in the adult ram. Theriogenology, 67. 1068-75.

Tvrdá, E., Lukáč, N., Lukáčová, J., Kňažická, Z., Massányi, P. (2013): Stimulating and protective effects of vitamin E on bovine spermatozoa. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2. 1386-1395.

vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayar, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Welshons, W.V. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. Toxicology *and* Industrial Health, 14. 239-260.

vom Saal, F.S., Hughes, C. (2005): An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. Environmental Health Perspectives, 113. 926-933.

White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135. 175-182.
Ying, G. G., Williams, B., Kookana, R. (2002): Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. Environment international, 28. 215-226.
Zhou, X. C., Wei, P., Hu, Z. Y., Gao, F., Zhou, R. J., Liu, Y. X. (2001): Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. Acta *Pharmacologica* Sinica, 22. 1028-1033.

DIAGNOSTICS OF *TOXOPLASMA GONDII* IN MILK SAMPLES OF SHEEP FROM EASTERN SLOVAKIA

Lenka LUPTÁKOVÁ[1], Eva PETROVOVÁ [2], Ľubica ŠŤAVOVÁ[1]*

[1]University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Department of Biology and Genetics, Komenského 73, 041 81 Kosice, Slovakia
[2]University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Department of Anatomy, Histology and Physiology, Komenského 73, 041 81 Kosice, Slovakia
* MVDr. Lenka Luptáková, PhD, luptakova.l@gmail.com

Abstract
The paper presents the results of examination of 62 sheep from flocks of eastern Slovakia for the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies by complement fixation test. Thirteen samples were found to be positive at the titre of 1:64, 10 were positive at 1:128 and two at 1:256 dilution. Subsequently, DNA was isolated from blood samples of these animals. PCR analysis with specific primers was then used in search for *T. gondii* DNA. In PCR analysis, 5 of 25 (20%) samples tested positive.

Key words: milk, real time PCR, sheep, *Toxoplasma gondii*

Introduction

Toxoplasmosis is one of the most common parasitic zoonoses of mammals and birds transmissible to humans. The agent of the disease is *Toxoplasma gondii (T. gondii)*, the definitive hosts of which are the representatives of the family F e l i d a e, infected with oocysts from the environment and with tachyzoites and bradyzoites from intermediate hosts. Intermediate hosts are all vertebrates including man (Frenkel, 2000). It is a panthropic cosmopolite, a facultative heteroxenic coccidium. Sheep were in fact the first mammals in which congenital toxoplasmosis were proven with abortions, dead-born fetuses and frequent manifestations of infection including infertility. The first case of manifest toxoplasmosis in sheep with symptoms of encephalomyelitis and tachycardia was described by Olafson and Monlux. Sheep play a significant role in the economy of many countries since they are important source of meat and milk products. Toxoplasmosis is the major parasitic disease affecting sheep. It is important for veterinary medicine, animal science and public health since it causes reproductive and economic losses in the herd, as well as damaging human health due to consumption of contaminated meat and milk, which can facilitate zoonotic transmission (Camossi et al., 2011).

Material and methods

Samples: A total of 50 milk samples of adult sheep were examined by real time PCR. Sheep originated from farm located 30 km of Kosice in eastern Slovakia. In the farm proper sanitary conditions were respected and sheep were regularly pastured on grassland where they could contamined with *T. gondii*.
Molecular diagnostics: Examination was carried out on samples of sheep milk.
Isolation of DNA: DNA was isolated from 50 milk samples by commercially available kit (DNA-sorb-B, Amplisens, Russia). DNA was isolated according to the manufacturer´s protocol and stored at -20 °C for futher examination.
Detection of DNA by real time PCR: Amplification of the isolated DNA was carried out by the real time PCR with SYBR green as a detection system from the *T. gondii* gene region TGR1E, repeated in the genome 30-35 times, using the specific primers TGR1E-1 and TGR1E-2 (Cristina et al., 1991). Cloned *T. gondii* TGR gene (GenExpress, Germany) diluted to 10^4-10^9 was used for the calibration curve. In each reaction, a melting analysis (comparison of the melting temperature (Tm) of PCR products) was determined to differentiate specific and non-specific PCR products. The reaction volume was 25 µl, which contained commercial FastStart Universal SYBR Green Master (Roche,

Germany) and 0.2 μM primers (TGR1-1 and TGR1E-2). Real-time PCR was completed using a thermocycler Line GeneK with the software Line GeneK Fluorescent Quantitative Detection system (BIOER Technology, China). After incubation at 50°C for 2 minutes and initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 40 amplification cycles were performed (95°C for 15 s, 60°C for 1 minute). Melting analysis was carried out at temperatures ranging from 60°C to 95°C, in which the temperature was gradually increased by 0.5°C and the period of measurement at individual steps was 15 s. Every PCR run included a control without DNA (containing the reaction mix alone and nuclease-free water).

Results

Using quantitative real-time PCR the presence of *T. gondii* DNA was detected and the number of copies quantified in the 50 milk samples of sheep. Using real-time PCR, *T. gondii* DNA was detected and quantified in 5 samples of milk. Standards with the known dilution of *Toxoplasma* DNA were used to determine the detection limit of a modified real-time PCR and to create a calibration curve that ranged from 10^9-10^4 copies of *Toxoplasma* DNA. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.998. As SYBR Green a fluorescent dye, was used as a detection system, a melting analysis was a part of the real-time PCR to distinguish between specific and non-specific products. During the melting analysis, the melting temperature (Tm) of a positive control and positive samples was 84°C. In quantifying the examined samples within a 40-cycle protocol for the real-time PCR, the number of copies detected in the positive samples ranged from 1.1 x10^2 to 1.30 x10^5 (Table 1).

Table 1

The number of DNA copies in positive samples

sample	DNA copies	C_t value
Sample1	**1.1 x 10^2**	**19,50**
Sample 5	**1.3 x 10^5**	**18,72**
Sample 23	**5.7 x 10^4**	**19,37**

Discussion

Consumption of raw food, especially among immunocompromised persons and pregnant women, poses a potential threat to public health. The milk of sheep and goats represent risk factors as they are consumed raw (Spisak at al., 2010).

Consumption of unpasteurized goat, sheep or cow milk or its products represents a risk because tachyzoites, the stage most likely present in milk are thought to be immediately destroyed by the gastric juice (Dubey, 1998). However, evidence indicates that the part of ingested tachyzoites is not destroyed by gastric juice and it can cause infection (Cook et al., 2000). Toxoplasmosis transmission by unpasteurized or inadequately processed milk or fresh cheese, important food sources in rural areas, can be a significant means of contamination by this agent (Hiramoto et al., 2001)

In the period of 1999 – 2002, studies conducted in Sardinia analyzed 9639 samples of sera and 815 samples from abortions (670 aborted fetus and 145 placentas) obtained from 964 sheep and goat farms. The sampled sera were examined for presence of IgG and IgM specific antibodies against *Toxoplasma gondii* by means of indirect immunofluorescence method while fetus and placenta were examined by PCR. Specific antibodies against IgG were diagnosed in 652 (9%) sheep. of the total number of 2471 samples of sheep fetuses including muscles, liver, abomasums, spleen, brain and placenta, PCR proved positivity in 271 (11.1%) cases. on the one hand, these

results indicate relatively high seroprevalence and, on the other hand point to the important role of PCR diagnostics related to sheep abortions (Masala et al., 2003).

In southern Italy, region Campania, 117 sheep flocks kept on pasture were examined. Samples of blood and milk were taken from 10 adult sheep (> 18 months old) from each flock. Thus altogether 1170 sheep were subjected to examination. Blood sera were examined for the presence of IgG antibodies by indirect immunofluorescence. Of the examined samples collected from 1170 sheep 333 samples were positive (28.5%) and PCR proved presence of *Toxoplasma gondii* in 4 samples of milk, which represents 3.4% of the total analyzed samples, demonstrating the transmission potential of ovine milk and dairy products (Fusco et al., 2007).

The tachyzoites presented in sheep or goat milk are generally not considered as an important source of oral transmission of *T. gondii* because they are rapidly killed outside the host and because they are considered sensitive to proteolytic enzymes (Powell et al., 2001). But the contamination of milk should not be underestimated since it can represent a critical point in food safety. Some local home-made cheeses deriving from mass-milk production and destined to be consumed fresh can represent a risk factor for public health if they are produced in small family-based farms without previous milk pasteurization.

Acknowledgement

The paper is a result of research work done within the frames of grant projects VEGA of the Ministry of Education of the Slovak Republic No. 1/0063/13.

References

Frenkel J.K. 2000. Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise-Thomas P, Peterse E. (ed): Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Paris, pp. 9-25.

Olafson, P., Monlux, W.S. 1942. *Toxoplasma* infections in animals. Cornell Veterinarian, 32, 16-190.

Camossi, L.G., Greca-Júnior, H., Correa, A.P.F.L., Richini-Pereira, V.B., Silva, R.C., Da Silva, A.V., Langoni, H. 2011. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. Veterinary Parasitology, 177, 256-261.

Cristina, N., Liaud, M.F., Santoro, F., Oury, B., Ambroise-Thomas, P. 1991. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. Experimental Parasitology, 1991, 73, 73-81

Spisak, F., Turcekova, L., Reiterova, K., Spilovska, S., Dubinsky P. 2010. Prevalence estimation and genotypization of *Toxoplasma gondii* in goats. Biologia, 65, 670-674.

Dubey, J.P. 1998. Re-examination of resistance of Toxoplasma gondii tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Journal of Parasitology, 116, 43-50.

Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Peterse, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T. 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. BMJ, 321, 142-147.

Hiramoto, R.M., Mayrbaurl-Borges, M., Galisteo, A.J., Meireles, L.R., Macre, M.S., Andrade, Jr., H.F. 2001. Infectivity of cystis of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. Revista de Saúde Pública, 35, 113-118.

Masala G, Porcu R, Madau L, Tanda A, Ibba B, Satta G, Tola S. 2003. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. Veterinary Parasitology 117, 15-21.

Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YTR, Pesce A, Giuseppina DM, Cringoli G. 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Periodical* Veterinary parasitology 149, 1-4.

Powell, C.C., Brewer, M., Lappin, M.R. 2001. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infecting lacting cats. Veterinary Parasitology, 102, 29-33.

STRUCTURAL CHANGES IN THE POSTERIOR KIDNEY OF FISH EXPOSED TO MANCOZEB

Hanna LUTNICKA[1], Agnieszka LUDWIKOWSKA[1], Anna PECIO[2], Bartosz BOJARSKI[1]

University of Agriculture in Krakow, Faculty of Animal Science, Department of Poultry and Fur Animal Breeding and Animal Hygiene, Poland[1]
Jagiellonian University, Institute of Zoology, Department of Comparative Anatomy, Poland[2]

ABSTRACT
Fungicides, including mancozeb, are widely used in agriculture in the world. The low or very low concentrations of these pesticides are noted in surface waters - the main source for fish culture. They can influent fish inner organs causing pathological changes observed only on a cell's level. A kidney is an important organ secreting toxins metabolites. Fish posterior kidney have to different parts: haematopoietic tissue and renal parts (excretory tissue). The aim of the study was to get to know if the fungicide mancozeb cause the ultrastructural lesions in posterior kidney of fish.

Key words: fungicide, mancozeb, fish posterior kidney, ultrastructural changes

Material and methods
Carp *Cyprinus carpio* L. (mean weight ± sd, 50 ± 10 g) was exposed for 14 days, in aquaria conditions, to the fungicide mancozeb in concentration 1 mg L^{-1} . After exposure fish were transferred to the clean water for the next 30 days for a possible recovery. Kidneys were sampled after 14 days of exposure and at the end of the recovery period. Ultrastructural changes were studied by transmission electron microscopy.

Results
The fungicide mancozeb caused pathological lesions in carp kidney. After the exposure the most important lesions were observed in hematopoietic tissue. The maturing blood cells were separated from themselves. They had different, not natural shapes/forms because of the cell's fragmentation process. In the excretory part the epithelial cells adhesion could be seen. The structure of the most of mitochondria of the cells was correct. Only some of them were locally damaged or a process of deliquescence was observed.
After the recovery period (30 days) in the hematopoietic tissue the same lesions as noticed after exposure was observed. In epithelial cells increase of RER could be seen in relation to the RER observed after exposure to the fungicide. Intensive RER fragmentation process was observed, too. Numerous RER was pure in ribosomes . The recovery time was too short for the completely tissue repair.

The work has been finacially supported by N N 304 279440

Introduction of the Ecotoxicologist Masters' degree at SZIU

Péter Nagy, Gábor Bakonyi*

Department of Zoology and Animal Ecology
Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences
Gödöllő, Hungary
*Nagy.Peter@mkk.szie.hu

A wide range of environmental disturbances by human activities constitute massive threats nowadays to living organisms from individual levels to ecological systems. Consequently, it is becoming more and more important to educate experts capable of handling a wide range of environmental risks with a sound scientific and methodological background.

The above needs and the lack of concerted education in the region, justified the establishment of a relevant educational tool as a response. The Ecotoxicologist major was proposed, the first time in Hungary, in 2008 by Professor Gábor Bakonyi of the SZIU Department of Zoology and Animal Ecology in order to fulfil the above need. Since this proposal was accepted, the responsibility of coordination is taken by our department and the organizational tasks are also performed here.
The major comprises of four semesters supplemented by a practical week and a professional practical period of 4 weeks. The placement of the professional practical ranges over several types of partner organizations, from research institutes to companies interested in receiving our students, considered often as futures employees.

The list of subjects is very wide, covering sciences from toxicological and ecotoxicological nature to courses on environmental risk assessment, planning scientific projects and fund raising as well as scientific publication strategies. This way, our students obtain education on problems and possibly solutions all along different natural and anthropogenic food chains as well. The teachers of the courses were selected by merit, specialization and experience, so the proportion of external lecturers is rather high in this major.
Several of our students have gained prices in National Scientific Students' Competitions.
Since its establishment in 2010, a new class of 11-17 students could be recruited every year. So the third class is preparing for graduation this December. So far, almost all of our graduates have succeeded in obtaining a job, most of them being employed in jobs relevant to their degree.

As for the future, we are confident in reserving the high standards of the education that should maintain the attraction of our degree. Furthermore, we hope to be able to introduce this major in English, so that we can extend this service to foreign students.

Acknowledgements
The authors thank the support of Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL

THE CONTENT OF RISK ELEMENTS IN BONES OF BANK VOLE (*MYODES GLAREOLUS*) AND WOOD MOUSE (*APODEMUS SYLVATICUS*) FROM KOLÍŇANY AREA (SLOVAKIA)

*Radoslav OMELKA[*1], Mária BAUEROVÁ[1], Robert STAWARZ[2], Grzegorz FORMICKI[2], Ivan BALÁŽ[3], Monika MARTINIAKOVÁ[4]*

[1]Department of Botany and Genetics, Constantine the Philosopher University, 949 74 Nitra, Slovakia
[2]Institute of Biology, Krakow Pedagogical University, Krakow 31 054, Poland
[3]Department of Ecology and Environmentalistics, Constantine the Philosopher University, 949 01 Nitra, Slovakia
[4]Department of Zoology and Anthropology, Constantine the Philosopher University, 949 74 Nitra, Slovakia
[*]Corresponding author: romelka@ukf.sk

ABSTRACT

The content of selected risk elements (Fe, Cu, Zn, Ni, Mg, Na, K) in the femora of bank vole (*Myodes glareolus*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from Kolíňany area (Slovakia) which is characterized by a high degree of environmental pollution was investigated in the present study. The rodents were trapped in this locality in February 2011. Higher concentrations of Mg and Na were detected in the bones of wood mouse in comparison with those of bank vole ($P<0.05$). Moreover, the concentrations of Cu, Zn and Ni were significantly higher in the bones of both species in our study in comparison with the values which were obtained in the same animal species on the same site in February 2007. Therefore, our results demonstrate increased accumulation of these elements in the femora of *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* and thus give an evidence of still ongoing contamination of this locality.

Keywords: Risk elements. Bone. Bank vole. Wood mouse. Atomic absorption spectrophotometry.

INTRODUCTION

Many investigations have been performed to determine risk elements accumulation in selected organs of various animal species (Stawarz *et al.,* 2003; Jancova *et al.,* 2006; Kolesarova *et al.,* 2008; Gasparik *et al.,* 2012). In general, rodents are ideal for monitoring environmental pollution as well as for evaluating the exposure risk for people living in contaminated areas. The bank vole (*Myodes glareolus,* formerly *Clethrionomys glareolus*) is a small microtine rodent that is common throughout Europe and it is one of the most common woodland rodents in Slovakia. Seeds, fruits and green vegetation constitute about 44% of their food, insects, earthworms and other invertebrates between 9 and 23%, depending on the season, and in winter they add tree bark to their food (Zemanek 1972; Gdula-Argasinska *et al.*, 2004). This species has been used to monitor environmental pollution from a variety of technogenic sources up to date (Milton *et al.,* 2003; Topolska *et al.,* 2004). The wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) belongs to the most dominant rodent species in Slovakia. The diet of the wood mouse consists of roots, grains, seeds, berries, nuts, grasses, grain kernels, fruits and insects (Nowak, 1991). The content of many elements in various organs has also been investigated in this species (Milton *et al.,* 2002; Milton *et al.,* 2004).

Since bone can serve as a good biomarker of long-term accumulation of various xenobiotics, we analysed concentrations of selected risk elements (Fe, Cu, Zn, Mg, Na, K) in the femora of two rodent species: bank vole and wood mouse. The rodents were trapped at

Kolíňany area (Slovakia) which is considered as a heavily polluted region. Research to identify concentration of various risk elements in the bones of *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* was carried out in this locality also in February 2007 and the results demonstrated higher concentrations of Pb, Fe, Cu and Zn in bones of bank voles from the Kolíňany site as compared to those from the Nováky site (Martiniaková *et al.,* 2011). Also, higher content of Ni and Zn was found in the femora of wood mouse from Kolíňany locality in comparison with Nováky area (Martiniaková *et al.,* 2010). So, in addition to the determination of risk elements content in the femora, we compared the present results with those obtained four years ago.

MATERIALS AND METHODS

The individuals of bank vole (*Myodes glareolus,* n=12) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus,* n=7) were obtained by means of the standard teriological methods and procedures from wood ecosystems (Jančová *et al.,* 2006) in February 2011. The rodents were trapped near the water pond in Kolíňany (Nitra district, Slovakia; Figure 1) which is located approximately 100 km far from the town Nováky and it is considered to be a heavily polluted region. All animals used in the experiment were adult (4-5 months old), in good physical condition, without pathological-anatomical changes.

The concentrations of selected risk elements (Fe, Cu, Zn, Ni, Mg, Na, K) were determined in both femora of investigated rodents (n=38) with the method of atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 4100 ZL) in a graphite furnace (Stawarz *et al.,* 2003). The tissue samples were kept at -18° C until analysis. In the laboratory the samples were dried at 105ºC until dry mass was obtained. Then, the bones were weighed (minimum 2 g) and digested in concentrated nitric acid at 90º C for 10 hours. Before the analysis, the samples were diluted to 25 ml with distilled water. All metal concentrations were expressed on a dry weight basis in $mg.kg^{-1}$. From the final data, basic statistical characteristics were calculated (mean, standard deviation, minimum, maximum, median). Since the distribution of observed levels of risk elements was normal according to Shapiro-Wilk test, the parametric T-test was used for species comparisons. T-test was also applied for comparison of our data with those obtained in February 2007 (Martiniaková *et al.,* 2010, 2011).

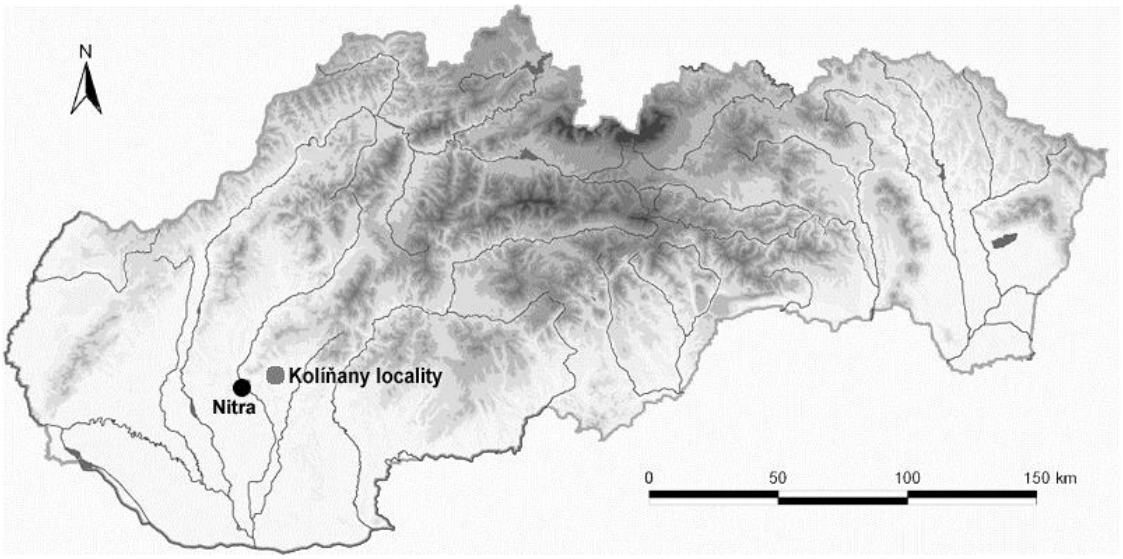


Figure 1

Map of investigated locality.

RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of selected risk elements (Fe, Cu, Zn, Ni, Mg, Na, K) in the femora of *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* from Kolíňany area are listed in Table 1. Higher concentrations of all investigated elements were detected in the bones of wood mouse; however, significant differences were observed only for concentrations of Mg and Na ($P<0.05$). We observed higher concentrations of Zn in the femora of *Myodes glareolus* compared with the data reported by Milton *et al.* (2003). These investigators analysed Zn concentration (173 ± 5.1 μg g^{-1} dry weight) in the femora of bank voles trapped at the contaminated, unused Pb mine at Frongoch in west Wales. In contrast, Zn concentration in the femora of bank voles from Kolíňany area was lower as value reported by Milton and Johnson (1999) who analysed femora of laboratory-bred bank voles exposed to increased levels of dietary Zn.

The concentrations of Cu, Zn and Ni were significantly higher in the bones of both species *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* in our study in comparison with the values which were obtained in the same animal species on the same site (Kolíňany) in February 2007 (Table 2). In addition, the bones of wood mouse also included a significantly higher content of Fe as compared to the value from 2007. Therefore, our results demonstrate increased accumulation of these elements in the femora of both rodents investigated and thus give an evidence of still ongoing contamination of this locality. This fact can be explained by intensive agricultural production and subsequent contamination of soil, water, and food, by road traffic pollution as well as by various factories in industrial zones in western Slovakia known from the history affecting also nowadays situation (e.g. production of Ni in Sereď and its damping place, Gasparik *et al.,* 2012). Intensive agricultural production and the use of chemicals are characteristic for the whole region of Nitra. It is generally known that an application of agricultural chemicals can lead to a higher accumulation of specific elements, including Fe, Cu and Zn into the soil. In addition, there is heavy road traffic near the capture locality, which is also considered to be a significant source of risk elements that have a potential ability to be transported by air flow over large distances. There is also a possibility of falling dust being transported in the air from large industrial regions, such as Bratislava, Vienna, Budapest, or factories nearby Nitra region. This hypothesis may be supported by studies indicating the possibility of the long range transportation of various xenobiotics (Coggins *et al.,* 2006).

CONCLUSION

The accumulation of selected risk elements (Fe, Cu, Zn, Ni, Mg, Na, K) in the femora of bank vole (*Myodes glareolus*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from Kolíňany area was investigated in the present study. We detected higher concentrations of Mg and Na in the bones of wood mouse in comparison with those of bank vole ($P<0.05$). The concentrations of Cu, Zn and Ni were significantly higher in the bones of both species in our study in comparison with the values which were obtained in the same animal species on the same site four years ago. Our results give an evidence of still ongoing contamination of this locality.

Acknowledgments: This study was supported by the grants KEGA 035UKF-4/2013 and VEGA 1/0790/11.

Table 1

The concentrations of selected risk elements in the femora of *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* from Kolíňany area.

Species		Fe	Cu	Zn	Ni	Mg	Na	K
		(mg.kg^{-1})						
Myodes glareolus (1)	x	197.26	62.63	241.73	26.94	3621.17	2009.03	4494.19
	sd	67.36	19.45	19.28	5.59	930.98	160.99	1360.8
	min	123.24	42.08	217.74	19.26	2520.95	1842.77	3001.16
	max	286.58	88.79	268.94	32.06	4954.51	2219.02	6269.48
	med	197.92	61.8	245.03	29.21	3417.08	2005.39	4106.39
Apodemus sylvaticus (2)	x	215.46	68.78	244.74	30.79	4458.25	3414.29	5181.79
	sd	44.78	13.58	46.58	20.21	1054.46	767.41	656.43
	min	171.68	52.82	196.79	9.32	3603.09	2932.01	4370.7
	max	277.32	85.34	294.54	58.09	5880.7	4555.29	5716.8
	med	206.41	68.49	243.81	27.87	4174.6	3084.93	5319.83
T - test						+	+	

x – mean, sd – standard deviation, min – minimum, max – maximum, med – median, P<0.05 (+)

Table 2

Comparison of Fe, Cu, Zn and Ni concentrations in the femora of *Myodes glareolus* and *Apodemus sylvaticus* with those obtained by Martiniaková et al. (2010, 2011).

Species / study		Fe	Cu	Zn	Ni
		(mg.kg^{-1})			
Myodes glareolus – present study	x	197.26	62.63	241.73	26.94
	sd	67.36	19.45	19.28	5.59
Myodes glareolus – study of Martiniaková et al. (2011)	x	212.99	4.16	188.55	9.52
	sd	52.27	2.1	21.61	2.8
	T - test		+	+	+
Apodemus sylvaticus – present study	x	215.46	68.79	244.74	30.79
	sd	44.78	13.58	46.58	20.21
Apodemus sylvaticus – study of Martiniaková et al. (2010)	x	109.1	3.33	147.55	7.8
	sd	35.61	1.06	13.35	0.84
	T - test	+	+	+	+

x – mean, sd – standard deviation, P<0.05 (+)

REFERENCES

ARBON, K. S., C. M. CHRISTENSEN, W. A. HARVEY and S. J. HEGGLAND, 2012. Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. In: *Food Chem. Toxicol*. Vol. 50, pp. 198-205.

COGGINS, A. M., S. G. JENNINGS and R. EBINGHAUS, 2006. Accumulation rates of the heavy metals lead, mercury and cadmium in ombrotrophic peatlands in the west of Ireland. In: *Atmospheric Environ.* Vol. 40, pp. 260-278.

GASPARIK, J., M. DOBIAS, M. CAPCAROVA, P. SMEHYL, J. SLAMECKA, J. BUJKO and J. GASPARIK, JR, 2012. Concentration of cadmium, mercury, zinc, copper and cobalt in the tissues of wild boar (Sus scrofa) hunted in the western Slovakia. In: *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* Vol. 47, pp. 1212-6.

GDULA-ARGASINSKA, J., J. APPLETON, K. SAWICKA-KAPUSTA and B. SPENCE, 2004. Further investigation of the heavy metal content of the teeth of the bank vole as an exposure indicator of environmental pollution in Poland. In: *Environ. Pollut.* Vol. 131, pp. 71-79.

JANČOVÁ, A., P. MASSÁNYI, P. NAĎ, B. KORÉNEKOVÁ, M. SKALICKÁ, J. DRÁBEKOVÁ and I. BALÁŽ, 2006. Accumulation of heavy metals in selected organs of yellow necked mouse *(Apodemus flavicollis)*. In: *Ekol. Bratislava* Vol. 25, pp. 19-26.

KOLESAROVA, A., J. SLAMECKA, R. JURCIK, F. TATARUCH, N. LUKAC, J. KOVACIK, M. CAPCAROVA, M. VALENT and P. MASSANYI, 2008. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. In: *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* Vol. 43, pp. 646-50.

MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, A. JANČOVÁ, R. STAWARZ and G. FORMICKI, 2010. Heavy metal content in the femora of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from different types of polluted environment in Slovakia. In: *Environ. Monit. Assess.* Vol. 171, pp. 651-660.

MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, A. JANČOVÁ, R. STAWARZ and G. FORMICKI, 2011. Concentrations of selected heavy metals in bones and femoral bone structure of bank (*Myodes glareolus*) and common (*Microtus arvalis*) voles from different polluted biotopes in Slovakia. In: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 60, pp. 524-532.

MILTON, A. and M. JOHNSON, 1999. Biomonitoring of contaminated mine tailings through age accumulation of trace metals in the bank vole *(Clethrionomys glareolus).* In: *J. Environ. Monit.* Vol. 1, pp. 219–225.

MILTON, A., M. S. JOHNSON and J. A. COOKE, 2002. Lead within ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. In: *Sci. Total Environ.* Vol. 299, pp. 177–190.

MILTON, A., J. A. COOKE and M. S. JOHNSON, 2003. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. In: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 44, pp. 405-411.

MILTON, A., J. A. COOKE, and M. S. JOHNSON, 2004. A comparison of cadmium in ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. In: *Water Air Soil Poll.* Vol. 153, pp. 157–172.

NOWAK, R. M., 1991. *Walker's mammals of the world* (Vol II). Baltimore: Johns Hopkins University Press.

STAWARZ, R., M. ZAKRZEWSKI, A. MARENČÍK and Š. HRAŠKA, 2003. Heavy metal concentration in the toad *Bufo Bufo* from a region of Mochovce, Slovakia. In: *Ekol. Bratislava*, Vol. 22, pp. 292-297

TOPOLSKA, K., K. SAWICKA-KAPUSTA and E. CIESLIK, 2004. The effect of contamination of the Krakow region on heavy metals content in the organs of bank voles (*Cleithrionomys glareolus*, Schreber, 1780). In: *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 13, pp. 103-109.

ZEMANEK, M., 1972. Food and feeding habits of rodents in a deciduous forest. In: *Acta Theriol*. Vol. 23, pp. 315-325.

CONTENT OF SOME INORGANIC ANIONS IN MINERAL AND SPRING WATERS

Pasternakiewicz Anna and Bilek Maciej

Faculty of Biology and Agriculture
University of Rzeszow
2 Ćwiklińskiej St.
35-601 Rzeszow
Poland

Mineral and spring waters are popular and important addition to a daily diet. They are considered as a source of an easily digestible inorganic ions. At the same time they are also used in the feeding of sick or persons engaged in the prevention of lifestyle diseases. In light of the poor quality of tap water, low- and very low-mineralization and spring waters are often used to prepare meals for babies. Less attention is paid to the potential harmfulness of mineral and spring waters, postulating only necessity of correct selection for the youngest consumers.

The aim of this study was to analyze the bottled mineral water and spring water sold in PET packaging, purchased in the city of Rzeszow. Group consisted of fourteen mineral waters and six spring waters was analyzed. We examined the concentration of selected anions (sulfates, chlorides, nitrates) by ion chromatography and compared with the stated amounts of the label.

Differences with the labeled contents of anions were both in the group of mineral waters and spring waters. We assessed the health risks in adults and children, which is associated with the consumption of mineral water.

Even for the youngest children the detected concentrations of chlorides, sulphates and nitrates are not dangerous. However, with a number of other sources of nitrates in the diet of infants, mineral and spring waters may pose a health risk. Risk can be minimized by placing the labels of mineral waters and spring waters information about high levels of nitrates, which can be harmful to infants.

Key words:
mineral waters, spring waters, chlorides, nitrates, sulphates, ion chromatography, nitrates toxicity

View publication stats

FIBROTIC CHANGES IN THE RABBIT LIVER AFTER PESTICIDE ADMINISTRATION

PETROVOVA, E.[1], *MAZENSKY, D.*[1], *LUPTAKOVA, L.*[2]

[1]Department of Anatomy, Histology and Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenskeho 73, 04011 Kosice, Slovakia
[2]Department of Biology and Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenskeho 73, 04011 Kosice, Slovakia

Abstract
The aim of our study was to observe fibrotic changes of the rabbit liver tissue treated with bendiocarb, mostly in the area of the central vein and portal tract. Animals were divided into groups (control, days 10, 20, 30 of administration), and each group comprised 14 animals. Rabbits in all experimental groups received carbamate pesticide (bendiocarb) *per os* in a dose 5 mg/kg per day and after day 11 in a same dose per 48 hours. Picro-sirius red staining was used for visualization of collagen fibers and staging of hepatic fibrosis. The central vein wall thickness is increased in thickness at 10 and 30 days, but not significantly. Further, at the same days the fibrous septa of variable lengths are spreading from portal tract into the lobules and perisinusoidal space. In view of the data of the present study, it can be concluded that bendiocarb has moderately toxic effect on the rabbit liver tissue, regardless of gender after short-term (10 days) and long-term (30 days) bendiocarb administration.

Introduction

Pesticides are the significant contaminants of environment which are used in agriculture and households. Their widely using cause the question of toxicity pesticides to non-target organisms, their persistence, accumulation and combined effect with other chemicals. The annual application of synthetic pesticides to food crops in the EU exceeds 140,000 tones per year. The wide use of pesticides are mainly organophosphates (OPs), carbamates and pyrethroids. Further, over 25% of fruits, vegetables, and cereals grown in the European Union contain detectable residues of at least two pesticides while their total quantity, which Europe's population is exposed to is unknown (Bjørling-Poulsen a kol., 2008). Carbamate insecticides, like the OPs, inhibit acetylcholinesterase (AChE) and elicit cholinergic hyperstimulation. However, carbamates cause only reversible inhibition of AChE which lasts only minutes or 24 hours (Kamel and Hoppin, 2004).

Bendiocarb is a broad spectrum pesticide belonging to the *N*-methylcarbamate group (Pacioni and Veglia, 2007). Using of bendiocarb can dramatically reduce the risk of insect-borne diseases which are transmitted by arthropod vectors such as mosquitoes (malaria, dengue fever, yellow fever, encephalitis, filariasis, West Nile fever and chikungunya), ticks (e.g. Lyme disease) and sandflies (leishmaniasis; Nauen, 2007). Bendiocarb is degraded in the liver, which has a major role in the biotransformation and excretion of carbamate pesticides from the body. Reactions of detoxication take place in hepatocytes by the enzymatic system situated in the endoplasmic reticulum (Schenck and Kolb, 1990), and bendiocarb is excreted as a sulphate and β-glucuronide conjugates of the phenol derivatives. In a study with rats, 90% of an oral bendiocarb dose was excreted in the urine, 1-3% in expired air, and 3-8% in the feces. Excretion was complete within 24 hours (Challis and Adcock, 1981).

The aim of our study was to observe fibrotic changes of the rabbit liver tissue treated with bendiocarb, mostly in the area of the central vein and portal tract.

Material and Methods

In our experiment were used 56 adult rabbits (age = 84 days) of breed HY+, 28 males and 28 females, with average weight 2,5 kg from accredited animal farm (Nitra, Slovakia). Animals

were kept in cages (two per a cage) at standard conditions (temperature 15-21°C, 12 hour light period and relative humidity of 45 %) and fed with granular feed mixture (O-10 NORM TYP, Slovakia). Drinking water was available for all animals *ad libitum*. Animals were divided into groups (control, days 10, 20, 30 of administration), and each group comprised 14 animals. Rabbits in all experimental groups received bendiocarb (96 % Bendiocarb, Bayer, Germany) *per os* in a dose 5 mg/kg per day and after day 11 in a same dose per 48 hours, with respect to the acute oral toxicity of bendiocarb to rabbit, 35-40 mg/kg of the body weight (Petrovova et al., 2011). Animals in control group were not treated and they were killed at 30 day from the beginning of the experimental work. Experimental animals were killed by thiopental (Thiopental Valeant 1g, ICN, Czech Republic; 100 mg/kg of body weight) intravenous administration at days 10, 20 and 30 after bendiocarb treatment. Animal weight was recorded at first and last day of bendiocarb treatment, and calculation of the weight gain was made as the difference between rabbit body weight in experimental group and control group at days 10, 20 and 30 of the bendiocarb treatment. The experimental work on rabbits was performed with approval of the Ethic Committee No. 2647/07-221/5 followed Slovakian protocols for ethical standards for the use of laboratory animals.

Picro-sirius red staining was used for visualization of collagen fibers and staging of hepatic fibrosis. Deparaffinized liver sections were washed in water, and stained in Picro-sirius red (0.1 % Picro-sirius red in saturated aqueous picric acid; Sigma-Aldrich, USA) for 1 hour at room temperature. Sections were rinsed twice in 0.5 % acetic acid and stained in Hoechst (2 µl / 200 ml 0.1% Triton/H_2O). Subsequently, histological sections were rinsed in distilled water, dehydrated in absolute ethanol and xylene, and mounted in Depex (VWR International GmbH, Austria). Microscopic evaluation of fibrosis was analyzed using a Olympus BX46 microscope equipped with a camera DP70 (Olympus, Hamburg, Germany) and objective with 20 x magnification. Five central veins, as a general term (Danko et al., 2011) and areas of portal tracts in each animal were studied, for a total of 260 central veins and portal tracts.

Results

Figures 1 and 3 illustrate the histological features of central veins portal tracts with and without extension of collagen fibers into the perivenous parenchyma, perisinusoidal and pericellular space, particularly at 10, 20 and 30 days.

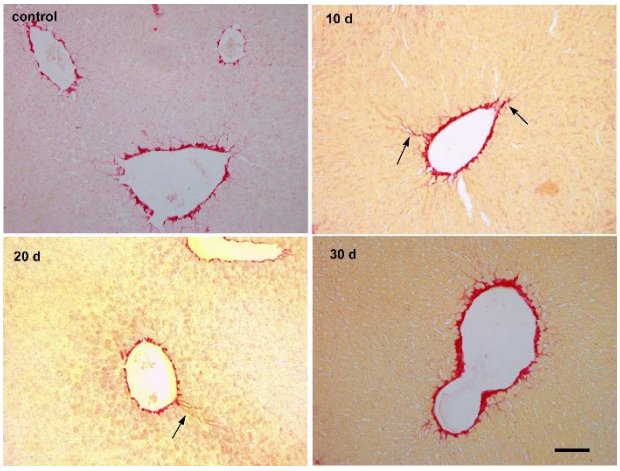


Fig. 1

Control samples show a thin-walled central vein with fine fibrous extension by Sirius red staining of collagens.

At 10 and 30 days of bendiocarb treatment the wall of central vein increased in thickness. Furthermore, fibrous strands emerge from the central vein into the parenchyma and perivascular space, particularly at 10 and 20 days (arrows). Sirius Red staining, magnification 20 x, Scale bar = 100 µm (Petrovova et al., 2013).
The vein wall thickness ranged from 4 to 27 µm. As shown in Fig. 1, the vein wall thickness is increased in thickness at 10 and 30 days, but not significantly (Fig. 2). The control samples show a thin-walled central vein with fine fibrous extension by Sirius red staining of collagens. Fibrous extension was not detected in association with the wall thickness of the central vein (Petrovova et al., 2013).

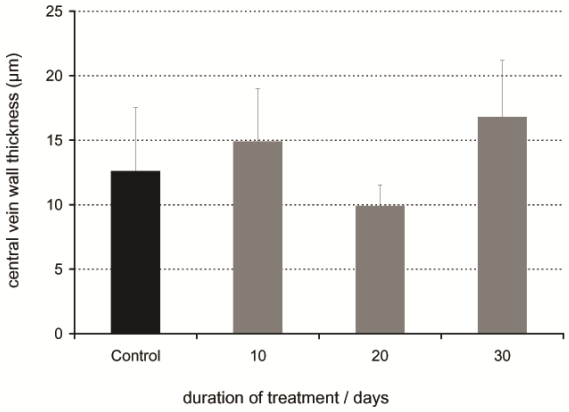


Fig. 2
The central vein wall thickness in bendiocarb-treated rabbit liver (Petrovova et al., 2013).

Portal tract (PT) shows increased collagen staining in the matrix. Further, at 10 and 30 days the fibrous septa of variable lengths are spreading from PT into the lobules and perisinusoidal space. The perisinusoidal fibrosis is focal, which is marked by increased collagen staining along the sinusoidal borders. Fine fibrous strands extend from PT for a short distance into the lobules at 20 day of bendiocarb treatment (Fig. 3; Petrovova et al. 2013).

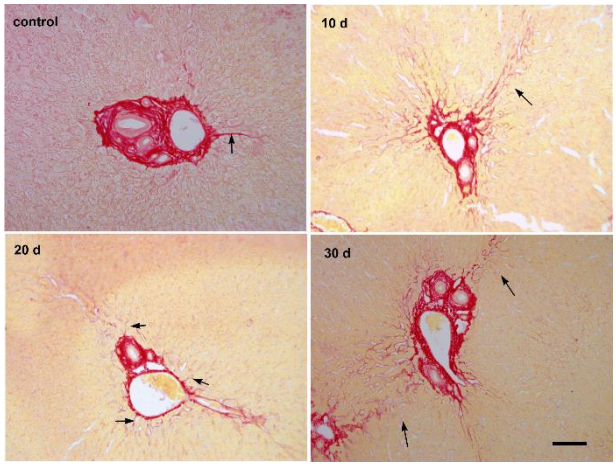


Fig. 3 **Portal tract shows increased collagen staining in the matrix.**

Fibrous septa of variable lengths are spreading from portal tract into the lobules and perivascular space (arrow). Sirius Red staining, magnification 20 x, Scale bar = 100 µm (Petrovova et al., 2013).

Discussion

Agrochemicals have been in use since the early days of modern agriculture. Their widely using cause the question of toxicity pesticides to non-target organisms, their persistence, accumulation and combined effect with other chemicals. Pesticides are biologically active and this renders them intrinsically more hazardous than most other classes of industrial products.

Chronic hepatic injury is a common disorder defined pathologically by ongoing hepatic necrosis and inflammation of the liver, often accompanied by fibrosis. Liver fibrosis represents the final common outcome of chronic liver injury and is often progressive, eventually evolving into cirrhosis. Liver fibrosis is a complex process involving production and deposition of insoluble components that constitute the extracellular matrix. Chronic hepatitis is classified by histology based on activity of inflammation and degree of fibrosis; extent of fibrosis relates to likelihood of developing cirrhosis (Frazzetto et al., 2012).

Chronic liver disease is a major risk of pesticides exposure. The laboratory tests have a variety of potential uses in the diagnosis of liver diseases. Routinely performed tests (e.g., serum bilirubin, albumin, and prothrombin time) may be of prognostic value in liver disease but they are not accurate in identifying early fibrosis. The most promising markers of fibrosis relate to collagen deposition, such as serum P-III-P and tissue inhibitor of metalloproteinase. Currently available laboratory tests are of value in excluding various types of liver diseases. Commonly performed serum liver enzymes are of limited value in monitoring liver diseases (Malaguarnera et al., 2012). The development and application of laboratory tests that can identify early fibrosis and chronic hepatic disease have the potential of reducing healthcare costs and suffering associated to chronic liver diseases.

Miranda et al., (2008) studied the bioaccumulation of chlorinate pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*, and they found the most important alterations in the liver were lesions such as fibrosis, large necrosis area and leukocyte infiltration.

In our study, the weak increase of the fibrosis was observed around the central vein and PT in treatment groups after short-term (10 day) and long-term (30 day) bendiocarb administration in comparison to control. It can be concluded that bendiocarb has moderately toxic effect on the rabbit liver tissue, regardless of gender. The case with the poisoned animals in this study, human beings would not develop any systematic poisoning observable at the level of the whole organism.

Acknowledgement

Supported by grant of the Ministry of Education VEGA 1/0111/13.

References

Bjorling-Poulsen, M., Andersen, H.R., Grandjean, P., 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. Environ Health, 7, 50.

Challis, I.R., Adcock, J.W., 1981: The Metabolism of the Carbamate Insecticide Bendiocarb in the Rat and in Man. Pestic Sci 12, 638-44.

Danko, J., Simon, F., Artimova, J., 2011: Nomina anatomica veterinaria. Kosice: University of Veterinary Medicine and Pharmacy. 267 p.

Frazzetto, P.M., Malaguarnera, G., Gagliano, C., Lucca, F., Giordano, M., Rampello, Li., Rampello, Lu., Malaguarnera, M., 2012: Biohumoral tests in chronic pesticides exposure. Acta Medica mediterranea, 28, 237-243.

Kamel, F., Hoppin, J.A., 2004: Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environ Health Perspect, 112, 950-958.

Malaguarnera, G., Cataudella, E., Giordano, M., Nunnari, G., Chisari, G., Malaguarnera, M., 2012: Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. World J Gastroenterol, 18, 2756-2766.

Miranda, A.L., Roche, H., Randi, M.A.F., Menezes, M.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008: Bioaccumulation of chlorinate pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish Hoplias Malabaricus: histopathological, physiological, and immunological findings. Environ Int 34,939-949.

Nauen, R., 2007: Perspective insecticide resistance in disease vectors of public health importance. Pest Manag Sci 63,628-633.

Pacioni, N.L., Veglia, A.V., 2007: Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. Anal Chim Acta 583,63-71.

Petrovova, E., Massanyi, P., Capcarova, M., Zivcak, J., Stodola, L., 2011: Structural alterations in rabbit spleen after bendiocarb administration. J Environ Sci Health B 46,788-792.

Petrovova, E., Purzyc, H., Mazensky, D., Luptakova, L., Torma, N., Sopoliga, I., Sedmera, D., 2013: Morphometric alterations, steatosis, fibrosis and active caspase-3 detection in carbamate bendiocarb treated rabbit liver. Environmental Toxicology, In Press

Schenck, M., Kolb, E., 1990: Basics of physiological chemistry. Bratislava: Priroda. 666 p

EFFECT OF CHRONIC APPLICATION OF QUERCETIN AND ACUTE DOSE OF T-2 TOXIN ON CONTENT OF SERUM BILIRUBIN AND ALBUMINS OF RABBITS

Petruška P., Zbyňovská K., Kalafová A., Kolesárová A., Capcarová M.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra, Slovak Republic,

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effect of long-term exposure of quercetin and acute dose of T-2 toxin on content of bilirubin and albumins of rabbits. Adult rabbits were divided into three experimental groups (E1, E2, E3) and the control group without quercetin addition. Quercetin was applied intramuscularly in various concentrations; 10 $\mu g.kg^{-1}$ in E1 group, 100 $\mu g.kg^{-1}$ in E2 group, and 1000 $\mu g.kg^{-1}$ in E3 group for 90 days, 3 times per week. T-2 toxin was applied at dose 0.08 mg per kg of body weight 72 hours before slaughter. Application of quercetin insignificantly decreased content of bilirubin and decreased content of albumins in experimental groups compared to the control group. In conclusion, as the bilirubin serves in organism as antioxidant with the ability to scavenge free radicals, our results could contribute to the positive effect of quercetin on antioxidant balance, however further studies are needed.

Key words: quercetin, T-2 toxin, rabbits, bilirubin, albumins.

Introduction

Flavonoids are widely distributed in the plant kingdom and are categorized as flavonol, flavanol, flavanone, flavone, anthocyanidin, and isoflavone and theyr are absorbed from food **(*Murota and Terao*, 2003)**. Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) is a member of naturally occurring widely distributed compounds, the flavonoids, which are ubiquitous phenolic secondary metabolites found in plants, fruits, flowers and plant derived foods **(*Harborne and Williams*, 2000)**. Numerous *in vitro* studies have revealed diverse biological effects of quercetin, including apoptosis induction, antimutagenesis, protein kinase C (PKC) inhibition, lipoxygenase inhibition, histamine-release inhibition, superoxide dismutase (SOD)-like activity, modulation of cell cycle, angiogenesis inhibition, and inhibition of angiotensin converting enzyme II **(*Formica and Regelson*, 1995)**. Quercetin intake is therefore suggested to be beneficial for human health and its antioxidant activity should, at least partly, yield such a variety of biological effects **(*Rice-Evans and Packer*, 2010)**.

Cells seem to use several systems for protection against oxidative stress **(*Sedlak and Snyder*, 2004)**. Examples include repair enzymes (to repair damaged biomolecules), preventative antioxidants as albumin (to prevent the formation of free radicals) and scavenging antioxidants as bilirubin (to remove reactive species once formed). Albumin may represent the major and predominant circulating antioxidant in plasma **(*Cha and Kim,* 1996)**. Albumin represents the quantitatively most important source of thiol in plasma, and this circulating store may be altered in situations where antioxidants become limiting, resulting in changes in the redox status **(*Durand et al.*, 1997)**.

Bilirubin is a bile pigment that may have an important role as an antioxidant. Bilirubin, through a hydrogen donation mechanism, participates as a scavenger of secondary oxidants formed in the oxidative process and thereby might alleviate oxidant stress in the blood. When a molecule of bilirubin acts as antioxidant, it is itself oxidized to biliverdin. Endogenous biliverdin

reductase should suffice to reduce newly formed biliverdin back to bilirubin and might primarily protect cells against lipid peroxidation **(*Sedlak and Snyder*, 2004)**. In the serum, bilirubin may have a direct therapeutic action in coping with oxidative stimuli within the blood stream, such as quenching oxidized low-density lipoproteins **(*Neuzil and Stocker*, 1994)**.

T-2 toxin is some of the most important and toxic trichothecene mycotoxin occurring in various agriculture products **(*Iwahashi et al*. 2008)**. Lipophilic nature of T-2 toxin suggests that they are easily absorbed through skin, gut, and pulmonary mucosa **(*Bunner and Morris*, 1998)**. Trichotecene causes multiorgan effect including emesis, and diarrhea, weight loss, nervous disorders, cardiovascular alterations, immunodepression, hemostatic derangements, skin toxicity, and bone marrow damage **(*Wannemacher and Neufeld*, 1991)**.

The aim of the present study was to determine effect of application of quercetin in various doses and single dose of T-2 toxin on concentration of albumins and bilirubin in rabbit's blood.

Materials and Methods

Animals and diet

Adult female rabbits (n = 20) and male rabbits (n = 20) of meat line M91, maternal albinotic line (crossbreed Newzealand white, Buskat rabbit, French silver) and paternal acromalictic line (crossbreed Nitra's rabbit, Californian rabbit, Big light silver) were used in experiment. Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Water was available ad libitum. Groups of adult animals were balanced for age (150 days) and body weight (4 ± 0.5 kg) at the beginning of the experiment. Adult rabbits were fed diet of a 12.35 $MJ.kg^{-1}$ of metabolizable diet (Table 2) composed of a pelleted concentrate.

Animals were divided into control group C and experimental groups (E1 – E3). Experimental groups received quercetin in injectable form at 10 $\mu g.kg^{-1}$ in E1, 100 $\mu g.kg^{-1}$ in E2 and 1000 $\mu g.kg^{-1}$ $mg.kg^{-1}$ in E3 group T-2 toxin for 90 days. T-2 toxin (Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Austria) at dose 0.08 mg per kg of body weight 72 hours before slaughter was applied.

In this animal study, institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed, and all experimental procedures involving animals were approved by the State Veterinary and Food Institute of Slovak Republic, no. 3398/11-221/3.

Table 1

Application of quercetin and T-2 toxin in rabbit blood *in vitro.*

Group	Quercetin ($\mu g.kg^{-1}$)	T-2 toxin ($mg.kg^{-1}$ of body weight, 72 hours before slaughter)
C	0	0,08
E1	10	0,08
E2	100	0,08
E3	1000	0,08

C – control group, E1 – E3 – experimental groups with various doses of quercetin and combination with T-2 toxin.

Blood sampling and analyses

After 3 mounts of intramuscular application of quercetin, rabbits were slaughtered and blood samples were obtained.

The blood serum was separated from whole blood by centrifugation at 3000g for 30 min. The concentrations of bilirubin (BR) was determined using automatic analyzer Microlab 300

(Merck®, Germany) and concentration of albumins (ALB) was determined by spectrophotometric analysis (Genesys 10, Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Statistical analyses

The data used for statistical analyses represent means of values obtained in blood collection (end of the experiment). One-way ANOVA test was applied to calculate basic statistic characteristics and for determination of significant differences between the experimental and control groups. Statistical software SIGMA PLOT 11.0 (Jandel, Corte Madera, CA, USA) was used. Differences were compared for statistical significance at the level $P< 0.05$.

Table 2

Chemical composition (g.kg^{-1}) of the experimental diet

Component	
Dry matter	926.26
Crude protein	192.06
Fat	36.08
Fibre	135.79
Non-nitrogen compounds	483.56
Ash	78.78
Organic matter	847.49
Calcium	9.73
Phosphorus	6.84
Magnesium	2.77
Sodium	1.81
Potassium	10.94
Metabolizable energy	12.35 MJ.kg^{-1}

Results and Discusion

In this study, the effect of long-term exposure of quercetin and one acute dose of T-2 toxin on selected parameters of antioxidant status of rabbits (BR and ALB) was measured from blood serum. The results are presented in figures 1 and 2. Addition of quercetin and T-2 toxin (in the end of the experiment) slightly influenced antioxidant status (BR, ALB, however differences among the groups were insignificant ($P > 0.05$).

Bilirubin has been reported as a member of the antioxidant family and is even known to have toxic effects at high concentration. The combined evidence from animal and human studies indicates that bilirubin is a major physiologic cytoprotectant and might alleviate oxidative stress in the blood **(*Sedlak and Snyder*, 2004)**. In this study we observed increase of concentration of BR in E1 group and decrease in E2 and E3 groups in comparison with the control group, but without significant differences ($P > 0.05$). In our previous study **(*Petruška et al.*, 2013)** long-term application of quercetin caused the increase of concentration of BR. ***Capcarova et al*. (2011)** found insignificant decrease of content of bilirubin after *Rhus coraria* inclusion to the diet for rabbits. In another study with T-2 toxin-contaminated diet performed on young swine ***Friend et al*. (1992)** found increase of content of bilirubin in all experimental doses. Based on the literature natural substances could slightly modify the serum bilirubin content and consequently influence antioxidant balance in the organism.

Albumins represent a very abundant and important circulating antioxidant **(*Roche et al*., 2008)**. Study of ***Bourdon et al*. (1999)** confirmed and extended the idea that serum albumin is an

important protein that presents direct protective effects. In this paper statistical analyses showed insignificant differences ($P > 0.05$) in the content of ALB between the control group and experimental groups (E1, E2 and E3). Lower content of ALB was observed in all experimental groups compared to the control group. Similar results found ***Raymond et al*. (2003)** in experiment with *Fusarium* mycotoxins added to the feed for horses. In our previous study slight decrease in the content of serum albumins in quercetin groups vs. control group of rabbits was noted, **(*Petruška et al*., 2013)**. In another study, ***Bergsjo et al*. (1993)** reported significant decrease in serum albumin, in the pigs fed by mycotoxin deoxynivalenol from contaminated oats. In studies with *L. fermentum*, *E. faecium* and *Rhus coriaria* to the feed mixture for chickens and rabbits significant increase in content of ALB in experimental groups in comparison with the control group was measured **(*Capcarova et al.*, 2010*; Capcarova et al*., 2011)**. Several lines of evidence strongly suggest that a reduced serum albumin concentration, although within the normal range, is associated with mortality risk **(*Bourdon et al*., 1999).**

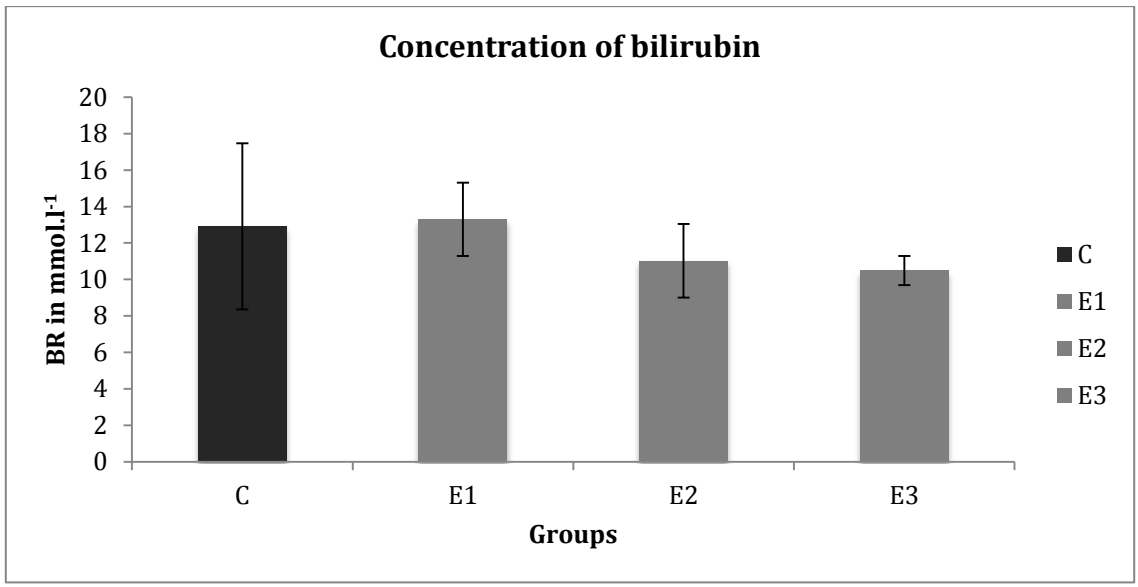


Figure 1.

The content of bilirubin in rabbits blood after chronic quercetin and acute dose of T-2 toxin application.

C – control group, E1 - 10 μg.kg^{-1}, E2 - 100 μg.kg^{-1}, E3 - 1000 μg.kg^{-1}of quercetin. T-2 toxin was added to all groups 72h before slaughtered at dose 0,08 mg.kg^{-1}. Values are means ± SD.

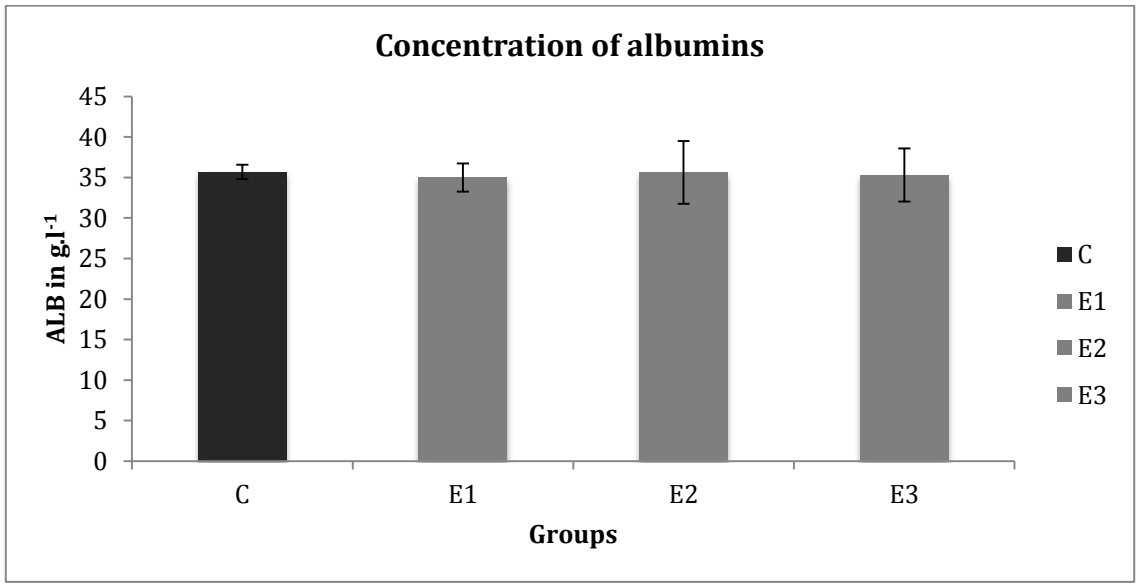


Figure 2.

The content of albumins in rabbits blood after chronic quercetin and acute dose of T-2 toxin application.

C – control group, E1 - 10 µg.kg^{-1}, E2 - 100 µg.kg^{-1}, E3 - 1000 µg.kg^{-1}of quercetin. T-2 toxin was added to all groups 72h before slaughtered at dose 0,08 mg.kg^{-1}.Values are means ± SD.

Conclusion

The intramuscular application of the quercetin three times a week to the rabbits and addition of T-2 toxin in acute dose 72 hours before slaughtered resulted in some changes in internal milieu of experimental animals. Application of quercetin and T-2 toxin insignificantly changed the content of bilirubin in experimental groups in comparison with the control group. In content of serum albumins we observed decrease in all experimental groups but without significant differences. To our knowledge, there are not a lot of similar studies concerning the effect of intramuscular application of quercetin and addition of T-2 toxin and its effect on antioxidant status of rabbits. Research on the field of quercetin will be worthy of further investigation.

Acknowledgments

This work was financially supported by VEGA scientific grant VEGA 1/0084/12 and 1/0022/13 and KEGA 030 SPU-4/2012.

References

Bergsjo, B.W., Langseth, I., Nafstad, J.H., Jansen H., Larsen J. (1993): The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. Veterinary Research Communications. 17. 283–294.

Bourdon, E., Loreau, N., Blache, D. (1999): Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. FASEB Journal. 13. 233–244.

Bunner, D.L., Morris, E.R. (1998): Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin, an important mechanism of action. Toxicology and Applied Microbiology, 92. 113-121.

Capcarova, M., Slamecka, J., Abbas, K., Kolesarova, A., Kalafova, A., Valent, M., Filipejova, T., Chrastinova, L., Ondruska, L., - Massanyi, P. (2011): Effect of dietary inclusion of Rhus coriara on internal milieu of rabbits. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 96. 459-465.

Capcarova, M., Weis, J., Hrncar, C., Kolesarova, A., Pal, G. (2010): Effect of *Lactobacillus fermentum* and *enterococcus faecium* strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 94. 215-224.

Durand, P., Lussier-Caca, S., Blache, D. (1997): Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthe- sis and macrophage-derived tissue factor activity in rats. FASEB Journal 11, 1157–1168.

Formica, J.V., Regelson, W. (1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and Chemical Toxcology, 33, 1061–1080.

Friend, D.W., Thompson, B.K., Trenholm, H.L., Boermans, H.J., Hartin, K.E., Panich, P.L. (1992): Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. Canadien Journal of Science. 72. 703-711.

Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55.481-504.

Cha, M.K., Kim, I.H. (1996): Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. Biochemical and Biophysical Research Communications. 222. 619–625.

Iwahashi, Y., Kitagawa, E., Iwahashi, H. (2008): Analysis of mechanisms of T-2 toxin toxicity using yeast DNA Microarrays. International Journal of Molecular Sciences. 9. 2585-2600.

Murota, K. Terao, J. (2003): Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorbtion and metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics. 417. 12-17.

Neuzil, J., Stocker, R., (1994): Free and albumin bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoproteinlipid peroxidation. Journal of Biological Chemistry. 269. 16712–16719.

Petruška, P., Kalafová, A., Kolesárová, A., Zbyňovská, K., Latacz, A., Capcarová, M. (2013): Effect of cronic application of quercetin on content of serum bilirubin and albumins od rabbits. (In press).

Raymond, S.L., Smith, T.K. Swamy, H.V.L.N. (2003): Effects of feeding a blend of grains naturally contamined with Fusarium mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. Journal of Animal Science. 81. 2123-2130.

Rice-Evans, C.A. Miller, N.J. Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 20. 933–956.

Roche, M. Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E. (2008): The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Letters. 582. 1783–1787.

Sedlak, T.W., SNYDER, S.H. (2004): Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. Pediatrics. 113. 1776–1782.

Wannemacher, R.W.Jr., Bunner, D.L., Neufeld, H.A. (1991): Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals, Smith JE, Henderson RS, eds. Mycotoxins and Animal Foods. Boca Raton, Fla: CRC Press 499–552.

POROVNANIE OBSAHU MINERÁLNYCH LÁTOK V RÔZNYCH KRMIVÁCH PRE DOJNICE

COMPARISON OF THE MINERAL CONTENT IN DIFFERENT RUMINANT FEEDS.

SKALICKÁ Magdaléna, MASKAĽOVÁ Iveta

Ústav výživy, dietetiky a krmovinárstva, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Abstract

The aim was evaluation of the quality of feeds for the cows on the micro mineral content (Cu, Zn, Mn) of the different geographical areas of Slovakia. Feed samples – corn silage, alfalfa silage and grass silage, TMR – total mixed ration, and alfalfa came from high - production dairy farms. In samples of plant origin was determined average levels of copper, zinc, and manganese according to the methodology used by the Official lists methods and laboratory diagnosis of food and feed (Bulletin of the Ministry of Agriculture of the Slovak Republic, 2004). The detected levels of mineral contents in feed for dairy cows were compared with the recommended values according to NRC (2001).

Key words: feeds – corn silage, grass silage and alfalfa silage, alfalfa (*Medicago sativa)*, zinc, copper, manganese, AAS

Úvod

Významnú úlohu vo výžive vysoko produkčných dojníc zohrávajú mikroprvky – meď, zinok a mangán. Zúčastňujú sa na aktivácii enzýmov dôležitých pre látkovú výmenu. Ich využiteľnosť z krmiva môže byť zmenená rozdielnym zastúpením tráv, ďatelinovín a bylín, ale tiež intenzitou a spôsobom hnojenia porastov. Koncentrácia minerálov v rastlinách závisí od štyroch faktorov: genotyp rastlín, pôdne prostredie, klíma a štádium zrelosti. Zinok, meď a mangán patria medzi esenciálne prvky, ktoré sú súčasťou viacerých životne dôležitých metabolických dejov. V rámci intermediálneho metabolizmu majú tieto prvky vzájomne negatívne aj pozitívne vzťahy. Pozitívnych väzieb (Mn - Zn) je menej, než antagonistických väzieb (Zn-Cu), vápnik inhibuje absorpciu zinku a mangánu (Shajhalal a kol., 2008, Khan a kol., 2008, Wilde, 2006, Slavík a kol., 2005). Dostupnosť zinku pre rastliny výrazne závisí na textúre pôdy, zastúpení organickej hmoty, hodnote pH, množstve fosforu a aktuálnom počasí. Častý je výskyt sekundárneho deficitu zinku u zvierat pri nadmernom obsahu Ca, P a kyseliny fytínovej v kŕmnych dávkach. Nedostatok mangánu v pôde sa vyskytuje po silnom vápnení. Do rastlín sa mangán dostáva z pôdy vo forme katiónov. Pri nedostatku medi v rastlinných bunkách sa zvyšuje obsah voľných dusíkatých látok. Dôležitú úlohu má meď pri syntéze lignínu, ktorý spevňuje bunkovú stenu. Hospodárske zvieratá obvykle získavajú väčšinu minerálnych látok z krmív a ich príjem je ovplyvnený faktormi, ktoré určujú obsah minerálov z rastlín a ich semien. Význam týchto faktorov je ovplyvnený interakciami s uvedenými faktormi a aspektmi plodín alebo pastviny, vrátane použitia hnojív, pôdnych zmien, zavlažovanie, striedanie plodín (Suttle , 2010). Pri hodnotení krmív nás zaujímalo aj hodnotenie obsahu minerálnych živín v objemových krmivách určených pre kŕmne účely hovädzieho dobytka.

Materiál a metodika

V sledovaných chovoch vysoko-produkčných dojníc boli analyzované vzorky objemových krmív - žľabové vzorky TMR, kukuričná siláž, senáž lucernová, senáž trávna a lucerna siata na obsah medi, zinku a mangánu. Na stanovenie minerálnych látok vo vzorkách rastlinného materiálu bola použitá metodika, ktorú uvádza Zoznam úradných metód a laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (Vestník MPSR, 2004).Vzorky krmiva boli spracované technológiou mikrovlnného rozkladu za

prítomnosti nízko vriacich kyselín(HCl, HNO_3) v mineralizačnom systéme MLS-1 200 MEGA, fy Milestone. Cu, Zn a Mn sa analyzovali použitím plameňovej metódy na AAS, Solar 939, fy Unicam.

Výsledky a diskusia

Kvalita objemových krmív je rozhodujúcej miere ovplyvnená poveternostnými podmienkami, pôdnym potenciálom a štádiom zrelosti jednotlivých druhov rastlín. Odobraté vzorky objemových krmív z vybraných lokalít boli podrobené laboratórnej analýze na stanovenie minerálnych látok – Cu, Zn, Mn . Obsah stopových prvkov v krmivách sa riadi geochemickým charakterom pôdy a druhu rastlín, okrem klimaticko poľnohospodárkych podmienok. Viacerí autori sa zaoberali výskytom stopových prvkov v krmivách a sérach dobytka z rôznych klimatických podmienok (Shahjalal a kol., 2008, Mandal a kol., 2004, Ramana a kol 2001) a zistili nízky obsah medi v trávach a senách.

Zistené priemerné množstvá medi, zinku a mangánu v kukuričnej, lucernovej, trávnej siláži a lucerne siatej sú uvedené v tabuľkách č. 1 a 2.

Tab.č.1.

Zistený priemerný obsah Cu, Zn a Mn (ppm) v objemových krmivách v roku 2011

	Kukričná siláž	Lucernová siláž	Trávna siláž	Lucerna siata
	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s
Cu	9.80 ± 4.70	9.67 ± 4.39	8.10 ± 4.83	15.38 ± 3.13
Zn	55.99 ± 34.61	57.52 ± 27.51	53.60 ± 30.10	121.38 ± 33.01
Mn	40.44 ± 18.76	69.89 ± 23.98	84.03 ± 28.88	33.14 ± 6.55

Kukuričná siláž má nezastupiteľne miesto v kŕmnych dávkach pre dojnice. Patrí medzi ľahko stráviteľné sacharidové krmivo. V kukuričnej siláži sa analyzované obsahy medi, zinku a mangánu pohybovali v rozpätí: meď 3,85 – 20,34 ppm, zinok 8,69 – 187,18 ppm a mangán 11,52 – 84,99 ppm. Nami zistené priemerné obsahy medi (9,80 a 11,02 ppm), zinku (55,99 a 51,77 ppm) a mangánu (40,44 a 41,98 ppm) v kukuričnej siláži sú v porovnaní s uvedenými hodnotami v NRC (2001) vyššie (24 ppm Zn, 36 ppm Mn, 6 ppm Cu). Rogers a kol. (2001) v írskej kukuričnej siláži zistili nižšie množstvá medi (5,11 ppm), zinku (26,61 ppm) a mangánu (25,61 ppm) v porovnaní s hodnotami, ktoré sme zistili v kukuričnej siláži zo slovenských chovoch dojníc.

Tab.č.2.

Zistený priemerný obsah Cu, Zn a Mn (ppm) v objemových krmivách v roku 2012

	Kukričná siláž	Lucernová siláž	Trávna siláž	Lucerna siata
	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s
Cu	11.02 ± 6.07	13.78 ± 6.16	13.02 ± 6.88	15.52 ± 7.31
Zn	51.77 ± 41.94	75.04 ± 49.30	58.13 ± 31.68	54.06 ± 27.80
Mn	41.98 ± 14.95	101.40 ± 77.20	107.2 ± 67.00	54.29 ± 13.85

Lucerna siata patrí medzi naše najcennejšie krmoviny. Z hľadiska pomeru živín sa radí k bielkovinovým krmivám. Jej kvalita vo veľkej miere závisí od fenologickej fázy rastu v čase zberu a podielu listov a byli. Listy majú relatívne konštantné zloženie až do začiatku kvitnutia a obsahujú viac minerálnych látok ako byle. Pokosenú zelenú hmotu lucerny je možné využiť ako na priame skrmovanie, tak na výrobu siláže resp. sena. Najnižšie množstvo medi v sledovaných silážach bolo zistené v lucernovej siláži 3,13 ppm a maximálne zistené množstvo medi bolo v lucerne siatej 31,07 ppm. V lucernovej, trávnej siláži a lucerne boli zistené maximálne množstvá zinku 157,20 ppm, 105,40 ppm a 118,90 ppm. Prítomnosť mangánu v lucernovej a trávnej siláži bol rozpätí 69,89 - 107,20 ppm. Lucerna siata vykazovala oveľa nižšie hodnoty mangánu (33,14-51,29 ppm sušiny) v porovnaní so silážami. Podobné priemerné množstvá medi (10,36 ppm) a mangánu (103,45 ppm) zaznamenali Rogers a kol. (2001) v írskych trávových silážach. Juráček a Bíro (2010) uvádzajú vyšší

obsah Cu s nižší obsah Zn a Mn u lucernových siláží po prídavku chemického konzervanta - kyseliny mravčej. Shahjalal a kol. 2008 prezentovali vo svojich prácach mikro minerálny obsah u krmív z rôznych klimatický podmienok, kde zistili nízky obsah medi. Ich zistené priemerné hodnoty Cu, Zn a Mn boli 6,12ppm, 291,3 ppm a 224,9 ppm. Obsahy Zn a Mn boli vyššie v porovnaní nami zistenými hodnotami. Vyššie priemerné koncentrácie Cu (27,9 ppm), Zn (31,00 ppm) a Mn (101,0) v trávach zaznamenali Ramana a kol. (2001).

Výsledky minerálnych rozborov kompletných miešaných kŕmnych dávok (TMR) pre produkčné dojnice podľa fáz produkcie sú uvedené v tabuľke 3 a 4. Príprava krmiva je dôležitý moment, ktorý rozhoduje o efektívnosti chovu. Každá zo základných živín vrátane minerálnych látok má svoju dôležitosť a môže byť limitujúcim prvkom úspešnosti chovu. Reakcie organizmu dojníc na prípadné nedostatky či prebytky, nepomery živín sa prejavia oveľa neskôr alebo sa prehliadnu. Priemerné zistené obsahy medi v roku 2011 a 2012 v TMR vo fáze pred otelením boli 18,02 a 20,12 ppm, po otelení 22,68 a 19,95 ppm, v TMR vo vrchole laktácie bol obsah 22,49 a 19,80 ppm. Vo fáze pred otelením bolo zistené v TMR priemerné množstvo zinku (70,93 a 100,43ppm) a mangánu (84,81 a 103,24 ppm). Mierne zvýšenie priemerného obsahu zinku a mangánu v porovnaní s tolerančnými hodnotami udávanými NRC (2001) sa zistili v TMR vo fáze po otelení (Zn 95,10 a 109,35ppm , Mn 85,87 a 101,22 ppm). V TMR určenej pre dojnice vo vrchole laktácie sa obsahy zinku (95,24 a 405,29 ppm) a mangánu (91,06 a 97,63 ppm) pohybovali v tolerančných hodnotách podľa NRC (2001). Skalická a kol. (2010) zistili skoro rovnaké priemerné množstvá medi a mangánu zistili v analyzovaných TMR v produkčných fázach, a vyššie hodnoty zinku (pred otelením 117,59 ppm , po otelení 134,79 ppm a vo vrchole 132,49 ppm) v porovnaní s rokmi 2011 a 2012.

Tab.č.3.

Priemerný obsah medi, zinku a mangánu (ppm) v TMR podľa fáz produkcie (2011).

TMR	pred otelením x ± s	po otelení x ± s	vrchol laktácie x ± s
Cu	18.02 ± 11.91	22.68 ± 17.56	22.49 ± 17.93
Zn	70.93 ± 27.45	95.10 ± 18.01	95.24 ± 23.05
Mn	84.81 ± 30.81	85.87 ± 23.44	91.06 ± 23.44

Tab.č.4.

Priemerný obsah medi, zinku a mangánu (ppm) v TMR podľa fáz produkcie (2012).

TMR	pred otelením x ± s	po otelení x ± s	vrchol laktácie x ± s
Cu	20.12 ± 10.95	19.95 ± 10.60	19.80 ± 5.14
Zn	100.43 ± 55.56	109.35 ± 47.89	105.29 ± 38.92
Mn	103.24 ± 49.98	101.22 ± 39.60	97.63 ± 38.84

Záver

V sledovaných rokoch sme zaznamenali vyšší obsah zinku a mangánu v sledovaných silážach - kukuričná, lucernová a trávna. Podobne aj v lucerne siatej sme zistili vyššie množstvo medi, zinku a mangánu v porovnaní doporučenými hodnotami podľa NRC 2001. Priemerné zistené obsahy medi, zinku a mangánu v TMR sa pohybovali v tolerančných hodnotách podľa NRC (2001). Chov dojníc je ovplyvňovaný kvalitou spotrebovaných krmív. Správne zladený program fázovej výživy minimalizuje metabolické problémy dojníc. Výživarské tabuľky uvádzajú potrebu jednotlivých marko a mikroprvkov pre zvieratá. Kvôli antagonistickým vzťahom a vysokému zaťaženiu organizmu vysoko produkčných dojníc by sa mala vo výžive dojníc doporučovať dávka minerálnych látok.

Literatúra

Vestník MP SR, 2004: Zoznam úradných metód a laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, XXXVI, Január 9, 3 – 339.

Illek, J., 2006: Současné trendy diagnostiky poruch zdraví a produkčních onemocnení dojníc. *Zborník prednášok Dni výživy a veterinárnej dietetik VII*, Sept.13 – 14, Košice, 27-30.

Juráček, M., Bíro, D., 2010: Vplyv chemických aditív na obsah minerálnych látok v lucernových silážach. *Zborník prednášok Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky IX*., Sept. 3, Košice, CD, 21-25.

Khan, Z.I., Ashraft, M., Ahmaad, K., Javed, I.,Valeem, E:E., 2008: A comparative study on mineral status blood plasma of small ruminanta and pasture in Punjab – Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* vol.40, 1439 – 1151.

Mandal, A.B., Yadav, P.S., Kapoor, V., 2004: Mineral prodile and their retention in lactating cows in relation to soil, fodder and feed in Kamrup district of Assam. *Indian Journal Animal Science*, 71,421-429.

NRC 2001, Nutrient of requirements of dairy cattle. Seventh revised edition. 2001, National Academy Press. Washington, D.C. , pp: 401, ISBN 0-309-06997-1.

Suttle, N.F., 2010: Mineral nutrition in livestock, 4th edition, British Library, London, UK, p. 5-113.

Ramana, J.V., Prasad, C.S., Gowda, N.K., 2001: Mineral prodile of soil, feed, fodders and blood samples of animals in northern dry and northern transition zones of Karnataka. *Indian Journal Dairy Science*,54,40-46.

Rogers, P., Murphy, J., Kavanagh, S., 2001: Bovine mineral – vitamin balalncers for Irish maize silage. Grange research centre, Dunsay, Co. Meath, Ireland. Dostupné na internet http://homepage.eircom.net/~progers/maizesil.htm

Shahjalal, M., Khaleduzzaman, A.B.M., Khandaker, Z.H., 2008: Micro mineral profile of cattle in four selected areas of Mymensingh district. *Bang. Journal of Animal Science*, 37,44-52.

Slavík P., Škorič M., Illek J., Zelený J., Brožková M., 2005: Zásobení mikroprvky u masného skotu v regionu Šumava. *Veterinářství* 55, : 636-641

Skalická, M., Maskaľová, I.,Vajda, V., 2010: Vzťah úrovne výživy a úrovne minerálneho metabolizmu v peripartálnej a produkčnej fáze dojníc. *Zborník prednášok Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky IX*., Sept. 9, Košice, 73-76.

Wilde, D., 2006: Influence of macro and micro minerals in the peri – parturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, vol. 96: 204 – 249.

Práca bola realizovaná podpory projektu VEGA 1/0773/11

THE EFFECT OF CRUDE GLYCEROL ON CANINE SPERMATOZOA MOTILITY

Tomáš Slanina[1], Leila Kichi[1], Michal Miškeje[2], Ida Petrovičová[2], Anton Kováčik[1], Grzegorz Formicki[3], Peter Massányi[1]

[1]Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, SK–949 76 Nitra, Slovak Republic
[2]Constantine the Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology and Anthropology, Nábrežie mládeže 91, SK–949 74 Nitra, Slovak Republic
[3]Pedagogical University, Institute of Biology, Department of Animal Physiology and Toxicology, ul. Podchorążych 2, PL – 30-084 Kraków, Poland
slaninatomas@atlas.sk

Abstract
The target of this study was to analyse the effect of different crude glycerol concentrations: GA – 0.11 ml.ml^{-1}, GB – 0.027 ml.ml^{-1}, GC – 0.0069 ml.ml^{-1}, GD – 0.0017 ml.ml^{-1} on the canine spermatozoa motility parameters after an *in vitro* cultivation at 5°C. Semen samples diluted with physiological solution were used as the control. Individual motility parameters were recorded at five time periods: 0, 1, 2, 3, 4 hours and evaluated using Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system. A significantly lower ($p<0.001$) values of spermatozoa motility were detected at the beginning of cultivation only in the samples GA. At times of 1, 2, 3, 4 significant decrease ($p<0.001$) of spermatozoa motility was observed in all experimental groups compared to the control. Spermatozoa progressive motility followed the tendency of spermatozoa motility. Progressive motility in the control sample ranged between 68.80 and 81.46%. In the experimental groups, progressive motility ranged from 0 to 72.39%. The parameter of velocity curved line showed significantly ($P<0.001$) decreasing values between experimental samples and the control ($P<0.001$) from time 1 to the end of cultivation to. Results of this work clearly describe the negative effect of high glycerol concentrations on canine spermatozoa motility parameters.

Key words: dog, spermatozoa, motility, CASA, glycerol

Introduction

Glycerol ($CH_3H_8O_3$), a highly permeable polyhydric alcohol, is the cryoprotector most frequently used in semen freezing in different species (*Silva et al.*, 2003). However, this cryoprotector exhibits toxic effects on spermatozoa, such as physicochemical alterations that can lead to rupture of the plasma membrane or removal of important membrane proteins, as well as cause acrosomal damage, which will be reflected in reduced fertility (*Curry, 2000; Holt, 2000*). Since glycerol has a relative high molecular weight (92 kDa) and does not readily penetrate into the spermatozoa membrane, it causes tremendous osmotic stress during the thawing procedure, because it is easily removed from the cell membranes (*Squires et al.*, 2004).

The ideal concentration of glycerol in the extender represents a balance between its toxicant and protecting effects; high concentrations can also affect the fertilizing capacity of the spermatozoa (*England, 1993; Silva et al., 2003*). However, the sensitivity of spermatozoa to glycerol is highly species dependent (*Schäfer-Somi et al.*, 2006).

The aim of this study was to analyse the influence of different crude glycerol concentrations on canine spermatozoa motility parameters during short *in vitro* cultivation.

Material and Methods

In this study semen was obtained from sexually mature male of five large dog breeds: Boxer, Border collie, Rottweiler, Greyhound and Husky. Semen was diluted in a ratio of 1 part of semen and 10 parts of physiological solution (Sodium chloride 0.9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) – Control sample C. In the same ratio the semen was diluted with four different concentration of crude glycerol solution: GA – 0.11 $ml.ml^{-1}$, GB – 0.027 $ml.ml^{-1}$, GC – 0.0069 $ml.ml^{-1}$, GD – 0.0017 $ml.ml^{-1}$ diluted in the physiological solution. Samples were cultured at 5 °C and recorded at five time periods: 0, 1, 2, 3, and 4 hours.

Characteristic used glycerol:

Crude glycerol (G) – content at least 80.06 %; NaCl content 7.15 %; water 8.0 %; methanol 0.001 %; Cd < 0.01 $mg.l^{-1}$; Pb < 0.1 $mg.l^{-1}$; Cu < 0.04 $mg.l^{-1}$; Mn < 0.03 $mg.l^{-1}$; Zn – 2.5 $mg.l^{-1}$; Fe – 15 $mg.l^{-1}$; Ni – 2.5 $mg.l^{-1}$; Co – 12.5 $mg.l^{-1}$; Cr – 7.5 $mg.l^{-1}$.

To evaluate spermatozoa motility parameters Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) system – SpermVision program (Minitube, Tiefenbach, Germany) equipped with a microscope Olympus BX 51 (Olympus, Japan) was used. Each sample was placed into Makler Counting Chamber (depth of 10µm, Sefi – Medical Instruments, Germany) and then placed in a microscopic field. Using the canine specific set up the total motile spermatozoa (MOT) and progressively motile spermatozoa (PRO) were evaluated.

Obtained data were statistically analysed with the help of the PC program Excel and a statistics package SAS 9.1 (SAS Institute Inc., USA) using Student's t–test and Scheffe's test. Statistical significance was indicated by P values of less than 0.05; 0.01 and 0.001.

Results and Discussion

Results of the spermatozoa motility are shown in *Figure 1*. The percentage of total spermatozoa motility (MOT) cultured at 5 °C in the control sample (C) was in range from 71.75 to 84.10%. In the experimental groups motility ranged from 0 to 75.95%. A significantly lower ($p<0.001$) values were detected at the beginning of cultivation only in the samples GA with concentration of glycerol 0.11 $ml.ml^{-1}$. In times of 1, 2, 3, 4 significantly decrease ($p<0.001$) of spermatozoa motility were observed in all experimental groups compared to the control group.

Spermatozoa progressive motility (PRO) followed the tendency of spermatozoa motility. Progressive motility in the control sample ranged between 68.80 and 81.46%. In the experimental groups, motility ranged from 0 to 72.39%. Statistically significant difference ($p<0,001$) was detected at the time 1 hour only between sample C and GA, where the highest progressive motility was recorded in sample C. When compared the experimental groups to the control sample, significantly lower values ($p<0,001$) were observed after 1, 2, 3, 4 hours of culture in all samples (*Figure 2*).

Analysis of velocity curved line (VCL) showed no significant differences between samples GB, GC, GD and the control at the beginning of *in vitro* cultivation (*Figure 3*). Only in the sample GA significantly lower ($P<0.001$) value was observed. However, other cultivation times showed a significant decrease ($P<0.001$) of this parameter in all experimental samples when compared to the control.

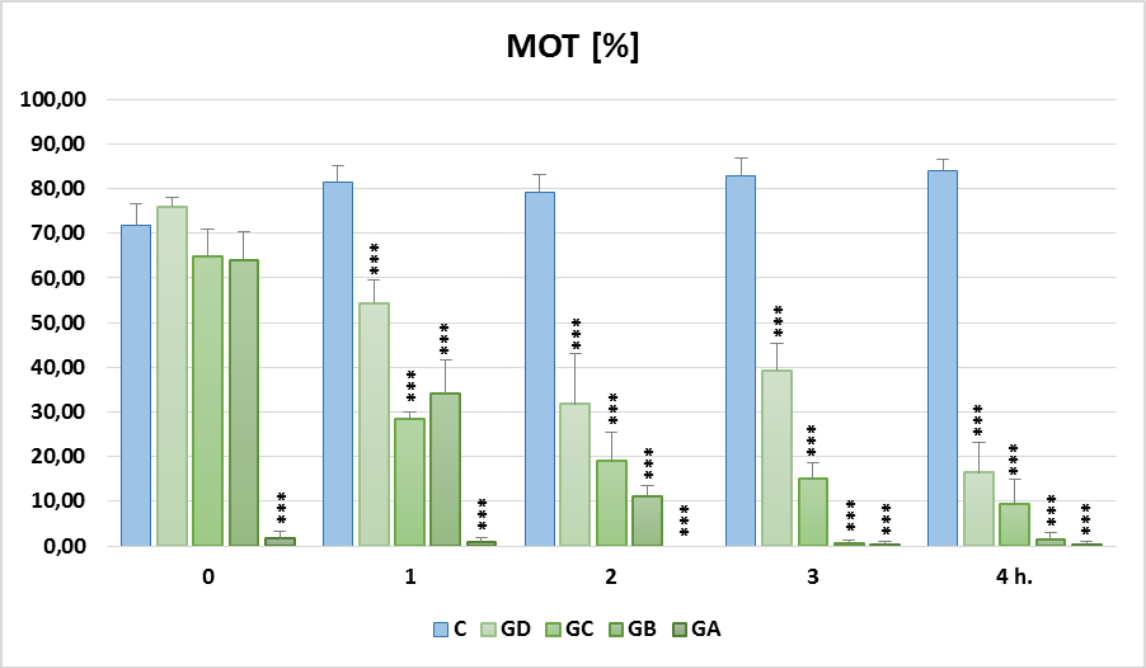


Figure 1:
Spermatozoa motility [%] in groups with different concentrations of glycerol and time periods [hours].

Significant differences *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

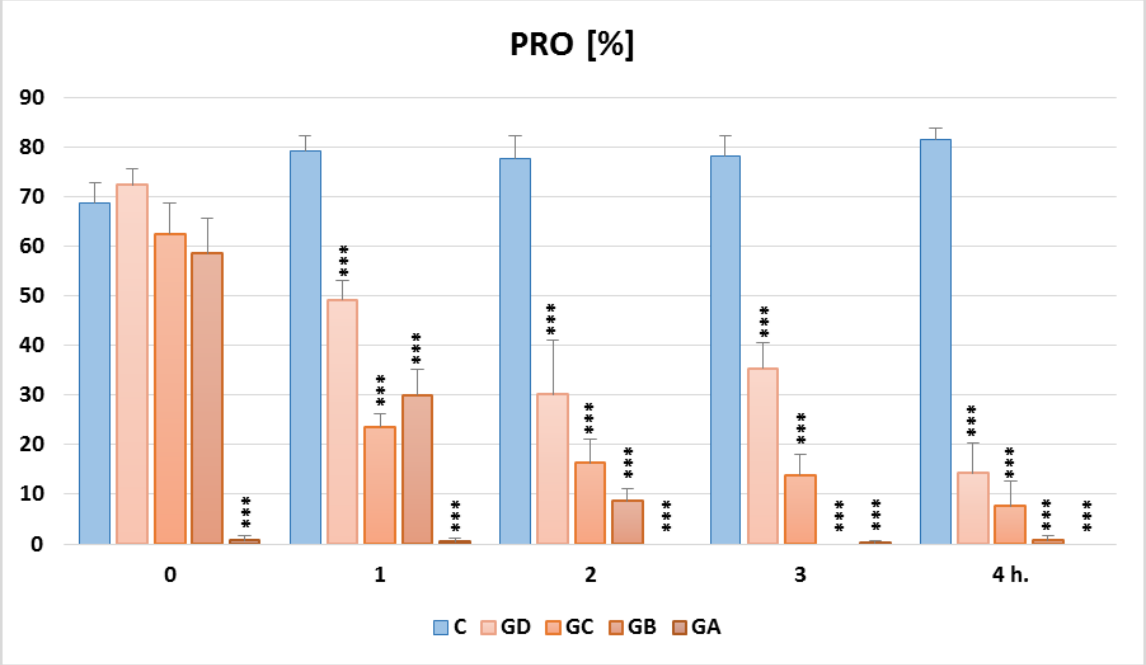


Figure 2:
Spermatozoa progressive motility [%] in groups with different concentrations of glycerol and time periods [hours].

Significant differences *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

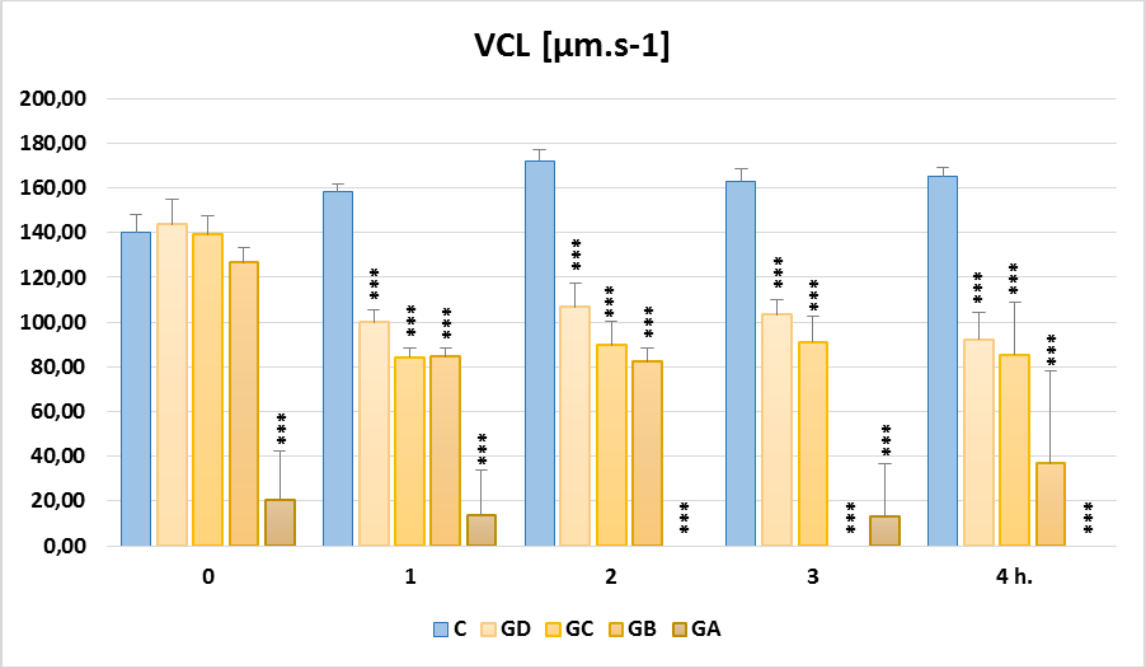


Figure 3:
Velocity curved line [µm.s^{-1}] in groups with different concentrations of glycerol and time periods [hours].

Significant differences *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

A similar tendency was detected also in other species. *Slanina et al.* (2012) evaluated the effect of crude and pure glycerol on rabbit spermatozoa motility parameters in vitro. The total spermatozoa motility and progressive motility in experimental groups, diluted with crude glycerol and pure glycerol were significantly lower compared to control group.

Glycerol has also negative effect on the velocity curved line parameter, where samples with addition pure glycerol showed a significant decrease values compare to control (*Kováčik et al., 2013*). The negative effect of high concentrations of crude glycerol on the rabbit spermatozoa motility detected also *Qoja et al.* (2011). Results of their study show some interesting outcomes – the initial addition of glycerol in higher concentration decreased immediately the spermatozoa motility, but later only a negative effect of higher crude glycerol concentration was found.

However, results of studies *Province et al.* (1984) showed that addition of glycerol to specific extenders had not negative effect on canine and equine spermatozoa motility. The inclusion of 6% glycerol depressed (P<0.05) motility of canine spermatozoa, but there was no effect (P>0.05) of glycerol concentration on the percentage of motile equine spermatozoa. For both species, the interaction of glycerol level and extender was not significant.

Conclusion

The target of this study was to analyse the effect of different crude glycerol concentrations on the canine spermatozoa motility parameters. The selected spermatozoa motility parameters (MOT, PRO and VCL) were significantly decreased in all analyzed samples from 1 hour of cultivation. This results confirmed negative effect of crude glycerol on canine spermatozoa mobility in *in vitro* conditions at 5°C.

Acknowledgements
This work was supported by a VEGA project No. 1/0532/11.

References

Curry, M.R. (2000): Cryopreservation of semen from domestic livestock. Reproduction, 5:46-52.

England, G.C (1993): Cryopreservation of dog semen: a review. Journal of Reproduction and fertility, Supplement. 47:243-255.

Holt, W.V. (2000): Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. Theriogenology, 53:47-58.

Kováčik, A., Kichi, L., Slanina, T., Massányi, P., Kročková, J., Bulla, J., Čupka, P. (2013): Use of Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) for Monitoring the Effects of Glycerol Solutions on Rabbit Spermatozoa Motility. Scientific papers Animal science and biotechnologies, 46.

Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W, Squiers, E.L. (1984): Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. Theriogenology, 22:409-415.

Qoja, A.O., Rafajová, M., Massányi, P. The effect of crude glycerol on rabbit spermatozoa motility in vitro. Animal Physiology 2011 : proceedings of scientific publication, Nitra 2011, 457–462.

Schäfer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D. and Aurich, Ch. (2006): Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Theriogenology, 66: 173-182.

Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C. and Silva, L.D.M. (2003): Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. Theriogenology, 59: 821-829.

Slanina, T., Bíziková, K., Massányi, P. (2012): The effect of glycerol on rabbit spermatozoa motility. Animal Physiology 2012 : proceedings of international conference, Lednice 2012, 187-191.

Squires, E.L., Keith, S.L. and Graham J.K. (2004): Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology, 62:1056–65.

THE EFFECT OF BISPHENOL A ON SHEEP LACTATE DEHYDROGENASE ENZYME SYSTEM *IN VITRO*

Irena ŠUTIAKOVÁ[*1], Natália KOVALKOVIČOVÁ[2], Drahomíra SOPKOVÁ[2], Zuzana KRAVCOVÁ[2], Mária TULENKOVÁ[1].*

[1]University of Prešov, Ul. 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovak Republic; e-mail: sutiakova@gmail.com
[2]University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; e-mail: kovalkovicova@uvm.sk
*Corresponding author: Assoc. prof. RNDr. Irena ŠUTIAKOVÁ, PhD., Department of Biology, Faculty of Humanities & Natural Sciences, University of Prešov, St.17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovak Republic, phone number: 098804744, e-mail: sutiakova@gmail.com

ABSTRACT
Lactate dehydrogenase (LDH) and its isoenzymes should serve both as the indicators of cell membrane integrity, as well as cell viability one, *in vitro*. Our experiments and observations of the cytotoxic effects of bisphenol A (BPA) in the culture medium of sheep (48 treatment time) were carried out at the concentrations of $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$ and $1x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$. LDH and its isozymes of the culture medium were used as an endpoint for cytotoxicity studies. The Anova tested data of our experiments showed no significant differences in the both total activity of LDH ($\mu kat.L^{-1}$) and also its isoenzymes ($\mu kat.L^{-1}$) in the culture medium of our control and experimental group after 48 exposure to BPA. Our results showed that LDH should serve as potential marker of cell injury.

Keywords: in vitro, culture medium, sheep, lactate dehydrogenase, bisphenol A, cytotoxicity

Bisphenol A (BPA), 2, 2,-bis (4-hydroxyphenyl) propane, is an industrial chemical that is made by combining acetone and phenol. It is extensively used as a monomer in the production of polycarbonate plastics and as a precursor of epoxy resins. Polycarbonate (PC) is widely used in the manufacture of food containers (e.g., milk, water and infant bottles) and epoxy resins are used as an interior protective lining for food and beverage cans (**Aschberger *et al.*, 2010**). BPA is studied mainly in relation to human and animal health. The presence of BPA in the environment can cause serious health problems (endocrine disruptions, neurotoxic, genotoxic and other problems) (**Wu *et al*., 2013; Renz *et al*., 2013; Loganathan and Kannan, 2011**). **Yan *et al.*, (2013)** investigated the acute effects of BPA on ventricular arrhythmias and infarction in rat hearts. Authors stated that in addition to endogenous pathophysiological conditions, have also important role the environmental chemicals in these diseases.

There are different methodological approaches in toxicological research to identify hazards and to verify the processes which influence the expression of response of living organism to pesticides, different xenobiotics and food-associated chemicals (**Eisenbrand *et al.*, 2002**). The damages caused by xenobiotics depend on their bioavailability, metabolism and on other factors (e.g. as is tissue turn-over rate etc.). At low and intermediate concentration of xenobiotics they may impair specific functions. In contrast at high concentration of agents they cause general cytotoxicity and cell death (**Camatini *et al.*, 1996**). *In vitro* toxicological studies are very important and relevant endpoints. These endpoints have been established in many cell types which determine, for example the membrane permeability changes. Intracellular lactate dehydrogenase (EC. 1.1.1.27), L-(+)-lactate: NAD^+ oxidoreductase (LDH) leakage is a well known indicator of cell membrane integrity and cell viability (**Legrand *et al.*, 1992).** LDH catalyses the intraconversion of pyruvate and lactate and is involved in both the catabolism and anabolism of carbohydrates. In addition to metabolic roles in cells includes in a number of other biological processes (**Powers *et al.*, 1991**). In animals LDH was found to be a tetrameric molecule, which exists in five different isoenzymes LDH 1 – LDH 5. There are at least two gene duplication events which have led to three genetically subunits. LDH-A or M

(muscle)-type, LDH-B or H (heart)-type and LDH-C or X-type are known in vertebrates and each species has different physico-chemical properties, biological function and development regulations (**Kopperschläger and Kirchberger, 1996**).

The present studies comprised *in vitro* analyses of the potential cytotoxic effect of BPA in the blood of sheep on the basis of LDH and isoenzymes, released into culture medium.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals – culture medium

BPA, synonyms: [2, 2-Bis (4-hydroxyphenyl) propane], 4, 4'-Isopropylidene-diphenol, with formula $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$, molecular weight 228.29, CAS No. 80-05-7 (Sigma-Aldrich, USA). BPA was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and was freshly prepared before each experiment at concentrations of: $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$ and $1x10^{-7}$ mol.L^{-1}. The final concentration of DMSO in the cultures was 0.5%. The tested substances were added at 24 h after culture initiation and left until the end of cultivation (48 h treatment time). Cytochalasin-B (Cyt-B, CAS No. 14930-96-2), mytomycin C (MMC, CAS No. 50-07-7), DMSO, (CAS No. 67-68-5), and penicillin G (benzyl penicillin sodium salt; CAS No. 200-710-2) were obtained from Sigma, USA. Streptomycin (streptomycin sulphate salt; CAS No. 3810-74-0) was obtained from Sigma-Aldrich, USA. Cyt-B was dissolved in DMSO. MMC at a final concentration of 0.25 µg.mL^{-1} was dissolved in distilled water and served as the positive control to ensure the validity of the assay. Chromosome medium serum-free Panserine 701, CAS No. P0-710701 M, and 7.5% $NaHCO_3$ were obtained from PAN Systems GmbH, Biotechnologische Producte, Germany. Heparin (heparinum natricum) was obtained from Zentiva, a. s., Czech Republic.

Assay of Total LDH activity

The concentration of total LDH (µkat.L^{-1}) activity was assessed using commercial diagnostic kits (Randox, United Kingdom) with automatic biochemical analyser Alizé (Lisabio, France). Before determination we mixed 300 µl of reagents (phosphate buffer with concentration 50 mmol.L^{-1} and pH 7.5; pyruvate with concetration 0.6 mmol.L^{-1}; NADH with concentration 0.18 mmol.L^{-1}) with 5 µl of sample and measuring absorbance at 340 nm.

LDH isoenzyme activity

For electrophoretic study, 10 µl of culture supernatant was used for each separation. Hydrasys device (Sebia, France) was used for the determination of LDH isoenzymes activity (µkat. L^{-1}). The samples were separated using commercial electrophoretic kits Hydragel 7 ISO-LDH (Ecomed, Žilina) on alkaline buffered (pH 8.4) agarose gels. Each gel contained agarose (0.8g/dL) and alkaline buffer (pH 8.40±0.05). Substrate contained phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nitro blue tetrazolium (NBT). Blocking solution contained acetic acid (5%) and citric acid (0.5%). For determination apply 10 µl of serum into the applicators, and then place the applicators into the wet storage chamber for 5 minutes. Put the gel plate into the device and start the migration at 20 °C for 8 minutes. Apply substrate solution (45 °C/ 20 minutes) and cool (20 °C/ 5 minutes). Remove the remaining substrate solution and pipette the blocking solution with incubation at 20 °C for 10 minutes. Remove the blocking solution and apply one thick filter paper and dry. The dried gels were prepared for visual examination and densitometry to obtain accurate relative quantification of individual zones. Then photographs of the gels were taken. Qualitative evaluations of the gels were done directly from the electrophoretograms and the densitometric curves of the separations were created by means of Epson Perfection V 700 Photo densitometer scanning at 570 nm. The visualization of LDH isoenzymes was performed according to the following reactions:

$$\text{Lactate} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvate} + NADH_2$$

$$NADH_2 + \text{PMS} \longrightarrow \text{Reduced PMS} + \text{NAD}$$

$$\text{Reduced PMS} + \text{NBT} \longrightarrow \text{PMS} + \text{Reduced NBT (precipitate of Formosan-blue)}$$

The amount of resulting Formosan precipitate was proportional to the LDH enzymatic activity.

Statistical Analysis

The Sigma Stat program (Statistical software™, Jandel Scientific) was employed for statistical evaluation of the results. The mean frequency of activity LDH cells and its isoenzyme were calculated based on the results of two independent experiments, and the statistically significant differences between control and treatment values were determined using analysis of variance (ANOVA) at the 95% or higher confidence level.

RESULTS

Table 1 shows the results of total LDH (μkat.L^{-1}) and its isoenzymes (μkat.L^{-1}) in the supernatant of the culture medium. The exposure of BPA caused no significant differences in total activities of this enzyme at the given concentrations. No significant differences in the activities of LDH isoenzymes were observed in the experimental group in the supernatant of the culture medium after the exposure to BPA.

Table 1.

The effect of bisphenol A on the LDH activities and on its isoenzymes of sheep in culture supernatants.

Tested substance/ Groups	Treatment period (h) Dose(M.L^{-1})	Statistical values	Total activities of LDH [μkat.L^{-1}]	Isoenzymes of LDH in sheep cultural supernatants [μkat.L^{-1}]				
				LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
DMSO, (Neg. control),	48 h	Ø ±SD SEM	2.76 1.32 0.93	1.33 0.48 0.34	0.23 0.16 0.12	0.83 0.52 0.37	0.17 0.09 0.06	0.21 0.08 0.06
Experi-ments, BPA	48 h 1x10^{-4}	Ø ±SD, SEM P	2.26 0.47 0.33 0.84	1.23 0.23 0.17 0.91	0.15 0.04 0.03 0.60	0.60 0.52 0.37 0.60	0.12 0.14 0.01 0.50	0.18 0.14 0.01 0.70
	48 h 1x10^{-5}	Ø ±SD SEM P	1.93 0.20 0.14 0.47	0.99 0.10 0.87 0.60	0.15 0.05 0.04 0.57	0.03 0.09 0.07 0.79	0.13 0.00 0.00 0.57	0.18 0.04 0.03 0.70
	48 h 1x10^{-6}	Ø ±SD SEM P	1.94 0.30 0.22 0.48	0.99 0.11 0.08 0.42	0.13 0.05 0.04 0.50	0.55 0.08 0.06 0.53	0.09 0.04 0.03 0.36	0.19 0.04 0.03 0.8
	48 h 1x10^{-7}	Ø ±SD SEM P	2.16 1.07 0.76 0.66	1.10 0.42 0.30 0.65	0.16 0.12 0.09 0.67	0.60 0.30 0.22 0.64	0.14 0.09 0.06 0.71	0.16 0.14 0.10 0.73

Comments: LDH = Lactate dehydrogenase; Ø = Mean values; ±SD = Standard deviation; SEM = Standard error mean; P = Statistical significance of results; h = hours, DMSO = Dimethylsulphoxide, BPA = Bisphenol A.

DISCUSSION

The *in vitro* viability test of the animal cell culture is used for determination the possible hazards of xenobiotics. One of the advantages of LDH activity determination in the superna-tants of cell

cultures is based on the fact that the examination reveals changes in cell viability and not in cell metabolism (**Racher *et al.*, 1990**). Our results suggest no significant release of this enzyme from the ovine blood cells into the culture medium. The assumptions are made that intracellular enzymes are only released after damage to the cell membrane and all activity is released from damaged cells into culture medium (**Goergen *et al.*, 1993**). We observed that at the concentrations of BPA decreased total activity of LDH. But on the other hand there are also other parameters that may influence the intracellular activity of LDH from other cells, as well as the pH, chemical composition of the medium and some other factors (**Geaguey *et al.*, 1990**). **Kending and Tarloff,** (**2007**) used LDH as an endpoint for cytotoxicity studies induced by several chemicals. Their studies suggest that LDH is released to the culture medium, and is susceptible to degradation when reactive chemicals are present. In our case, in the culture media were present such chemicals as is cytochalasin and also antibiotics. We simultaneously studied also the cytotoxic effect of BPA by calculating nuclear division index. In the case of nuclear division index BPA did not affect also cytotoxic index at all treatment concentrations (**Šutiaková *et al.*, 2013**). It is known that LDH is a highly sensitive but not specific marker. The function of specific indicators is performed by LDH isoenzymes, which allow us to identify the damage either to cells and tissues by different xenobiotics. The examination intracellular isoenzyme patterns allow also detect the interspecies cross-contamina-tion in culture medium (**Steube *et al.*, 1995; Nims *et al.,* 1998**). However our results did not record significant differences between control and experimental groups at the different concentrations of bisphenol A in the medium. Biochemical and molecular parameters that are specific and sensitive may be useful for identifying their influences in biosystems through certain biomarkers also in situations when they are not statistically significant (**Anderson and Barton, 1998**).

Further studies are necessary in this research because the presence of such xenobiotics as is BPA may affect the health and production of animals and health of human.

Acknowledgments

This research was supported by VEGA Grant No. 1/0287/11, (Slovakia).

REFERENCES

ANDERSEN M.E., BARTON, H.A. 1998. The use of biochemical and molecular parameters to estimate dose-response relationships at low levels of exposure. In *Environ.*
Health Perspect., Suppl. 1, 1998, p. 349-355.

ASCHBERGER, A., **CASTELLO, P., HOEKSTRA, E., KARAKITSIOS, S., MUNN, S., PAKALIN, S., SARAGIANNIS**, D.: Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspectives. JRC Scientific and Technical Reports, European Commission, EUR 24389 EN- Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, 2010, 55p. webuhttp://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14221/1/eur%2024389_bpa%20%20baby%20bottles_chall%20%20persp%20%282%29.pdf

CAMATINI, M., COLOMBO, A., BONFANTI, P., DOLDI, M., URANI, C., DIBISCEGLIA, M., NAGELKERKE, J.F. 1996. *In vitro* biological systems as models to evaluate the toxicity of pesticides. In *Int. J. Environ. Anal. Chem.,* Vol. 65, 1996, p. 153-167.

EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., BOOIS, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, J.-C., PIETERS, R., KLEINE, J., MARTIAL, A., MARC, A., WUDTKE, M., KRETZMER, G., R., J. 2002. Methods of *in vitro* toxicology. In *Food Chem. Toxicol.,* Vol. 40, 2002, p. 193-236**.**

GEAUGEY, V., PASCAL, F., ENGASSER, J.M., MARC, A. 1990. Influence of the culture oxygenation on the release of LDH by hybridoma cells. In *Biotechnol. Techn.,* Vol. 4, p. 257 – 262.

GOERGEN, J.L. MARC A., ENGASSER, J.M. 1993. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. In *Cytotechnol.,* Vol. 11, 1993, p. 189-195.

KENDING, D.M., TARLOFF, J.B.: 2007. Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies. In *Toxicol. in Vitro,* Vol. 21, 2007, p. 125-132.

KOPPERSCHLÄGER, G., KIRCHBERGER, J. 1996. Methods for the separation of lactate dehydrogenase and clinical significance of the enzyme. In *J. Chromat.,* B, Vol. 684, 1996, p. 25- 49.

LEGRAND, C., BOUR, J.M., JACOB, C., CAPIAUMONT, J., MARTIAL, A., MARC, A., WUDTKE, M., KRETZMER, G., DEMANGEL, C., DUVAL, D., HACHE, J. 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. In *J. Biotechnol.*, Vol. 25, 1992, p. 231- 243.

LOGANATHAN, S.N., KANNAN, K. 2011. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the Eastern United States and implications for human exposures. In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.,* Vol. 61, 2011, p. 68-73.

NIMS, R.W., SHOEMAKER, A.P., BAUERNSCHUB, M.A., REC, L.J., HARBELL, J.W. 1998. Sensitivity o isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. In *In vitro Cell De. Biol. Animal,* Vol. 34, 1998, p. 35-39.

POWERS, D.A., LAUERMAN, T., CRAWFORD, D., DIMICHELE, L. 1991. Genetic mechanisms for adapting to a changing environment. In *Ann. Rev. Genet.,* Vol. 25, 1991, 629-59.

RACHER, A.J., LOOBY, D., GRIFITHS, J.B. 1990. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. In *Cytotechnol.,* Vol. 3, 1990, p. 301-307.

RENZ, L., VOLZ, C., MICHANOWICZ, D., FERRAR, K., CHRISTIAN, CH., LENZNER, D., EL-HEFMAWY, T. 2013. A study of parabens and bisphenol A in surface water and fish brain tissue from the greater Pittsburgh area. In *Ecotoxicol*., Vol. 22, 2013, p. 632-641.

STEUBE, K.S., GRUNICKE, D., DREXLER, H.G. 1995. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures. In *In Vitro Cell. Dev. Biol.,* Vol. 31, 1995, p. 115-119.

ŠUTIAKOVÁ, I., KOVALKOVIČOVÁ, N., TULENKOVÁ, M. 2013. *In vitro* evaluation of the bisphenol genotoxicity in bovine peripheral lymphocytes. In 33rd International Symposium „Industrial Toxicology 2013", June 19-21. Accepted.

YAN, S., SONG, W., CHEN, Y., HONG, K., RUBINSTEIN, J., WANG, H-S. 2013. Low-dose bisphenol A and estrogen increase ventricular arrhythmias following ischemia-reperfusion in female rat hearts. In *Food Chem. Toxicol.,* Vol. 56, 2013, p. 75-80.

WU, H-J., LIU, CH., DUAN, W-X., XU, S-CH., HE, M-D., CHEN, CH-H., WANG, Y., ZHOU, Z., YU, Z-P., ZHANG, L., CHEN, Y. 2013. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. In *Mutat. Res./ Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.*, Vol. 752, 1-2, 2013, p. 57-67.

The immunological effect of heat stress in laying hens with use of apple cider vinegar, betaine and their combination in drinking water

Szabó, Cs.[1], Kerti, A[1]., Pajor, F. [2], Póti, P.[2], Bárdos, L.[1]*

[1]Department of Animal Physiology and Health, Szent István University, Gödöllő, Hungary
[2]Institute of Animal Husbandry, Szent István University, Gödöllő, Hungary
*szabo.csaba@mkk.szie.hu

Egg production and some blood parameters were investigated during high temperature in laying hens. Tetra-SL hens were kept in four groups (15 animals in each) for 47 days in a hot summer period. For the prevention of the possible heat stress additives were added to the water. The Group A was treated with apple cider vinegar (1 L 5% vinegar/100 L drinking water). The Group B with betaine (10 g/10 L drinking water) and both additives were mixed into the water of third the Group AB. The fourth group received only tap water and served as control (Group K). The environmental and pen temperature was registered. Before, during and after the heat stress period (the temperature was 15-20 ^{o}C higher than the technological adequate for a week) the number of egg laid, and some blood value (packed cell volume, PCV and titre of immunoglobulin IgY) were determined.

PCV (L / L) values decreased in all treatment groups compared to blood samples before the heat stress period. After statistical analysis, only the control group (before HS 28.4% after 25.7% HS) and apple cider vinegar-betain in the case of treatment (before HS 28.8%, 24.4% after HS) had significantly decreasing value. The hens responded to increased water consumption in the warm environment for thermoregulation. This is caused moderate hemodilution.

The 10 days of extreme heat causes decreased in all groups of IgY titers. Differences in samples taken before and after heat stress titers in betaine group had the smallest. However, significance was detected only in group AB (0.147 OD before HS after HS OD 0.127). The vinegar and betaine have no synergism in our case. The Tetra-SL hybrid can tolerate the heat stress conditions which characterised 15-20 ^{o}C higher values than the technological adequate.

Key words: heat stress, laying hen, IgY, immune status, apple cider vinegar, betain, PCV, ELISA

Acknowledgement
The authors thank the support of Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL and the project KMR_12-A 2012-0181

CHANGES OF BLOOD PARAMETERS ASSOCIATED WITH NICKEL ADMINISTRATION IN RATS

Toman Robert[1], Lukáč Norbert[2], Massányi Peter[2], Hajková Zuzana[1]*

[1]Slovak University of Agriculture, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia
[2]Slovak University of Agriculture, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia
*robert.toman@uniag.sk

Abstract

The aim of this work was to analyze the biochemical parameters of blood plasma in rats after intraperitoneal and peroral administration of nickel. Experimental group E1 was administered by nickel at a dose of 15 mg/kg, group E2 with 25 mg/kg and the group E3 with 35 mg/kg b.w. intraperitoneally (i.p.). After 48 hours, the blood samples were collected for biochemical analysis. Group E4 was dosed with nickel at a concentration of 100 mg/L in drinking water for 90 days. The parameters of mineral profile (Ca, P, Mg, Na. K and chlorides) and other parameters of energy, nitrogen and enzymatic profile (glucose, cholesterol, total proteins, triglycerides, urea, bilirubine, AST, ALT, ALP, GLDH) were measured. The most affected elements were potassium and calcium. Calcium concentration decreased significantly in group E1, E3 ($P<0.05$) and E4 ($P<0.01$). Concentrations of potassium decreased significantly in groups E1, E2 and E3 ($P<0.05$) and E4 ($P<0.01$). Mg concentration decreased in group E2 and E4 ($P<0.05$) and chlorides decreased only in i.p. groups E1 ($P<0.05$) and E3 ($P<0.01$). Analysis of nitrogen and energy profile showed a significant increase in concentrations of urea (group E1, $P<0.05$ and group E3, $P<0.01$), glucose (groups E2, E3, E4, $P<0.05$), and decrease in total proteins (group E1, $P<0.01$ and group E4, $P<0.01$), cholesterol (groups E2 and E4, $P<0.05$), bilirubine (all experimental groups, $P<0.05$) and triglycerides (group E1, E3, $P<0.05$ and group E2, $P<0.01$). Changes in enzymatic activity were as follows: activity increased in AST (group E3, $P<0.05$), ALT (group E1, $P<0.05$ and group E3, $P<0.01$), ALP (group E1, $P<0.01$ and groups E2, E3, E4, $P<0.05$), and GLDH (group E4, $P<0.05$). The results showed that nickel may have negative effects on the metabolism due to the disruption of certain metabolic processes. Decreased concentrations of mineral elements along with the parameters of energy and nitrogen profile suggest the renal dysfunction. Influence of enzymatic activity is sign of hepatocellular injury and liver functions. Nickel is capable to affect the metabolic processes and organ functions after an intraperitonal and also peroral exposure.

Keywords: nickel, blood serum, biochemical profile, rat

Introduction

Nickel (Ni) is the 24th most abundant element and the earth's core is composed of 6 % of this metal. It is used in stainless steel products, nickel plating, to color ceramics, in batteries and other industrial applications (*ATSDR*, 2005). *Anke et al.* (1984) discussed the nickel essentiality for living systems and stated that low nickel offers reduce growth particularly during an intra-uterine development. Nickel deficiency is accompanied by histological and biochemical changes and reduced iron resorption and leads to anaemia. Nickel therefore performs a vital function in metabolism. However, the increasing utilization of heavy metals in modern industries leads to an increase in the environmental burden.

Nickel represents a good example of a metal whose use is widening in modern technologies. Its accumulation in the environment may represent a serious hazard to human health. Food is the major source of exposure to nickel but only about 1% is absorbed after the nickel intake in food. A human study shows that 40 more nickel was absorbed from the gastrointestinal tract when $NiSO_4$ (nickel sulphate) was given in the drinking water than when it was given in food (*Sunderman et al.*, 1989). When administered in water, significant elevations in nickel levels were found in the small intestine of mouse after 8 weeks of exposure. In

the kidneys, the nickel levels were only significantly higher than controls after 20 weeks of administration (*Radike et al.*, 2002). Skin allergies, lung fibrosis, kidney diseases, cardiovascular system damage, hematopoiesis disorder and stimulation of neoplastic transformation are the well-known health effects of nickel (*Denkhaus and Salnikow*, 2002, *Oller et al.*, 2008, *Hfaiedh et al.*, 2008, *Adjroud and Mouffok*, 2009, *Adjroud*, 2013).

Nickel compounds have been implicated in the etiology of human lung cancer. They activate hypoxia signaling pathways. The mechanism of this effect involves the ability of either soluble or insoluble nickel compounds to block iron uptake leading to cellular iron depletion or/and directly affect iron containing enzymes. This can lead to activation of hypoxic signaling (*Costa et al.*, 2005). The relative carcinogenic activity of nickel compounds is related to their water solubility (*Coogan et al.*, 1989). One of the major intracellular targets of nickel ions in the cell is the iron- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family of enzymes (*Chervona et al.*, 2012).

Nickel chloride also acts on cellular metabolism and in particular on erythrocyte glutathione peroxidase with consequent increase in oxidative stress. A significant decrease in intracellular glutathione in both human (25%) and fish erythrocytes (18%) after treatment with nickel chloride has been reported (*De Luca et al.*, 2007). Alteration in blood biochemistry caused by nickel peroral exposure was found in hens. Associations between nickel and calcium, magnesium, triglycerides and alanine transaminase (ALT) in blood serum were recorded (*Kolesarova et al.*, 2008a). Ni induced liver damage was clearly shown by the increased activities of serum hepatic enzymes along with increased elevation of lipid peroxidation indices. The toxic effect of Ni was also indicated by significantly decreased levels of enzymatic antioxidants superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) and non-enzymatic antioxidants (glutathione, vitamin C and vitamin E) (*Pari and Prasath*, 2008). The nickel related changes in liver and also kidney functions were observed in nickel deficient animals. The activity of SDH and ALD, as well as the level of urea-N was significantly lower in the serum of Ni-deficient animals than in the control. Ni-deficient animals also had significantly lower enzyme activities in the heart (succinate dehydrogenase - SDH, hydroxybutyrate dehydrogenase - HBDH, aspartate aminotransferase - AST, ALT, aldolase - ALD and creatine kinase - CK), liver (sorbitol dehydrogenase - SDH and cholinesterase - CHE) and kidneys (HBDH and CK) (*Szilágyi et al.*, 1991). However, *Kolesarova et al.* (2008b) were no table to find the significant correlations between levels of nickel in internal organs and biochemical parameters.

The aim of this study was to determine the effect of intraperitoneal and peroral nickel exposure on the biochemical parameters in Wistar rats.

Materials and Methods

Fifty males Wistar rats were divided to 5 groups: nickel-treated groups (E1, E2, E3, E4) and control group (C), each containing 10 males. The males were housed individually in a plastic cages. The animals had unlimited access to drinking water and feed. The rats in the nickel ($NiCl_2$, Sigma, MO, USA) exposed groups were intraperitoneally dosed with 15 mgNi/kg b.w. (E1), 25 mgNi/kg b.w. (E2), 35 mgNi/kg b.w. (E3), and perorally at the concentration of 100 mg/L (E4) in drinking water for 90 days. Ten males (group C) served as the untreated control group without nickel treatment.

48 hours after an intraperitoneal administration of nickel (groups E1, E2, E3) and 90 days after the nickel intake in group E4, the rats were euthanized and blood samples were collected by cardiac puncture in glass tubes with heparin for analyses. The blood serum was separated by centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes and stored at -18°C. The parameters of mineral profile (calcium, phosphorus, magnesium, sodium. potassium and chlorides) and other parameters of energy, nitrogen and enzymatic profile (glucose, cholesterol, total proteins, triglycerides, urea, bilirubine, aspartate aminotransferase – AST, alanine aminotransferase – ALT, alkaline phosphatase – ALP, glutamate dehydrogenase – GLDH) were measured by automatic analyzer Microlab 300 (Vital Scientific, Dieren, Netherland) and analyzer EasyLite (Medica, Bedford,

USA). The statistical analysis of variance and t-test were calculated using the Microsoft Excel software (Microsoft, USA).

Results and discussion

Nickel is known due its effects on haematological parameters leading to anaemia. Also it acts on metabolism and decreases the erythrocyte glutathione peroxidase with consequent increase in oxidative stress in human and fish (*De Luca et al.*, 2007). In this work, the biochemical parameters of blood serum were analyzed. The average concentrations and activities of biochemical parameters measured in rat blood serum are shown in *table 1 – 3*. The most affected elements were potassium and calcium. Potassium concentration significantly decreased in all experimental groups regardless of way of administration. The most significant decline ($P<0.01$) was observed after a peroral intake of nickel during 90 days of experiment. Calcium concentrations also significantly decreased in group E1, E3 and E4 and the most significant change was again found in peroral group (2,16 mmol/L compared with the control 3.00 mmol/L). Significant decreases in calcium concentration were observed after nickel chloride administration in hens in dose of 2.0 mg/L of drinking water (*Kolesarova et al.*, 2008a). *Hayashi et al.* (2003) suggested that the increased excretion level of Ca is the result of renal dysfunction. The similar effect was described after peroral administration of cadmium during 3 months in pheasants (*Toman et al.*, 2006). However, *Kalafova et al.* (2010) were not able to find the significant changes in the serum concentrations of calcium in rabbits after nickel administration (17.5 and 35 mg/kg) for 30-90 days. On the contrary, *Hirano et al.* (1994) found increase in calcium concentration in blood serum in rats. Authors exposed the animals with $NiSO_4$ via inhalation. Phosphorus is present in blood serum mainly in form of inorganic phosphate, which is easy utilized in the chemical reactions. In our experiments, slight decrease in P concentrations was observed but the differences between control and experimental groups were not significant. Similarly, the sodium concentrations did not change significantly. Magnesium concentration in blood plasma decreased significantly in group E2 (25 g $NiCl_2$/kg i.p.) and E4 (100 mg $NiCl_2$/L p.o.). In experiment with hens, *Kolesarova et al.* (2008a) were not able to find any significant changes, even if the Mg concentration decreased.

Another significantly affected element in our experiment was potassium. It decreased in all experimental groups significantly. Significant depression of potassium in liver following nickel treatment in rats observed *Sidhu et al.* (2004). Changes in potassium blood levels may negatively affect the blood pressure as reviewed by *Haddy et al.* (2006). The higher decrease in K concentration was observed in peroral group (E4), so we can conclude that nickel may be an effective element in potassium decrease in blood after long-term intake. Potassium depletion can affect renal tubular cell function. Chronic potassium depletion can also cause a form of nephropathy known as hypokalaemic nephropathy, in which hypokalaemia itself is believed to cause a proximal tubular lesion associated with interstitial inflammation and fibrosis, leading to a fall in glomerular filtration rate (*Walsh et al.*, 2011). Chlorides play a major role in maintaining the pH levels of the body and also in metabolism to produce energy. Low plasma chloride levels are indicative of a lack of oxygen in the body or respiratory and metabolic acidosis. Hypochloridemia was found as most common chloride concentration change in stroke (*Alam et al.*, 2012). In our experiments, chloride concentrations decreased significantly in group dosed with 15 and 35 mgNi/kg (95.32 and 94.34 mmol/L, respectively) when compared to the control value (100.33 mmol/L). Kidney and liver failure disturbs the metabolism of many compounds like minerals, nutrients and enzymes. It leads to changes in the blood plasma constituents. The changes in plasma mineral elements in our experiments suggest the kidney function failure.

Table 1:

Mineral profile of the control and experimental rats

Element	Group (x±SD)				
	Control (n=10)	**E1 – 15 mg/kg** (n=10)	**E2 – 25 mg/kg** (n=10)	**E3 – 35 mg/kg** (n=10)	**E4 – 100 mg/L** (n=10)
Ca (mmol/L)	3.00±0.35	2.48±0.28*	3.21±0.47	2.42±0.23*	2.16±0.18**
P (mmol/L)	3.97±0.98	2.94±0.40	2.63±0.19	3.36±0.49	2.70±0.26
Mg (mmol/L)	1.57±0.50	1.25±0.26	0.88±0.23*	1.55±0.08	1.03±0.09*
Na (mmol/L)	140.9±1.60	141.20±2.55	141.29±1.82	141.41±3.69	140.95±2.74
K (mmol/L)	6.72±0.74	5.32±0.82*	5.48±0.61*	5.27±0.26*	4.93±0.45**
Cl^- (mmol/L)	100.33±1.74	95.32±3.09*	100.12±4.46	94.34±2.67**	98.76±2.54

x = mean, SD = standard deviation, *= P<0.05, **= P<0.01

A significant increase in urea concentration is evident after an intraperitoneal administration of nickel but not after a peroral exposure (*Table 2*). The mean concentration of urea increased from the control level 8.05 mmol/L to 24.10 mmol/L in group E3 (P<0.01). Urea is synthesized in the liver from ammonia, which is in turn generated as a break down product of ingested and endogenous protein. It is completely filtered by the kidney, but is also reabsorbed. Tubular reabsorption of urea is increased when tubular flow rates and volumes are decreased. Increases in serum urea may signal the onset of renal disease which has been shown in many other studies (*Prabu et al.*, 2010, *Zaki and Mohamed*, 2012). Nickel increases the protein catabolism. The total plasma proteins decreased significantly in the lowest-dose intraperitoneally exposed group E1 and in perorally exposed group E4 from the control 77.67 g/L to 69.97 and 65.45 g/L, respectively. Decreases in total plasma proteins are indicative of edema. It causes fluids to leave the circulatory system and localize in tissue spaces. Blood urea concentration reflects the balance between protein catabolism and clearance (*Kemp et al.*, 2001). Effect of nickel on the glucose metabolism is known (*Clary*, 1975, *Chaudhry and Nath*, 1984). In our study, the concentration of glucose increased significantly (P<0.05) in two high-dose groups E2 and E3, as well in peroral group E4 form the control 8.33 mmol/L to 9.26; 10.99 and 10.95 mmol/L, respectively. No significant changes in serum glucose concentration were found after nickel administration in fish (*Ptashynski et al.*, 2002), goats (*Yousuf*, 2002) and hens (*Kolesarova et al.*, 2008a). Total cholesterol and triglycerides showed decrease in mean concentration. Cholesterol decreased in group E2 and E4 from the control 2.80 mmol/L to 1.62 and 1.63 mmol/L, respectively. It means that both intraperitoneal and peroral administration of nickel affected the cholesterol concentration in blood serum. Our results do not correspond with those observed by *Das et al.* (2006). Authors found increase in total cholesterol and triglycerides after an intraperitoneal administration of nickel sulphate (2.0 mg/100 g b.w.) in rats. *Lind et al.* (2012) confirmed the relationship between nickel exposure and cholesterol and triglycerides in blood of old humans. Decrease in cholesterol concentrations in broiler chicken after addition of 50 mgNi/kg to feed mixture but no changes in cholesterol and increase in triglycerides concentrations were found in rabbits after the dose of 50 and 500 mgNi/kg in feed (*Bersényi et al.*, 2004). The bilirubine formed from breakdown of red blood cells is transported in plasma bound to albumin, so the decrease in bilirubine level is a result of reduction in the natural breakdown of red blood cells (*Ogbe et al.*, 2012). It therefore seems that nickel might provide protection to oxidative breakdown of red blood cells membranes.

Table 2:

Energy and nitrogen profile of the control and experimental rats

Parameter	Group (**x**±SD)				
	Control (n=10)	**E1 – 15 mg/kg** (n=10)	**E2 – 25 mg/kg** (n=10)	**E3 – 35 mg/kg** (n=10)	**E4 – 100 mg/L** (n=10)
urea (mmol/L)	8.05±0.97	13.32±5.40*	10.65±3.45	24.10±5.16**	7.01±1.13
TP (g/L)	77.67±5.48	69.97±2.27*	75.47±1.94	74.27±5.65	65.45±3.73**
Glu (mmol/L)	8.33±1.95	10.54±3.37	9.26±1.88*	10.99±1.99*	10.95±2.06*
Chol (mmol/L)	2.80±0.69	2.36±0.25	1.62±0.34*	2.80±0.07	1.63±0.15*
Bil (mmol/L)	57.90±26.52	16.18±4.68*	15.67±6.24*	25.16±3.16*	14.37±4.28*
TG^- (mmol/L)	1.78±0.43	1.18±0.30*	0.75±0.15**	1.36±0.29*	1.80±0.20

x = mean, SD =standard deviation, TP =total proteins, Glu =glucose, Chol =cholesterol, Bil=bilirubine, TG = triglycerides, *= P<0.05, **= P<0.01

Changes in the enzymatic activity are often linked with the liver damage. ALT and AST are markers of hepatocellular injury (*Abu and Uchendu*, 2010) while ALP is a marker of cholestasis (*Kaneko et al.*, 1997). The significant elevation in the activities of AST and ALT in the serum of test animals in group E3 (AST) and all intraperitoneal groups (ALT) suggests that nickel might induce hepatocellular injury in rats. These enzymes are usually raised in acute hepatotoxicity, but tend to decrease with prolonged intoxication, as a result of severe damage to the liver, the increased permeability, damage and necrosis of cells (*Cornelius*, 1979, *Raquel et al.*, 1997). In fact, the increased concentrations of both enzymes were found in acute period of nickel effect and insignificant decrease appeared after the long-term nickel exposure in our experiments. Our results support findings of *Adjroud* (2013). Author noted an increase in plasma AST after the administration of 25 and 50 mg$NiCl_2$/kg subcutaneously. Moreover, a significant increase in plasma ALT levels was observed with the administration of 25 mg/kg of $NiCl_2$ which was the same concentration as used in our experiment, even if it was administered subcutaneously. Ni-induced liver damage was clearly shown in the study of *Pari and Prasath* (2008) by the increased activities of serum hepatic enzymes namely AST, ALT, ALP, gamma glutamyl transferase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH) along with increased elevation of lipid peroxidation indices (thiobarbituric reactive acid substances and lipid hydroperoxides). The toxic effect of Ni was also indicated by significantly decreased levels of enzymatic (superoxide dismutase - SOD, catalase – CAT, glutathione peroxidase - GPx and glutathione S-transferase - GST) and non-enzymatic antioxidants (glutathione - GSH, vitamin C and vitamin E). *Sidhu et al.* (2004) was also able to observe significant elevation in serum AST, ALT and ALP concentrations in rats. However, authors used 8 times higher nickel concentration in drinking water than was realized in our experimental group E4. In another experiment with fish, total protein, AST, ALT and ALP increased and could be used as important and sensitive biomarkers in ecotoxicological studies concerning the effects of metal contamination (*Heydarnejad et al.*, 2012). Glutamate dehydrogenase (GLDH) is also accurate marker of hepatocellular injury. The nickel exposure in our experiments was only effective when administered in drinking water. Anyway, the changes even if significant were decreased. This is not important finding from the diagnostic point of view.

Table 3:

Enzymatic profile of the control and experimental rats

Enzyme	Group (x±SD)				
	Control (n=10)	**E1 – 15 mg/kg** (n=10)	**E2 – 25 mg/kg** (n=10)	**E3 – 35 mg/kg** (n=10)	**E4 – 100 mg/L** (n=10)
AST (µkat/L)	4.83±1.97	6.44±2.74	6.86±2.65	8.66±0.59*	4.17±1.29
ALT (µkat/L)	0.99±0.16	1.46±0.31*	0.68±0.11*	1.77±0.18**	0.89±0.19
ALP (µkat/L)	1.64±1.21	4.39±0.98**	2.74±0.97*	2.71±0.42*	4.15±0.54*
GLDH (µkat/L)	0.46±0.21	0.38±0.10	0.31±0.03	0.37±0.04	0.26±0.09*

x = mean, SD = standard deviation, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase, GLDH = glutamate dehydrogenase, *= P<0.05, **= P<0.01

Conclusions

The results of the present study suggest that nickel is a potent metal which can cause significant changes in blood biochemistry when administered intraperitoneally or perorally. Changes in mineral profile as well as energy, nitrogen and enzymatic profiles suggest the kidney and liver damage. The most affected parameters of blood were calcium, potassium, glucose, bilirubine, triglycerides, ALT and ALP.

Acknowledgement

The present study has been funded by VEGA Scientific Grant 1/0532/11, Ministry of Education of Slovak Republic.

References

Abu, A.H., Uchendu, C.N. (2010): Safety assessment of aqueous ethanolic extract of Hymenocardia Acida stem bark in Wistar rats. Arch. Appl. Sci. Res., 2: 56-68.

Adjroud, O. (2013): The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment, Environ. Toxicology, 28: 290-298.

Adjroud, O., Mouffok, S. (2009): Effects of nickel chloride on hematological and developmental parameters in Wistar albino pregnant rats, Assiut Univ. Bull. Environ. Res., 12: 1-9.

Alam, M.N., Uddin, M.J., Rahman, K.M., Ahmed, S., Akhter, M., Nahar, N., Swapan, M.K., Alam, M.M., Sultana, N., Hallaz, M.M., Alam, M.M., Uddin, M.M., Bari, M.S., Israil, M.A. (2012): Electrolyte changes in stroke. Mymensingh Med. J., 21: 594-599.

Anke, M., Groppel, B., Kronemann, H., Grün, M. (1984): Nickel-an essential element. IARC Sci. Publ., 53: 339–365.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005): Toxicological profile for nickel. ATSDR/U.S: Public Health Service, PB2006–100005, 351.

Bersényi, A., Fekete, S.G., Szilágyi, M., Berta, E., Zöldág, L., Glávits, R. (2004): Effects of nickel supply on the fattening performance and several biochemical parameters of broiler chickens and rabbits. Acta Vet. Hung., 52: 185-197.

Chaudhry, H.S., Nath, K. (1985): Nickel induced hyperglycemia in the freshwater fish, Colisa fasciatus. Water Air Soil Pollut., 24: 173-176.

Chervona, Y., Arita, A., Costa, M. (2012): Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic, and chromium. Metallomics, 4: 619-627.

Clary, J.J. (1975): Nickel chloride-induced metabolic changes in the rat and guinea pig. Toxicol. Appl. Pharmacol., 31: 55–65.

Coogan, T.P., Latta, D.M., Snow, E.T., Costa, M. (1989): Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. Crit. Rev. Toxicol., 19: 341–347.

Cornelius, C.E. (1979): Biochemical evaluation of hepatic function in dogs. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 15: 25–29.

Costa, M., Davidson, T.L., Chen, H., Ke, Q., Zhang, P., Yan, Y., Huang, C., Kluz, T. (2005): Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. Mutat. Res., 592: 79-88.

Das, K.K., Gupta, A.D., Dhundasi, S.A., Patil, A.M., Das, S.N., Ambekar, J.G. (2006): Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats. J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol., 17: 29-44.

De Luca, G., Gugliotta, T., Parisi, G., Romano, P., Geraci, A., Romano, O., Scuteri, A., Romano, L. (2007): Effects of nickel on human and fish red blood cells. Biosci. Rep., 27: 265-273.

Denkhaus, E., Salnikow, K. (2002): Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 42: 35–56.

Haddy, F.J., Vanhoutte, P.M., Feletou, M. (2006): Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 290: 546-552.

Hayashi, Y., Kobayashi, E., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kido, T., Nogawa, K. (2003): Excretion levels of urinary calcium and phosphorus among the inhabitants of Cd-polluted Kakehashi River basin of Japan. Biol. Trace Elem. Res., 91: 45-55.

Heydarnejad, M.S., Khosravian-Hemamai, M., Nematollahi, A. (2013): Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Ir. Vet. J., 66: 11.

Hfaiedh, N., Allagui, M.S., Hfaiedh, M., Feki, A.E., Zourgui, L., Croute, F. (2008): Protective effect of cactus (Opuntia ficus indica) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. Food Chem. Toxicol., 46: 3759–3763.

Hirano, S., Shimada, T., Osugi, J., Kodama, N., Suzuki, K.T. (1994): Pulmonary clearance and inflammatory potency of intratracheally instilled or acutely inhaled nickel sulfate in rats. Arch. Toxicol., 68: 548-554.

Kalafová, A., Kováčik, J., Capcarová, M., Massányi, P., Kolesárová, A., Chrastinová, Ľ., Lukáč, N., Schneidgenová, M., Čupka, P., Jurčík, R. (2010): Effect of nickel and zinc peroral administration on serum calcium, phosphorus and magnesium of rabbit female. Potravinárstvo, 4: 301-307.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (1997): Clinical biochemistry of domestic animals. 5th Edition, Academic Press, San Diego, 932.

Kemp, H.J., Parnham, A., Tomson, C.R. (2001): Urea kinetic modeling: a measure of dialysis adequacy. Ann. Clin. Biochem., 38: 20-27.

Kolesarova, A., Capcarova, M., Arpasova, H., Kalafova, A., Massanyi, P., Lukac, N., Kovacik, J., Schneidgenova, M. (2008a): Nickel-induced blood biochemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. J. Environ. Sci. Health B, 43: 625-632.

Kolesarova, A., Slamecka, J., Jurcik, R., Tataruch, F., Lukac, N., Kovacik, J., Capcarova, M., Valent, M., Massanyi, P. (2008b): Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. J. Environ. Sci. Health A, 43: 646-650.

Lind, P.M., Olsén, L., Lind, L. (2012): Circulating levels of metals are related to carotid atherosclerosis in elderly. Sci. Total Environ., 416: 80–88.

Ogbe, R.J., Adenkola, A.Y., Anefu E. (2012): Aqueous ethanolic extract of Mangifera indica stem bark effect on the biochemical and haematological parameters of albino rats. Arch. Appl. Sci. Res., 4: 1618-1622.

Oller, A.R., Kirkpatrick, D.T., Radovsky, A., Bates, H.K. (2008): Inhalation carcinogenicity study with nickel metal powder in Wistar rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 233: 262–275.

Pari, L., Prasath, A. (2008): Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. Chem. Biol. Interact., 173: 77-83.

Prabu, S.M., Shagirtha, K., Renugadevi, J. (2010): Quercetin in combination with vitamins (C and E) improves oxidative stress adrenal injury in cadmium intoxicated rats. Eur. Rew. Med. Pharmacol. Sci., 14: 903-914.

Ptashynski, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Baron, C.L., Klaverkamp, J.F. (2002): Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (Coregonus clupeaformis). Aquat. Toxicol., 58: 229-247.

Radike, M., Warshawsky, D., Caruso, J., Goth-Goldstein, R., Reilman, R., Collins, T., Yaeger, M., Wang, J., Vela, N., Olsen, L., Schneider, J. (2002): Distribution and accumulation of a mixture of arsenic, cadmium, chromium, nickel and vanadium in mouse small intestine, kidneys, pancreas, and femur following oral administration in water or feed. J. Toxicol. Environ. Health A, 65: 2029–2052.

Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T. (2006): Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. Biochim. Biophys. Acta, 1762: 164 – 180.

Sidhu, P., Garg, M.L., Morgenstern, P., Vogt, J., Butz, T., Dhawan, D.K. (2004): Role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. Biol. Trace Elem. Res., 102: 161-172.

Sunderman, F.W., Hopfer, S.M., Sweeney, K.R., Marcus, A.H., Most, B.M., Creason, J. (1989): Nickel absorption and kinetics in human volunteers. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 191: 5–11.

Szilágyi, M., Anke, M., Balogh, I. (1991): Effect of nickel deficiency on biochemical variables in serum, liver, heart and kidneys of goats. Acta Vet. Hung., 39: 231-238.

Toman, R., Massányi, P., Zakrzewski, M., Stawarz, R., Hluchý, S., Lukáč, N., Mindek, S., Formicki, G. (2006): Effect of cadmium on blood parameters of pheasants (Phasianum colchicus) after long-term administration in drinking water In: J. Physiol. Pharmacol., 57: 235.

Yousuf, M.B. (2002): Effect of high dietary intake of nickel in the West African dwarf goat. Ghana Jnl. Agric. Sci., 35: 147-151.

Zaki, M.S., Mohamed, M.I. (2012): Some studies in Baraki sheep intoxicated with cadmium. Life Sci. J., 9: 786-790.

Zoroddu, M.A., Schinocca, L., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Salnikow, K., Costa, M. (2002): Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4. Environ. Health Perspect., 110: 719-723.

Walsh, S.B., Unwin, E., Vargas-Poussou, R., Houillier, P., Unwin, R. (2011): Does hypokalaemia cause nephropathy? an observational study of renal function in patients with Bartter or Gitelman syndrome. QJM: Int. J. Med., 104: 939-944.

USING OF RAPID ELECTRONIC TESTS FOR MASTITIS DETECTION

Peter TONGEL[1]*

[1] Animal Production Research Centre, Nitra, Slovakia,
*tongel@cvzv.sk

Abstract

Even in the best dairy farms there are many cows with health problems. There are for example mastitis, laminitis, and etc. Mastitis, or inflammation of the mammary gland, is the most common and the most expensive disease of dairy cows throughout the world. Because these health problems have a great influence on economy of milk production each farmer has to know about them. The question is: How can farmer get to know which cow is ill? In our Institute we are developing under projects: "MLIEKO No. 26220220098" supported by the Operational Program Research and Development funded from the European Regional Development Fund and project APVV-0632-10 of the Slovak Research and Development Agency, Bratislava different rapid electronic tests for health disorders of dairy cows. For detection of mastitis we have developed two rapid electronic mastitis tests. One of them is: SCC counter (somatic cell counter) which works on the basis of milk viscosity measurement and another one: REM test (Rapid electronic mastitis test) which works on the basis of milk electrical conductivity measurement. In the first experiment the accuracy of REM test was tested in laboratory conditions, and then in practical conditions. The results have shown the accuracy was excellent (1 % from measurement range). The statistical value of electrical conductivity of healthy cows was 4.8 mS/cm (sd 0.4 mS/cm) and cows with health disorders was 6.4 mS/cm (sd 0.9 mS/cm). The difference between them was significant ($p<0.01$). In the second experiment we tested SCC counter for its accuracy and reliability in practical conditions as well. Samples of milk were taken during milking. From each sample the control one was sent to the certificated laboratories for SCC analysis. Total fifty samples have been measured. The correlation coefficient between SCC from SCC counter and SCC from laboratories was computed ($r = 0.96$, $p< 0.01$). It was found out that the SCC counter can measure SCC in a range 150 000 to 3 000 000 with sufficient accuracy. Based on our previous experiments, we can say, that these two electronic mastitis tests are good tools for mastitis prevention. REM test is suitable for quick monitoring of the whole herd of dairy cows whereas the SCC counter can serve as quick and cheap equipment for SCC measurement.

Keywords:
Mastitis, SCC measurement, electrical conductivity measurement, rapid electronic tests, dairy cow

THE EFFECT OF VARIOUS MANGANESE SOURCES ON EGG QUALITY PARAMETERS OF LAYING HENS

Katarína VENGLOVSKÁ[1], Klaudia ČOBANOVÁ[2], Ľubomíra GREŠÁKOVÁ[2]

[1]Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Pavol Jozef Šafárik University, Moyzesova 11, Košice, 040 01, Slovak Republic
[2]Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, Košice, 040 01, Slovak Republic

Abstract
This study was conducted to investigate the effect of feed supplementation with different manganese (Mn) sources on performance and egg quality parameters of Lohmann Brown hens. Ninety six 20-weeks-old laying hens were allocated to four dietary treatments. Hens were fed maize-soybean basal diets (BD) which differed only in the form of Mn supplemented. Group 1 were fed unsupplemented BD during the whole experiment. Diets for groups 2, 3 and 4 consisted of BD supplemented with a Mn dose of 30 $mg.kg^{-1}$ in the form of Mn sulphate, Mn chelate of protein hydrolysate (Mn-Pro) and Mn-glycine chelate (Mn-Gly), respectively. During the experiment performance parameters, eggshell qualitative parameters, concentration of manganese and zinc in egg yolks and oxidative stability of egg yolk lipids were determined. During the entire experiment, neither daily feed intake, egg weight nor feed to egg mass ratio were affected by dietary treatments. Egg production was significantly increased in groups supplemented with Mn-Pro and Mn-Gly. Regardless of source, the Mn supplementation to feed significantly increased the relative eggshell weight and eggshell thickness. The proportion of cracked eggs was significantly decreased in groups fed organic sources of Mn. Intake of BD enriched with Mn-sulphate resulted in significantly lower concentration of malondialdehyde in yolk of eggs compared to group fed Mn-Gly. The storage time significantly worsened the oxidative stability of yolk lipids in the group 1, 3 and 4. Our experiment showed that supplementation of hen´s diet with Mn has positive effect on eggshell quality. Diet supplementation with inorganic form could prevent the oxidative damage of yolk lipids during the storage time.

Introduction

For the egg producers are very important to increase egg production, egg weight and improve quality of eggshell because these features are related with economic profitability of poultry industry. Eggshell quality is one of the most important egg parameters. Eggs of poor shell quality cause significant losses to producers of consumer eggs. Nonstandard eggs usually account for 3 to 12% of the total yield (Jelínek, 1996; Ledvinka *et al.*, 2000). High breaking strength of eggshell and absence of shell defects are essential for protection against the penetration of pathogenic bacteria such as *Salmonella sp.* into eggs (Swiatkiewicz *et al.*, 2010). Eggshell quality is most often expressed as the proportion of the eggshell in egg weight, and by thickness. It is well known that main biological factors affecting eggshell quality are internal factors such as genetics, hen's age, production cycle stage, egg weight, intensity and persistence of production, time of laying, combined with external factors such as the nutritional level, farm system and microclimatic parameters. From nutritional point of view is the quality of eggshell often connected to macrominerals (Ca, P) and vitamin D3 influence, but nowadays it is well known that trace elements are also very important in mineralization process. Manganese and zinc, as cofactors of metaloenzymes responsible for carbonate and mucopolysaccharides synthesis, play an important role in eggshell formation (Swiatkiewicz and Koreleski, 2008). Mabe *et al.* (2003) suggested that trace elements as Mn, Zn and Cu could

affect mechanical properties of eggshell by effect on calcite crystal formation and modifying crystallographic structure of eggshell. Mn may affect eggshell quality, because activates the glycosyl transferases involved in the formation of mucopolysaccharides, which are components of proteoglycans (Leach, 1976). Mn also playes crucial role in antioxidant protection, because it is integral part of Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) (Underwood and Suttle, 1999).

In recent years, studies on the efficacy of organic trace minerals in animals have received increasing attention. Compared with inorganic minerals, organic minerals have several benefits including: protect from unwanted chemical reaction in gastrointestinal tract; easily pass intact through intestine wall; and be absorbed by different routes (Mateos *et al.*, 2005). Regarding the use of organic sources the results of the studies are still inconsistent. Some studies suggested that use of organic sources of Mn substantially affects laying performance and eggshell quality (Yildiz *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012), whereas others authors claimed that there is no difference between inorganic and organic sources of Mn (Lim and Paik, 2003; Mabe *et al.*, 2003; Swiatkiewicz and Koreleski, 2008).

The objective of this study was to compare the efficacy of dietary organic Mn sources and $MnSO_4.H_2O$ by investigation their effects on egg quality parameters, laying performance, lipid oxidation of egg yolks during storage and mineral retention in egg yolks of laying hens.

Material and methods

A total of 96 hens of laying strain Lohmann Brown, 20 weeks old were randomly allotted into 4 equal groups according to the dietary treatment. Each group consisted of 6 replicates with 4 hens in each. For three weeks of adaptation period, all experimental groups were fed with a basal diet (BD) based on maize and soybean meal. During next 8 weeks the birds were fed the same BD which differed only in the form of Mn supplemented. Group 1 continued on unsupplemented BD (analyzed Mn content 52 $mg.kg^{-1}$ DM). Diets for groups 2, 3 and 4 consisted of BD supplemented with a Mn dose of 30 $mg.kg^{-1}$ in the form of Mn sulphate, Mn chelate of protein hydrolysate (Mn-Pro) and Mn-glycine chelate (Mn-Gly), respectively. The experiment lasted for 11 weeks. During the whole experiment the layers were housed in room with a controlled ventilation and lighting (15hours/day) at 2 hens per cage. During experiment hens had constant access to water and feed. All experimental procedures were in accordance with established standards for the care and use of animals for research purposes.

Birds were individually weighed at the beginning and at the end of the experiment. Egg production, egg weight, number of cracked eggs were recorded daily during the 8 weeks of experimental period. Feed intake (per cage) was registered weekly. Using collected data, basic production parameters (egg mass, feed to egg mass ratio, daily feed intake) were calculated. At 31^{th} week of age three eggs from each replicate (18 eggs/treatment/day), for two consecutive days were collected to determine the egg quality parameters (eggshell weight (g), eggshell thickness (mm), eggshell proportion (%), yolk and albumen weight (g), yolk and albumen proportion (%), eggshape index (%)). Eggs were broken, and the albumens and yolks were separated and weighed. Eggshell weight was measured after washing the interior egg membrane and after drying for 48 hours at 60°C. Eggshell thickness was measured using micrometer (Model 7313, Mitutoyo corp., Japan) as the average of both ends (air cell and sharp end) and at the middle, without the shell membranes. The proportion of eggshell (ES), albumen (A) and yolk (Y) were calculated ((ES or A or Y weight/egg weight)x100). The short and long diameters of the eggs were measured with a micrometer to determine egg shape index.

At the end of experimental period 3 eggs per replicate were collected and yolks were pooled for analysis of Mn and Cu concentration by flame atomic absorption spectrophotometry using AAS Shimadzu (Kyoto, Japan) Model AA-700.

The malondialdehyde concentration in the yolks (3 eggs per replicate, total 18 eggs/treatment) of fresh eggs and eggs stored for 10, 20, 30, 40 days at 4°C was measured by the modified fluorometric method in accordance with Jo and Ahn (1998).

Statistical analysis of the differences between the groups was carried out using one-way analysis of variance with the post hoc Tukey multiple comparison test. Differences were considered significant at $P<0.05$. All statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5.0 software.

Results and discussion

The effects of dietary Mn supplementation on laying performance parameters are presented in Table 1. The Mn supplementation source has not statistically significant effect on the weight gain, feed intake, egg weight and on the feed to egg mass ratio. By contrast, the egg production was significantly increased in laying hens supplemented with organic sources of Mn. Yildiz *et al.* (2011) reported that body weight gains and the egg weights were significantly enhanced when Mn was used as organic form (Mn-Pro). On the contrary Swiatkiewicz and Koreleski (2008) observed no beneficial effects of organic Mn sources on the laying performance parameters. The National Research Council (1994) estimated the requirement for manganese as 20 $mg.kg^{-1}$ per hen per day. Maurice and Whisenhut (1980) , and Sazzad *et al.* (1994) reported no significant differences in egg production, egg weight and feed conversion with increasing manganese level in the diet. Similar results observed also Luo *et al.* (2003) who reported no effect of supplemental Mn (30-120 $mg.kg^{-1}$) on egg production in brown layers. However, in this study, hen-day egg production was affected by supplementing 30 $mg.kg^{-1}$ Mn with both organic forms. The basal diet containing 52 $mg.kg^{-1}$ Mn provided sufficient amount for the other laying performance parameters.

Table 1

Treatment effects on performance of laying hens

Item	Treatment			
	Basal diet (BD)	BD + Mn sulphate	BD + Mn-Pro	BD + Mn-Gly
Weight gain 20-31 wk (g)	186.5 ± 18.31	208.6 ± 43.6	153.9 ± 11.93	151,0 ± 41.91
Feed intake (g/hen/day)	114.2 ± 1.13	116.3 ± 0.98	114.3 ± 0.97	113.6 ± 1.13
Egg production (egg/hen/day)	0.97 ± 0.005^{a}	0.98 ± 0.003^{ab}	0.99 ± 0.004^{b}	0.99 ± 0.003^{b}
Egg weight (g/egg)	59.20 ± 0.41	58.32 ± 0.47	58.62 ± 0.57	59.77 ± 0.49
Feed to egg mass ratio (g feed/g egg)	2.00 ± 0.03	2.04 ± 0.02	1.98 ± 0.03	1.92 ± 0.03

^{a,b}means in the same row with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$)

Trace elements may affect eggshell quality by their catalytic properties as key enzymes involved in the process of membrane and formation of eggshells or by interaction directly with the calcite crystals in the formation of eggshells (Mabe *et al.*, 2003). The increased eggshell thickness in our experiment could be the effect of higher Mn dose in the diets compared to control group. In this study, all investigated parameters of the eggshell quality were significantly influenced by Mn intake (Table 2). The eggshell weight and thickness have been significantly elevated in all supplemented groups, regardless of the Mn source. Similar results were found by Mabe *et al.* (2003) who reported no differences in eggshell proportion and eggshell density between hens fed diet supplemented with inorganic and organic sources of

Mn, Zn and Cu. In contrary Bunesova (1999) and Klecker *et al.* (2002) found positive effect of partial substitution of inorganic Mn and Zn sources with their organic forms on eggshell weight and eggshell thickness. The proportions of the cracked eggs has appeared to be reduced in laying hens receiving the organic Mn sources than in those fed unsupplemented diet ($P < 0.05$). Similar results were found by Yildiz *et al.* (2011). The eggshell proportion was significantly increased in groups supplemented with Mn sulphate and Mn-proteinate.

Table 2

Effects of dietary manganese supplementation on parameters of egg quality

Item	Treatment			
	Basal diet (BD)	BD + Mn sulphate	BD + Mn-Pro	BD + Mn-Gly
Egg weight (g)	60.54 ± 0.91	59.32 ± 1.07	61.51 ± 1.36	61.01 ± 0.43
Albumen weight (g)	40.31 ± 0.98	39.06 ± 0.94	40.51 ± 1.11	40.19 ± 0.51
Yolk weight (g)	14.79 ± 0.16	14.39 ± 0.08	14.99 ± 0.21	15.02 ± 0.20
Eggshell weight (g)	5.45 ± 0.06^{a}	5.89 ± 0.13^{b}	6.02 ± 0.12^{b}	5.86 ± 0.05^{b}
Albumen proportion (%)	66.54 ± 0.65	65.80 ± 0.37	65.81 ± 0.39	65.85 ± 0.43
Yolk proportion (%)	24.5 ± 0.49	24.3 ± 0.35	24.4 ± 0.27	24.6 ± 0.42
Eggshell proportion (%)	9.01 ± 0.16^{a}	9.93 ± 0.15^{b}	9.79 ± 0.17^{b}	9.61 ± 0.12^{ab}
Eggshell thickness (mm)	0.36 ± 0.004^{a}	0.38 ± 0.003^{b}	0.39 ± 0.006^{b}	0.38 ± 0.003^{b}
Egg shape index (%)	78.4 ± 0.53	77.7 ± 0.56	77.9 ± 0.50	78.6 ± 0.15
Cracked eggs (%)	3.63 ± 0.66^{a}	2.31 ± 0.46^{ab}	1.35 ± 0.33^{b}	0.78 ± 0.30^{b}

^{a,b}means in the same row with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$)

The malondialdehyde (MDA) values of egg yolks, as a marker of lipid peroxidation are presented in Table 3. A moderate increase in the concentration of products of lipid peroxidation measured as MDA in the yolk was observed in all experimental groups during the refrigerated storage of eggs. The MDA values were almost equivalent in all treated groups, although after 40th day of storage the lipid peroxidation in yolk of eggs in group 4 was significantly increased compared to the group supplemented with inorganic form. The information about the dietary Mn supplementation on the oxidative stability of egg yolk lipids are insufficient. We can only suppose that lipid peroxidation in egg yolk may be affected by altered activity of superoxide dismutase. Wawrzykowski and Kankofer (2011) found that the activity of superoxide dismutase in egg yolk did not change during 6 days storage but between 6th and 9th day, it decreased significantly.

Table 3

Malondialdehyde concentration in egg yolks during storage periods (mg/kg yolk)

Storage period	Treatment			
	Basal diet (BD)	BD + Mn sulphate	BD + Mn-Pro	BD + Mn-Gly
0th day	0.70 ± 0.05^{a}	0.83 ± 0.06	0.76 ± 0.06^{a}	0.78 ± 0.04^{a}
10th day	0.82 ± 0.04^{ac}	0.99 ± 0.03	0.88 ± 0.05^{ab}	0.95 ± 0.05^{ab}
20th day	1.07 ± 0.09^{b}	1.01 ± 0.13	1.05 ± 0.06^{b}	0.88 ± 0.06^{a}
30th day	0.95 ± 0.04^{bc}	1.06 ± 0.02	1.08 ± 0.08^{b}	1.10 ± 0.06^{b}
40th day	1.03 ± 0.03^{bcAB}	0.96 ± 0.02^{A}	1.03 ± 0.06^{bAB}	1.13 ± 0.03^{bB}

^{a,b}means in the same column with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$)

^{A,B}means in the same row with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$)

In our experiment the addition of various forms of manganese at the dose of 30 mg/kg into diet did not significantly influenced the deposition of Mn and Zn in egg yolks .

Table 4

Treatment effects on mineral concentration in egg yolks (mg/kg DM)

Item	Treatment			
	Basal diet (BD)	BD + Mn sulphate	BD + Mn-Pro	BD + Mn-Gly
Manganese	1.65 ± 0.16	1.77 ± 0.08	1.66 ± 0.12	1.73 ± 0.16
Zinc	78.6 ± 2.73	84.4 ± 1.67	83.5 ± 3.69	80.3 ± 1.93

Conclusion

Based on this study we concluded that the Mn supplementation with different forms (organic vs. inorganic) in the diet for laying hens positively affect quality of eggshell. Intake of BD with organic Mn sources positively affect the egg production and decreased the proportion of cracked eggs. Diet supplementation with inorganic form could reduce the negative effect of oxidative damage of yolk lipids during the storage time.

References

BUNESOVA, A. 1999. Chelated trace minerals (Zn, Mn) in nutrition of hens. *Zeszyty Naukowe Przegladu Ho- dowlanego*, 45, 309–317.

JELÍNEK, K. 1996. Defective shell – one of the problems in the production of eggs. *Czech Journal of Animal Science*, 41, 375–379.

JO, C., AHN, D.U. 1998. Fluorimetric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry Science*, 77, 457–480.

KLECKER, D., ZEMAN, L., JELÍNEK, P., BUNESOVA, A. 2002. Effect of manganese and zinc chelates on the quality of eggs. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis,* 50, 59–68.

LEACH, R.M., Jr. 1976. Metabolism and function of manganese. *Trace Elements in Human Health and Disease*. Pages 235–247 in Vol. II, A. S. Prasad, ed., Academic Press, New York.

LEDVINKA, Z., TŮMOVÁ, E., ARENT, E., HOLOUBEK, J., KLESALOVÁ, L. 2000. Egg shell quality in some white-egged and brown-egged crossbreed combinations of dominant hens. *Czech Journal of Animal Science*, 45, 285–288.

LIM, H.S., PAIK, I.K. 2003. Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1804-1805.

LUO, X.G., GUO, X.Q., LIU, B., ZHANG, X.C. et al. 2003. Study on an optimal manganese level in practical diet for brown-egg layers. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,* 34, 105–111.

MABE, I., RAPP, C., BAIN, M.M., NYS, Y. 2003. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poultry Science*, 82, 1903-1913.

MATEOS, G.G., LAZARO, R., ASTILLERO, J.R., SERRANO, M.P. 2005. Trace minerals: what text books don't tell you. *Redefining Mineral Nutrition* (Taylor-Pickard J and Tuker L eds.). Pages 41-43 in Nottingham University Press. Nottingham.

MAURICE, D.V., WHISENHUT, J.E. 1980. Response of eggshell quality to dietary manganese supplementation. *Poultry Science*, 59, 1567–1568.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1994. Nutrient Requirements of Poultry, 9th rev. edn. National Academy Press, Washington, DC.

SAZZAD, H.M., BERTECHINI, A.G., NOBRE, P.T.C. 1994. Egg production, tissue deposition and mineral metabolism in two strains of commercial layers with various levels of manganese in the diet. *Animal Feed Science* and *Technology*, 46, 271–275.

SUN, Q., GUO, Y., LI, J., ZHANG, T., WEN, J. 2012. Effects of methionine hydroxy analog chelated Cu/Mn/Zn on laying performance, egg quality, enzyme activity and mineral retention of laying hens. *Journal of Poultry Science*, 49, 20-25.

SWIATKIEWICZ, S., KORELESKI J. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Veterinarni Medicina*, 53, 555-563.

SWIĄTKIEWICZ, S., KORELESKI, J., ARCZEWSKA, A. 2010. Laying performance and eggshell quality in laying hens fed diets supplemented with prebiotics and organic acids, . *Czech Journal of Animal Science*, 2010, 294–306.

UNDEWOOD, E. J., SUTTLE, N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock*. 3rd Edition. CABI, Publishing, New York.

WAWRZYKOWSKI, J., KANKOFER M. 2011. Changes in activity during storage and characteristics of superoxide dismutase from hen eggs (*Gallus Gallus domesticus*). *European Food Research Technology*, 232, 479-484.

YILDIZ, A.O., CUFADAR, Y., OLGUN, O. 2011. Effects of dietary organic and inorganic manganese supplementation on performance, egg quality and bone mineralisation in laying hens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 162, 482-488.

Acknowledgement

This study was supported by Grant Agency for Science, VEGA of Slovak Republic, Grant No. 2/0045/12.

HAZARDOUS METALS AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN CRANBERRY FRUITS IN THE FIRST AND THE SECOND HARVEST

Vollmannová Alena[a], Krížová Lívia[a], Poláková Zuzana[a], Daniel Ján[b], Medvecký Michal[b]

[a]Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic
[b]Plant Production Research Center in Piešťany, Slovak Republic

ABSTRACT
The aim of this work was to compare the contents of hazardous metals and bioactive components of cranberries obtained in the first and second harvest during one growing season. The average contents of macroelements (Mg, K, Na), microelements (Fe, Cr, Cu, Zn) and hazardous metals (Cd, Pb) were 492.4; 6326.4; 5.7; 12.0; 0.4; 2.7; 6.6; 0.1 and 0.4 $mg.kg^{-1}$ DM respectively. The content of Mg and K was higher in cranberries from the second harvest in comparison with the first one by 0.2-8% and 0.9-4%; Cr, Cu and Zn by 12-200%, 57-325% and 92-267% respectively. On other hand, the content of Cd and Pb in cranberries from the second harvest were lower in comparison with the first one by 11-42% and 14-83% respectively. The average values of the total content of anthocyanins and polyphenols were 540.0 and 2261.9 $mg.kg^{-1}$FM respectively. The statistically significant differences between the first and the second harvest were confirmed only in values of total anthycyanin as well as polyphenol contents.

Key words: cranberries, hazardous metals. polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity

INTRODUCTION

Even though cranberry has been historically associated with positive health benefits, scientific investigation into positive health benefits of cranberry (Vaccinium macrocarpon) has recently received more attention **(Marwan and Nagel, 1986).**

Cranberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) is one of few kinds of fruit, those selected cultivars give the harvest twice during the vegetation. The first harvest usually matures in the second half of August and the second one in the first half of October. This fruit is popular not only for its specific taste, but mainly for its very positive effects on the human organism. Effect of cranberries is antiseptic and anti-inflammatory, especially on the urinary tract. Cranberries are used as a supportive treatment for diabetes and rheumatism **(Hričovský et al., 2002).** . They are a rich source of bioactive components, mainly polyphenols with strong antioxidant and antimicrobial effects, which inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *Escherichia coli, Helicobacter pylori* and other pathogens **(Wang, Jiao, 2000, Lin et al., 2005; Vattem et al. , 2005, Borowska et al., 2009).** Cranberries belong to fruit species with the high antioxidant quality and quantity **(Vinson et al., 2001, Ruel, Couillard, 2007).** They are rich in phenolic acids and flavonoids, which inhibit oxidative processes, mainly oxidation of LDL cholesterol **(Porter et al. 2001, Yan et al., 2002, Ruel, Couillard, 2007; Tumbas et al., 2007)** Anticancer properties of cranberries make them a popular ingredient in dietary prevention of cancer **(Seeram et al., 2006; Neto, 2007, Borowska et al ., 2009)**. The aim of this work was to compare the contents of bioactive components of cranberry fruits (macro-and microelements content, contents of hazardous metals, total polyphenols and anthocyanins) as well as the total antioxidant activity of cranberries obtained in the first and second harvest during one growing season.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Samples of three cranberry cultivars able to give yield twice in one vegetation period (Ida, Koralle, Runo Bielawski) were obtained from research breeding station in Kriva in Orava. Locality of cranberry cultivation is characterised by altitude 700 m, average yearly temperature 6º C and precipitation 800 till 900 mm. From manually collected cranberries 100g samples were weighted and stored in PE bags in freezing box at temperature – 18 ºC.

Extract preparation

From manually collected cranberries 100g samples were weighted vzorky and stored in PE bags in freezing box at temperature – 18 ºC. From cranberries samples 50 g were homogenised and extracted by 100 ml 80% ethanol during 12 hours. In obtained extracts total polyphenols and anthocyanins contents and antioxidant capacity were spectrophotometrically determined.

Determination of total polyphenol content (TP)

The total polyphenol content was estimated using Folin-Ciocalteau reagent (Merck, Germany) according Lachman et al. (2003). Sample extract (0.05 to 1 mL to the expected polyphenol content), 2.5 mL Folin-Ciocalteau reagent and 3 – 5 mL H_2O were added to a 50 mL flask. After 3 min. 7.5 mL of 20% Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, USA) were added to the flask and diluted to 50 mL with H_2O. The mixture was incubated for 2 h at laboratory temperature and the absorbance was measured at 765 nm on the spectrophotometer Shimadzu 710 (Shimadzu, Japan) against the blank sample. The total polyphenol content was expressed as gallic acid equivalents in $mg.kg^{-1}$ DM (dry matter).

Determination of total antioxidant capacity (TAC)

For the analysis of free radical scavenging activity 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was used according to the protocol in Brand –Williams et al. (1995). To obtain a stock solution. 0.025 g of DPPH (Sigma-Aldrich, USA) was diluted to 100 mL with methanol and kept in a cool and dark place. Immediately before the analysis, a 1:10 dilution of the stock was made with methanol. For the analysis, 3.9 mL of the DPPH working solution was added to a cuvette and the absorbance at 515 nm was measured (A_0) with a Shimadzu 710 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Subsequently, 0.1 mL of the extract was added to the cuvette with DPPH, and the absorbance was measured after 10 min (A_{10}). An increasing amount of antioxidants present in the methanol extract of the sample reduced DPPH and faded the colour of the solution in a correlation proportional to the antioxidant concentration. The percentage of DPPH inhibition was measured according to the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_0-A_{10})/A_0] \times 100$$

DPPH inhibition % means the quatitative ability of observed component to scavenge the radicals in given time.

Determination of total anthocyanin content (TA)

Total anthocyanins content was determined by modified method LAPORNIK et al. (2005). Into two tubes 1 cm^3 of extract was pipetted and 1 cm^3 0,01% HCl in 80% ethanol was added. Then 10 cm^3 14% HCl into the first tube and 10 cm^3 McIlvain agens (pH 3.5) into another tube were added. Absorbance was measured at 520 nm against blank sample using Shimadzu 710 spectrophotometer (Shimadzu, Japan).

Determination of macro- and microelements and hazardous metals content

The contents of macro- and microelements and risky metals were in cranberries samples determined by AAS method (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA) after previous microwave decomposition of samples.

Statistical analysis

Statistical processing of the results was carried out Statgraphics. Multifactorial ANOVA was used. Mean comparisons between investigated parameters were done by the LSD test.

RESULTS AND DISCUSSION

The selected parameters of cranberry harvests are presented in Table 1. Based on the yield from one cranberry plant it can be created following cultivar order: Koralle < Runo Bielawski < Ida.

Table 1

Selected harvest parameters of investigated cranberry cultivars							
Parameter		**Cultivar**					
		Koralle		**Ida**		**Runo Bielawski**	
Yield from one plant (g)	Harvest I.*	42.7±14.6		68.4±36.8		42.3±4.8	
	Harvest II.*	39.9±13.9	*a*	110.4±31.7	*b*	100.9±2.1	*b*
Weight of 100 berries (g)	Harvest I.*	38.9±5.3		44.0±9.3		8.2±0.7	
	Harvest II.*	27.7±5.6	*b*	53.1±9.8	*c*	35.3±3.9	*a*
Proportion of rotten fruits (%)	Harvest I.	1.3±0.8		3.4±2.0		0.3±0.3	
	Harvest II.	0.3±0.1	*a*	0.7±0.5	*b*	2.8±1.0	*ab*

Average values ± standard deviation marked with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)
*Significant difference

The significant differences in amounts of yield from one cranberry plant as well as in weight of 100 berries between two harvests were confirmed. Also the statistically significant differences between cultivars were confirmed.

Table 2

Content of macroelements (mg.kg^{-1} DM) in cranberry fruits

Content of macroelements (mg.kg^{-1} DM)		**Cultivar**					
		Koralle		**Ida**		**Runo Bielawski**	
Mg	Harvest I.	495.5±17.9		472.5±51.8		488.5±22.1	
	Harvest II.	498.2±15.3	*a*	510.4±24.4	*a*	489.3±19.5	*a*
K	Harvest I.*	5802.5±385.8		5452.5±328.3		7462.5±438.1	
	Harvest II.*	5860.1±311.0	*b*	5690.3±251.9	*a*	7690.2±331.8	*c*
Na	Harvest I.*	8.3±0.3		8.8±0.1		2.4±0.2	
	Harvest II.*	7.4±0.2	*c*	4.3±0.4	*b*	2.9±0.1	*a*
Water content (%)		83.9±0.2		84.9±0.2		84.3±0.2	

Average values ± standard deviation marked with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)
*Significant difference

The average contents of macroelements (Mg, K, Na) were 492.4; 6326.4 and 5.7 mg.kg^{-1} DM respectively (Table 2). The content of Mg and K was higher in cranberries from the second harvest in comparison with the first harvest by 0.2-8% and 0.9-4% respectively.

Table 3

Content of microelements (mg.kg^{-1} DM)		**Content of microelements (mg.kg^{-1} DM) in cranberry fruits**					
		Koralle		**Ida**		**Runo Bielawski**	
Fe	Harvest I.*	15.7±0.51		14.2±0.43		10.7±0.56	
	Harvest II.*	10.7±0.55	*b*	10.6±0.54	*b*	10.3±0.51	*a*
Cr	Harvest I.*	0.2±0.02		0.2±0.02		0.4±0.02	
	Harvest II.*	0.6±0.02	*a*	0.5±0.05	*a*	0.4±0.07	*a*
Cu	Harvest I.*	1.6±0.05		0.8±0.09		2.1±0.17	
	Harvest II.*	4.8±0.34	*c*	3.4±0.20	*a*	3.3±0.23	*b*
Zn	Harvest I.*	4.3±0,27		2.4±0.15		5.1±0.31	
	Harvest II.*	9.0±0,22	*b*	8.8±0.29	*a*	9.8±0.26	*c*

Average values ± standard deviation marked with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)
*Significant difference

The average contents of microelements (Fe, Cr, Cu, Zn) were 12.0; 0.4; 2.7; 6.6 mg.kg^{-1} DM respectively. The content of Cr, Cu and Zn was higher in cranberries from the second harvest in comparison with the first one by 12-200%, 57-325% and 92-267% respectively (Table 3).
On other hand, the content of Cd and Pb in cranberries from the second harvest were lower in comparison with the first harvest by 11-42% and 14-83% respectively (Figure 1, Figure 2).

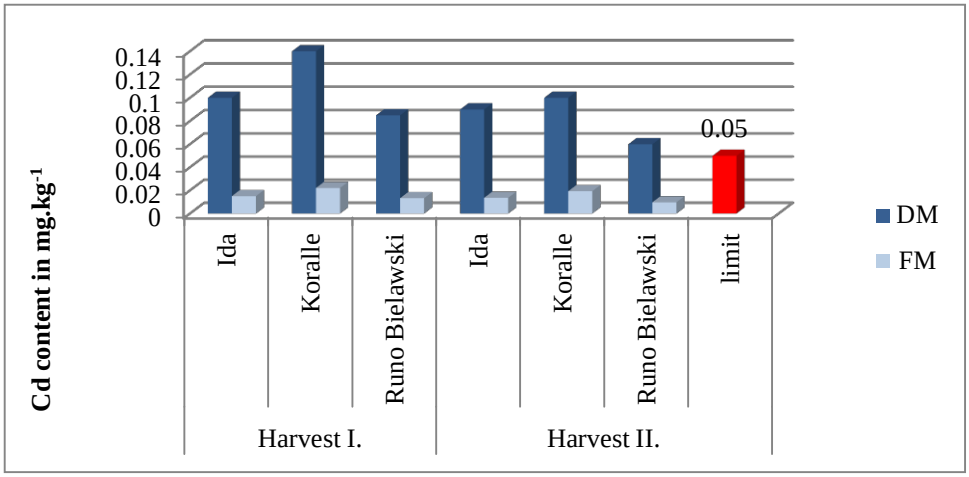


Figure 1

Cd content (mg.kg^{-1}) in fruits of investigated cranberry cultivars in the first and the second fruit harvest in relation to the hygienic limit

The average content of Cd was 0.1 mg.kg^{-1} DM. In fruits of cv. Koralle the highest Cd content was determined (0.12 mg.kg^{-1} DM resp. 0.02 mg.kg^{-1} FM), but in comparison to hygienic limit given by legislative in the Slovak Republic (0.05 mg.kg^{-1} FM) cranberries are in terms of Cd content absolutely safe (Figure 1). **Reimann et al. (2001)** presented lower Cd content in cranberry fruits (0,007 mg.kg^{-1}DM).

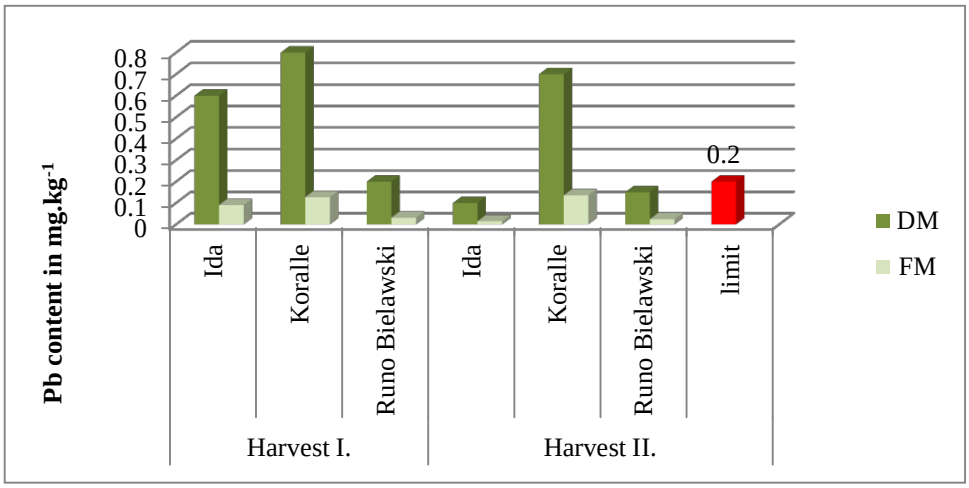


Figure 2

Pb content (mg.kg^{-1}) in in fruits of investigated cranberry cultivars in the first and the second fruit harvest in relation to the hygienic limit

The average content of Pb was 0.4 mg.kg^{-1} DM. The highest Pb content (0.75 mg.kg^{-1} DM resp. 0.13 mg.kg^{-1} FM) was determined again in fruits of cv. Koralle (Figure 2). In relationship to hygienic limit given by legislative in the Slovak Republic (0.2 mg.kg^{-1} FM) cranberries are in terms of Pb content absolutely safe, too. **Reimann et al. (2001)** presented 2.5 - fold lower Cd content in cranberry fruits.

Cranberry and their products have been associated historically with many positive benefits on human health **(Dhiraj et al., 2005)** and are also known to provide a rich antioxidant capacity **(Singh et al., 2009).**

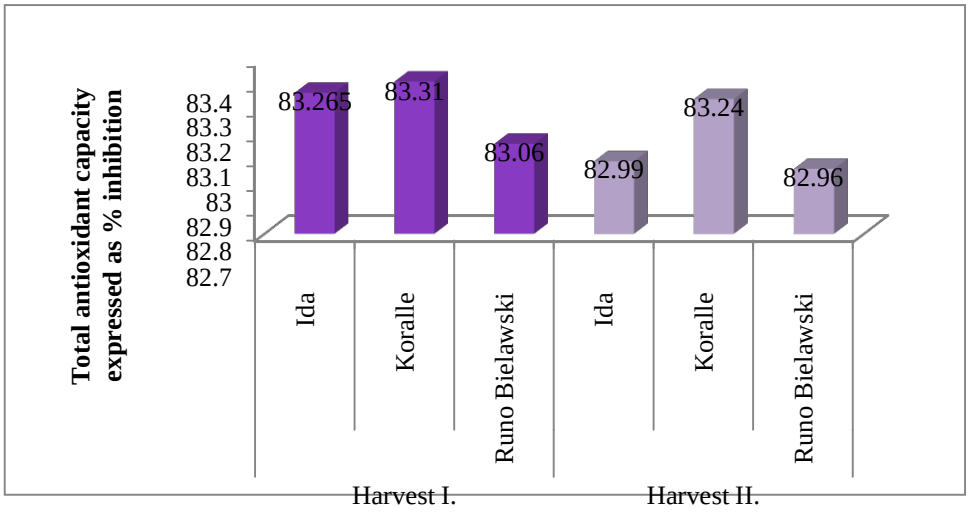


Figure 3

Total antioxidant capacity in fruits of investigated cranberry cultivars in the first and the second fruit harvest

In values of TAC in cranberry fruits there were no statistically significant differences (*P-value* 0.09) between the first and the second harvest confirmed (Figure 3).

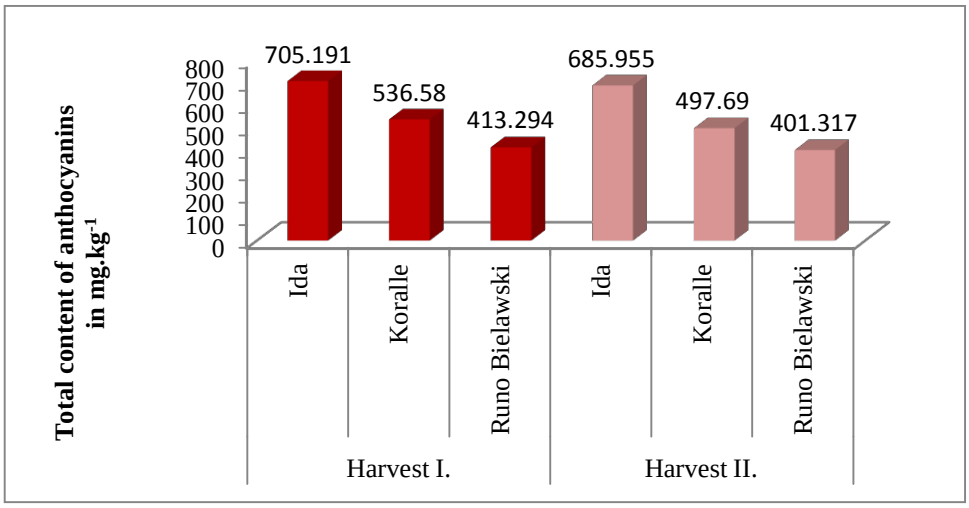


Figure 4

Total content of anthocyanins in fruits of investigated cranberry cultivars in the first and the second fruit harvest

In recent years, as increasing attention has been paid to health benefits of natural anthocyanins, the substitution of synthetic pigments by natural anthocyanins for as already become a social trend **(Zhang et al., 2011**). The average values of TA in our cranberry fruits was 540.0 mg.kg^{-1} FM (Figure 4). Our results correspond to those of **Borowska et al. (2009)** who present the average anthocyanin content in different cranberry cultivars in interval 519 – 772 mg.kg^{-1} FM. Similar results (422 mg.kg^{-1} FM) are presented also by **Celik et al. (2008)**, while this value is lower in comparison to our one. Based on *P-value* (2.42.10^{-7}) the statistically significant difference in values of TA between the first and the second harvest was confirmed. In the first harvest the higher TA in cranberry fruits weas determined in comparison to the second one.

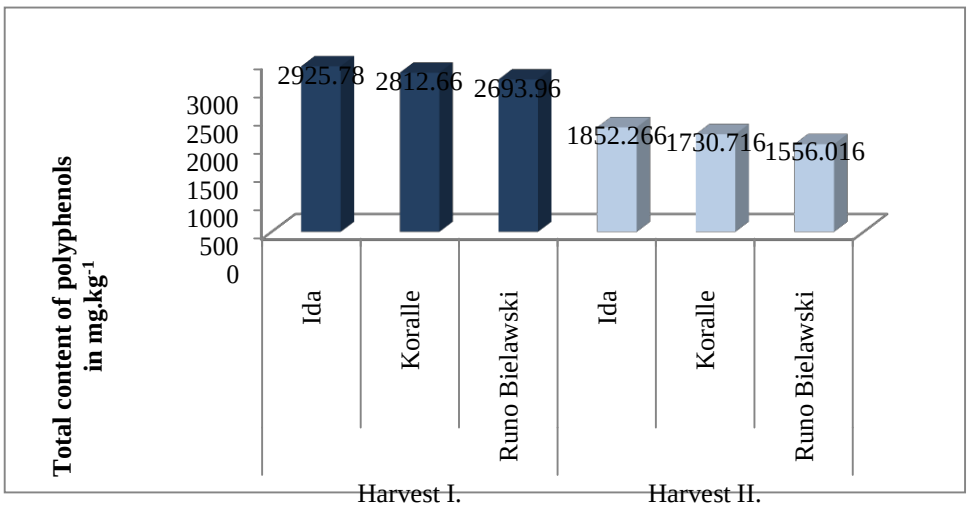


Figure 5

Total content of polyphenols in fruits of investigated cranberry cultivars in the first and the second fruit harvest

The average values of the TP in cranberry fruits was 2261.9 mg.kg^{-1}FM (Figure 5). The statistically significant differences between the first and the second harvest (*P-value* 2.42.10-7) were confirmed in values of total polyphenol content. In cv. Ida from the first harvest the highest TP (2925,78 mg.kg^{-1} FM) in fruits was determined, while in the same cranberry cultivar from the second harvest the determined TP was by o 36,69 % lower. Our results confirmed the higher TP in cranberry fruits from the first harvest in comparison to the first one. Generally, cranberry fruits from the first harvest accumulated higher amount of nutrients as well as risky metals (Cd, Pb). This factor can be as a stress factor that probably caused increased production of polyphenolic substances as a part of the defense mechanism of the plant. Average values of TP in our samples were comparable with the results of **Borowska et al. (2009)**, who presented the interval of TP values 1921 – 3747 mg.kg^{-1} FM. The statistically significant differences between the first and the second harvest (*P-value* 2,06 . 10^{-25}) were confirmed in values of total polyphenol content.

CONCLUSION

Cranberries are an excellent source of bioactive compounds with the significant benefit on the human health. Cranberry fruits from the first harvest accumulated higher amount of nutrients as well as risky metals (Cd, Pb), but in comparison to hygienic limits given by legislative in the Slovak Republic cranberries are in terms of these hazardous metals content absolutely safe. The higher content of heavy metals can act as a stress factor that probably caused increased production of polyphenolic substances as a part of the defense mechanism of the plant. Our results confirmed the statistically high significant differences in values of total anthocyanin as well as polyphenol contents in cranberry fruits between the first and the second cranberry fruit harvests, but no statistically significant differences were determined in values of antioxidant capacity. In cranberry fruits from the first harvest the higher content of bioactive compounds was confirmed.

Acknowledgment:

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology, ITMS 26220120054, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Contact address: prof. RNDr. Alena Vollmannová, PhD., Dept. of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; Slovak Republic. Tel. +421376414374; e-mail: alena.vollmannova@uniag.sk

REFERENCES

BOROWSKA, E. J. – MAZUR, B. – KOPCIUCH, R. G. – BUSZEWSKI, B. 2009. Polyphenol, anthocyanin and resveratrol massfractions and antioxidant properties of cranberry cultivars. In *Food Technology and Biotechnology,* roč. 47, 2009, č. 1, s. 56-61.

BRAND-WILLIAMS, W. – CUVELIER, M. E. – BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. In *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie,* roč. 28, 1995, s. 25-30.

CELIK, H. – OZGEN, M. – SERCE, S. – KAYA, C. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. In *Scientia Horticulturae,* roč. 117, 2008, s. 345-348.

DHIRAJ A. V. - REZA G. - KALIDAS S. 2005.Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. In *Asia Pac J Clin Nutr* 2005;14 (2):120-130

HRIČOVSKÝ, I. – CAGÁŇOVÁ, I. – HORČIN, V. – ŠIMALA, D. 2002. *Drobné ovocie a menej známe druhy ovocia.* 1.vyd., Bratislava: Príroda, 2002, 104 s., ISBN 80-07-00986-8.

LACHMAN, J. – HAMOUZ, K. – ORSÁK, M. 2005. Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. In *Chemické listy*, roč. 99, 2005, č. 7, s. 474-482.

LAPORNIK, B. – PROŠEK, M. – GOLC-WONDRA, A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. In *Journal of Food Engineering*, roč. 71, 2005, s. 214-222.

LIN, Y. T. – KWON, Y. I. – LABBE, R. G. – SHETTY, K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associate durease by oregano and cranberry phytochemical synergies. In *Applied and Environmental Microbiology,* roč. 71, 2005, s. 8558-8564.

MARWAN A.G. - NAGEL C. W. 1986. Characterization of cranberry benzoates and their antimicrobial properties. In *J Food Sci* 1986; 51: 1069-1070.

NETO, C. C. 2007. Cranberry and its phytochemicals: A review of *in vitro* anticancer studies. In *Journal of Nutrition,* roč. 137, 2007, č. 1, s. 186-193.

PORTER, M. L. – KRUEGER, C. G. – WIEBE, D. A. – CUNNINGHAM, D. G. – REED, J. D. 2001. Cranberry proantocyanidins associate with low-density lipoprotein and inhibit *in vitro* Cu^{2+}-induced oxidation. In *Journal of the Science of Food and Agriculture,* roč. 81, 2001, s. 1306-1313.

REIMANN, C. – KOLLER, F. – KASHULINA, G. – NISKAVAARA, H. – ENGLMAIER, P. 2001. Influence of extreme pollution on the inorganic chemical composition of some plants. In *Environmental Pollution*, roč. 115, 2001, s. 239-252.

RUEL, G. – COUILLARD, CH. 2007. Evidences of the cardioprotective potencial of fruits: The case of cranberries. In *Molecular Nutrition and Food Research*, roč. 51, 2007, s. 692-701.

SEERAM, N. S. – ADAMS, L. S. – ZHANG, Y. – LEE, R. – SAND, D. – SHEULLER, H. S. – HEBER, D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* roč. 54, 2006, s. 9329-9339.

SINGH A. P. – WILSON T. – KALK J. A. – CHEONG J. – VORSA N. 2009. Isolation of Specific Cranberry Flavonoids for Biological Activity Assessment. *Food Chem*. 2009; 116(4): 963–968:

TUMBAS, V. T. – DILAS, S. M. – ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. – CETKOVIC, G. S. – SAVATOVIC, S. M. 2007. Solid-phase extraction of antioxidant compounds from commercial cranberry extract and its antiradical activity. In *Acta Periodica Technologica,* roč. 37, 2007, č. 38, s. 157-164.

VATTEM, D. A. – GHAEDIAN, R. – SHETTY, K. 2005. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: Focus on cranberry. In *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition,* roč. 14, 2005, č. 2, s. 120-130.

VINSON, J. A. – SU, X. – ZUBIK, L. – BOSE, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* roč. 49, 2001, s. 5315-5321.

WANG, S. Y. – JIAO, H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* roč. 48, 2000, s. 5677-5684.

YAN, X. – MURPHY, B. T. – HAMMOND, G. B. – VINSON, J. A. – NETO, C. C. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). In *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* roč. 50, 2002, s. 5844-5849.

ZHANG W. - HE J. - PAN Q. - HAN F. - DUAN C. 2011. Separation and character analysis of anthocyanins from mulberry (*Morus alba* L.) pomace. In *Czech J. Food Sci*., 29 (2011): 268-276

EFFECT OF PROBIOTIC SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE OF DIFFERENT BROILER GENOTYPES

Ján Weis, Cyril Hrnčár*

Address*: doc. Ing. Ján Weis, CSc., Department of Poultry Science and Small Animal Husbandry, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: Ján.Weis@uniag.sk, phone number: + 42137/641 4438

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of probiotic strain *Lactobacillus fermentum* supplementation on the performance and carcass parameters of different genotypes of broiler chickens. Totally 60 one-day-old chickens of Cobb 500, 60 one-day-old chickens of Hubbard JV and 60 one-day-old chickens of Ross 308 were divided in two groups: control chicken group (n=30) received drinking water without any additives and experimental chickens group (n=30) received probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 with concentration of $1x10^9$ colony forming units (CFU) in drinking water from day 1 to day 42 of fattening. Individual body weights of all birds, feed conversion ratio per group were determined in 21 and 42 day, total mortality rate we recorded in 42 day of fattening period. Carcass quality of broiler chickens was determined at the end of the experiment. The supplementation of probiotic affected positively body weight ($P<0.05$) in all broiler chicken genotypes in 21 and 42 day of fattening. Feed conversion ratio in 21 and 42 day was similar in control and experimental groups. The probiotic no significant ($P\geq0.05$) affected percentage of breast and thighs form carcass body, weight of giblets and carcass yield. The probiotic addition significantly ($P<0.05$) reduced the abdominal fat content of the chicken meat.

Key words: *Lactobacillus fermentum*, body weight, feed utility, mortality, carcass parameters

INTRODUCTION

The consumption of chicken meat is of increasing importance in the EU and per head consumption is still rising. One reason for this case might be a more health-conscious nutrition by the consumers. Other reasons like the BSE problem or antibiotic abuse in pig production might also be important for an increase in consumption of chicken meat **(Schedle *et al.*, 2006)**.

Research studies have reported feed residues in chicken meat products and the development of bacterial resistance to antibiotics used both in human medicine and poultry production **(Edens, 2003)**.

On 1st January 2006 the European Union introduced a complete ban on the use of antibiotic growth promoters in feeds for animals for consumption. The ban was introduced at the same time in all Member States. Since then, antibiotics have been allowed to be used as medicines only in medical feeds or prophylactic additives. Resolution No 1831/2003 EC of the European Parliament and Council of 22nd August 2003 devoted to the issue of additives used in feeding animals described probiotics as alternative feed additives to antibiotic growth promoters **(Casewell *et al.*, 2003; Patterson and Burkholder, 2003; Berghmann *et al.*, 2005)**.

Probiotics are additives that can be used to replace antibiotics in poultry nutrition **(Griggs and Jacob, 2005)**. The term probiotic stems from the Greek and means "in favor of life"; its antonym is antibiotics, which means "against life" **(Coppola and Turnes, 2004)**.
Probiotics are defined as live microbial food supplements, which beneficially influence only not human **(Songisepp *et al.*, 2005)**, but also poultry health and performance, chickens **(Haščík *et al.*, 2005; Weis *et al.*, 2010)**, hens **(Capcarova *et al.*, 2010)**, turkeys **(Capcarova, 2008)**, pigeons (**Malíková *et al.*, 2013)** and waterfowl **(Weis *et al.*, 2008; Hrnčár *et al.*, 2013)**. Probiotics in poultry maintaining normal intestinal microflora by competitive exclusion and antagonism **(Kabir *et al.*, 2005; Kizerwetter-Swida and Binek, 2009)**, alter metabolism by increasing digestive enzyme activity and decreasing bacterial enzyme activity and ammonia production **(Yoon *et al.*, 2004; Nayebpor *et al.*, 2007)**, improve feed intake and stimulate the immune system **(Kabir *et al.*, 2004; Haghighi *et al.*, 2005; Apata, 2008)**. The selection of bacteria such as *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* and *Streptococcus*, for use as probiotics is based on assessment of their metabolic products and their potential to colonize specific sites **(Lima *et al.*, 2007)**. The ability of lactic acid bacteria to inhibit various G-positive and G-negative bacteria is well known. This inhibition may be related to the production of organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocin-like substances that are active against certain pathogens and may be produced by different species of *Lactobacillus* **(Messaoudi *et al.*, 2005)**.
Lactobacillus sp. are normal inhabitants of the intestinal tract, especially of poultry **(Juven *et al.*, 2001)**. Lactobacilli mainly compose the flora in crop and ileum region in poultry **(Gong *et al.*, 2002)**. *Lactobacilli* are rod shape bacteria and possess different biochemical and physiological properties **(Tannock *et al.*, 1999).** Many *Lactobacillus* strains, isolated from various sources, are being used as probiotic agents and it is unlikely that all functional characters of a probiotic are present in each species/strain. It needs thorough study and documentation. Generally recognized beneficial properties are the origin of the strain being used, the surviving ability within the GI tract, non-pathogenic activities and the modulation ability in immune responses **(Gibson and Fuller, 2000; Dunne *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001)**.
The objective of this study was to provide a comparison of the effect of probiotic strain *Lactobacillus fermentum* supplementation in drinking water on performance and carcass parameters of different genotypes broiler chickens (Cobb 500, Hubbard JV, Ross 308).

MATERIAL AND METHODS

The experiment was realised in half-operation conditions of experimental basis of Department of Poultry Science and Small Animal Husbandry (Certificate of Authorization to Experiment on Living Animals, State Veterinary and Food Institute of Slovak Republic, no. SK PC 30008).
Totally 60 one-day-old chickens of Cobb 500, 60 one-day-old chickens of Hubbard JV and 60 one-day-old chickens of Ross 308 were divided in two groups: control chicken group (n=30) received drinking water without any additives and experimental chickens group (n=30) received probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 with concentration of $1x10^9$ colony forming units (CFU) in drinking water from day 1 to day 42 of fattening. Quantization of drinking water and probiotic strain are presented in Table 1.

Table 1 Dose of drinking water and probiotic strain in experimental group

Week of fattening	Total amount of drinking water per day (l)	Dose of probiotic strain (g)	CFU in 1 ml of drinking water
1.	2.50	6.60	$2.64x10^6$
2.	3.50	6.60	$1.90x10^6$
3.	4.60	3.70	$8.04 x10^5$
4.	6.70	3.70	$5.52 x10^5$
5.	8.60	3.70	$4.30x10^5$
6.	10.60	3.70	$3.49x10^5$

The feeding period lasted 42 days. The chickens were fed with starter diet in powdery form from days 1 to 21 and grower diet with granular form from days 22 to 49. The nutrition value of the diets were shown in Table 2. Feeding was provided on an ad libitum basis from containers on the front of the cages.

Table 2 Nutritional value of complete feed mixtures

Nutritient	Unit	Starter	Grower
Crude protein	g/kg	min. 210.00	min. 190.00
ME	MJ/kg	min. 12.00	min. 12.00
Lysine	g/kg	min. 11.00	min. 9.50
Methionine and cistine	g/kg	min. 7.50	min. 7.50
– from that methionine	g/kg	min. 4.50	min. 4.00
Linoleic acid	g/kg	min. 10.00	min. 10.00
Calcium	g/kg	min. 8.00	min. 7.00
Phosphorus	g/kg	min. 6.00	min. 5.00
Sodium	g/kg	1.20–3.00	1.20–2.50
Manganese	mg/kg	min. 50.00	min. 50.00
Iron	mg/kg	min. 60.00	min. 60.00
Copper	mg/kg	min. 6.00	min. 6.00
Zinc	mg/kg	min. 50.00	min. 50.00
Vitamin A	i.u./kg	min. 10000.00	min. 8000.00
Vitamin B_2	mg/kg	min. 4.00	min. 3.00
Vitamin B_{12}	µg/kg	min. 20.00	min. 20.00
Vitamin D_3	i.u./kg	min. 1200.00	min. 1200.00
Vitamin E	mg/kg	min. 15.00	min. 15.00

Birds were stabled in a 3-etage cage technology consisted of 18 cages with proportions 75x50 cm (0.375 m^2).

During the 42 days experimental period was recording body weight (g) a feed conversion ratio (g/g) in 24 and 42 day of fattening. total mortality we recorded in 42 day of fattening period.

At the end of the experiment, 10 broiler chickens of similar body weight to the group average were selected from each group, weighted and killed by severing of the bronchial weight. The weights of carcass, breast, giblets and abdominal fat were recorded individually.

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) **(SAS, 2001)**. Significant difference was used at 0.05 probability level and differences between groups were tested using the Duncan's procedure **(Duncan, 1955)**.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of probiotic supplement to the drinking water on chickens live weight is shown in Table 3. In Cobb 500, Hubbard JV and Ross 308 hybrids, there was significant (*P<0.05*) difference in body weight of broiler chickens between control and experimental groups on day 21. At the end of the experiment (day 42), broiler chickens of all hybrids supplemented with prebiotic strain *Lactobacillus fermentum* in drinking water had higher body weight in compare of control group (*P<0.05*). These results are in agreement with **Kabir *et al.* (2004)** who observed improvement of final body weight of broiler chickens at addition of probiotic preparate. In contrast, our results are opposite to those of **Lima *et al.* (2003)** and **Awad *et al.* (2008)** who recorded reported that addition of probiotic to broilers diet did not show any significant effect on body weight compared with control group.

Table 3 The effect of probiotic on body weight and feed conversion ratio of broiler chickens

	Body weight (g)		Feed conservation ratio (g/g)	
	21 day	42 day	21 day	42 day
Cobb 500				
Control	724.68±78.05	2137.58±221.43	1.56±0.02	1.84±0.04
Experimental	779.81±77.49[a]	2294.08±221,84[a]	1.54±0.03	1.83±0.04
Hubbard JV				
Control	701.57±69.74	2119.38±211.57	1.54±0.02	1.82±0.03
Experimental	748.25±70.53[b]	2197.98±213.58[b]	1.53±0.02	1.82±0.03
Ross 308				
Control	718.84±71.67	2146.74±223.29	1.55±0.02	1.84±0.03
Experimental	765.74±70.41[c]	2299.81±223.47[c]	1.55±0.02	1.82±0.03

Values shown are mean ± SD (standard deviation)

a,b,c Means in a row with different superscript differ significantly (P<0.05)

During our experiment, there was not any significant (*P≥0.05*) difference in feed conversion ratio (FCR) between groups after application of probiotic strain *Lactobacillus fermentum*. Similar results were found by **Samli *et al.* (2007)** and **Willis and Reid (2008)** who found that addition of probiotic did not have any significant effect on FCR of broiler chickens. However, our findings on feed consumption were in contrast to those of **Aftahi *et al.* (2006), Chafai *et al.* (2007)** and **Mountzouris *et al.* (2007)**, who reported that addition of probiotic to broiler chicken diets decreased FCR significantly (*P<0.05*).

In hybrids Cobb 500 and Hubbard JV we recorded reduced total mortality in benefit of experimental groups on the end of fattening period (3.33 vs. 6.67%). The total mortality rate in the both groups in Ross 308 was identical (6.67 %). **Cmiljanic *et al.* (2001)** proved a reduction of mortality rate of broiler chickens due to the addition of probiotic.

Data presented in Table 4 show that percentage of breast, percentage of thighs, weight of giblets and carcass yield were not affected by using probiotic strain *(P≥0.05)*. We found statistically significant reduction *(P<0.05)* of % abdominal fat in benefit of supplementation

of probiotic strains. Similar value of the slaughter are in contrast with results drawn from the study of **Haščík *et al.* (2008)** who concluded that there is statistically significant influence of the supplementation of probiotic on carcass parameters of broiler chickens. Similar values of carcass yields in broiler chickens supplemented or not with probiotic were found by **Pelicano *et al.* (2004)**. Also, **Kalavathy *et al.* (2006)** observed significant reduction of the supplementation of probiotic on abdominal fat content of the poultry.

Table 4 The effect of probiotic on some carcass parameters of broiler chickens

	Percentage of breast (%)	Percentage of thighs (%)	Weight of abdominal fat (%)	Carcass yield (%)	Weight of giblets (g)
Cobb 500					
Control	30.31±2.04	31.74±2.01	33.74±3.87	77.18±2.14	114.74±24.84
Experimental	30.42±1.99	31.58±2.14	48.21±5.74[a]	77.31±2.19	119.26±21.56
Hubbard JV					
Control	29.84±2.01	30.96±1.84	31.08±3.11	76.88±1.91	110.85±21.53
Experimental	29.98±1.96	31.04±1.85	45.53±5.07[b]	76.97±1.96	113.74±22.69
Ross 308					
Control	30.28±1.88	31.77±2.11	34.01±4.19	77.14±2.24	116.85±25.87
Experimental	30.37±1.92	31.62±2.13	48.88±5.27[c]	77.25±2.21	114.65±23.51

Values shown are mean ± SD (standard deviation)
a,b,c Means in a row with different superscript differ significantly (P<0.05)

Acknowledgments: This work was financially supported by VEGA 1/0493/12 and KEGA 035SPU-4/2012.

CONCLUSION

The results from this study show that supplementation of probiotic strain *Lactobacillus fermentum* in drinking water statistically significant affected body weight and no statistically significant affected feed conversion ratio in 21 and 42 day of fattening period. The tested probiotic strain had a no significant effect on percentage of breast and thighs from carcass body, weight of giblets and carcass yield. From carcass parameters we found only reduction of weight of abdominal fat in carcass body in all hybrid genotypes.

REFERENCES

APATA, D. F. 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. In *Journal of the Science of Food and Agriculture,* vol. 88, 2008, p. 1253-1258.

AFTAHI, A. – MUNIM, T. – HOQUE, M.A. – ASHRAF, M. A. 2006. Effect of yoghurt and protexin boost on broiler. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 5, 2006, p. 651-655.

AWAD, W. – GHAREEB, K. – BÖHM, J. 2008. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. In *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 9, 2008, p. 2205-2216.

BERGHMANN, L. R. – ABI-GHANEM, D. – WAGNELA, S. D. – RICKE S. C. 2005. Antibodies: an alternative for antibiotics? In *Poultry Science*, vol. 84, 2005, p. 660-666.

CAPCAROVA, M. – KOLESÁROVÁ, A. – MASSANYI, P. – KOVÁČIK, J. 2008. Selected blood biochemical and haematological parameters in turkeys after experimental probiotic Enterococcus faecium M-74 strain administration. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 7, 2008, p. 1194–1199.

CAPCAROVA, M. – CHMELNIČNA, L. – KOLESÁROVÁ, A. – MASSANYI, P. – KOVÁČIK, J. 2010. Effects of Enterococcus faecium M 74 strain on selected blood and production parameters of laying hens. In *British Poultry Science*, vol. 51, 2010, p. 614–620.

CASEWELL, M. – FRIIS, C. – MARCO. E. 2003. The European ban on growth promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, 2003, p. 159-161.

CHAFAI S. – FATIHA I. – ALLOUI N. 2007. Bacterial probiotic additive (*Pediococcus acidilactici*) and its impact on broiler chickens health and performance. Animal health, animal welfare and biosecurity. In *The 13th International Congress in Animal Hygiene*, Estonia: Tartu, 2007, p. 820-825.

CMILJANIC, R. – LUKIC M. – TRENKOVSKI, S. 2001. The effect of "paciflor-c" probiotic on gain, feed conversion and mortality of fattening chicks. In *Biotechnology in Animal Husbandry*, vol. 17, 2001, p. 33-38.

COPPOLA, M. M. – TURNES, C. G. 2004. Probióticos e resposta imune. In *Ciência Rural*, vol. 34, 2004, p. 1297-1303.

DUNCAN, B. D. 1955. Multiple range and multiple F test. In *Biometrics*, vol. 11, 1955, p. 1-42.

DUNNE, C. – MAHONY, L. O. – MURPHY, L. – THORNTON, G. – MORRISSEY, D. – HALLORAN, S. O. 2001. In-vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, p. 386-392.

EDENS, F. W. 2003. An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. In *Revista Brasileira de Cięncia Avícola,* vol. 5, 2003, p. 75-97.

GIBSON, G. R. – FULLER, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed towards identifying probiotics and probiotics for human use. In *Journal of Nutrition*, vol. 130, 2000, p. 391-395.

GONG, J. – FORSTER, R. J. – YU, H. – CHAMBERS, J. R. – WHEATCROFT, R. – SABOUR, P. M. – CHEN, S. 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. In *FEMS Microbiology Ecology,* vol. 41, 2002, p. 171-179.

GRIGGS, J. P. – JACOB, J. P. 2005. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. In *The Journal of Applied Poultry Research*, vol. 14, 2005, p. 150-156.

HAGHIGHI, H. R. – GONG, C. L. – HAYES, M. A. – SANEI, B. – PARVIZI, P. – GISAVI, H. – CHAMBERS, J. R. – SHARIF, S. 2005. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. In *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 12, 2005, p. 1387-1392.

HAŠČÍK, P. – WEIS, J. – ČUBOŇ, J. – KULÍŠEK, V. – MAKOVICKÝ, P. – KAČÁNIOVÁ. M. 2005. Effect of a probiotic preparation in complete diets for Ross 308 broiler chickens on chemical composition of meat. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 8, 2005, p. 20-24.

HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – KAČÁNIOVÁ, M. – KULÍŠEK, V. – PAVLIČOVÁ, S. – VAVRIŠINOVÁ, K. 2008. Effect of probiotic preparation on meat production of chickens ROSS 308. In *Journal of Central European Agriculture*, vol. 9, 2008, p. 246.

HOLZAPFEL, W. H. – HABERER, P. – GEISEN, R. – BJÖRKROTH, J. – SCHILLINGER, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, p. 365-373.

HRNČÁR, C. – WEIS, J. – BARAŇSKA, B. – MALÍKOVÁ, L. – PETRIČOVÁ, Ľ. 2013. The effect of different probiotic strains on fattening and carcass parameters of broiler ducks. In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 3, 2013, p. 1155-1163.

JUVEN, B. J. – MEINERSMANN, R. J. – STERN, N. J. 2001. Antagonistic effect of lactobacilli and pediococci to control colonization by human enteropathogens in live poultry. In *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 70, 2001, p. 95-103.

KABIR, S. M. L. – RAHMAN, M. M. – RAHMAN, M. B. – AHMED, S. U. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broiler. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 3, 2004, p. 361-364

KABIR, S. M. L. – RAHMAN, M. M. – RAHMAN, M. B. – HOSAIN, M. Z. – AKAND M. S. I. – DAS, S. K. 2005. Viability of probiotics in balancing intestinal flora and effecting histological changes of crop and caecal tissue of broilers. In *Journal of Biotechnology*, vol. 4, 2005, p. 325-330.

KALAVATHY, R. – ABDULLAH, N. – JALALUDIN, S. – HO, Y. W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. In *British Poultry Science*, vol. 44, 2003, p. 139-144

KIZERWETTER-SWIDA, M. – BINEK, M. 2009. Protective effect of potentially probiotic Lactobacillus strain on infection with pathogenic bacteria in chickens. In *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 12, 2009, p. 15-20.

LIMA, A. C. F. – PIZAURO–JÚNIOR, J. M. – MACARI, M. – MALHEIROS, E. B. 2003. Efeito do uso de probiotic sobre o Desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. In *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol 32, 2003, p. 200-207.

LIMA, E. T. – FILHO, R. L. A. – OKAMOTO, A. S. – JOSÉ C. – NOUJAIM, J. C. – BARROS, M. R. – ADALBERTO J. – CROCCI A. J. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. In *Canadian Journal of Veterinary Research,* vol. 71, 2007, p. 103-107.

MALÍKOVÁ, L. – WEIS, J. – HRNČÁR, C. 2013. Effect of administration of probiotic preparation with strain of *Lactobacillus fermentum* on the weight gain of the young pigeons. In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 3, 2013, p. 1469-1476.

MESSAOUDI, D. F. – BERGER, C. N. – COCONNIER-POLTER, M. H. – MOAL, V. – SERVIN A. L. 2005. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, 2005, p. 6008-6013.

MOUNTZOURIS, K.C. – TSIRTSIKOS, P. – KALAMARA, E. – NITSCH, S. – SCHATZMAYR, G. – FEGEROS, K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. In *Poultry Science*, vol. 86, 2007, p. 309-317.

NAYEBPOR, M. – FARHOMAND, P. – HASHMI A. 2007. Effects of different levels of direct fed microbial (Primalac) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens. In *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 6, 2007, p. 1308-1313.

PELICANO, E. R. L. – SOUZA, P. A. – SOUZA, H. B. A. – OBA, A. – NORKUS, E. A. – KODAWARA, L. M. – LIMA, T. M. A. 2004. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. In *Revista Brasileira de Cięncia Avícola*, vol. 6, 2004, p. 231-236.

PATTERSON, J. A. – BURKHOLDER, K. M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. In *Poultry Science*, vol. 82, 2003, p. 627-631.

SAMLI, H. E. – SENKOYLU, N. – KOC, F. – KANTER, M. – AGMA, A. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. In *Archives of Animal Nutrition*, vol. 61, 2007, p. 42.

SAS, 2001. SAS User's Guide: Statistics version 6.12 Edn., SAS Institute, Inc., Cary, NC., USA.

SCHEDLE, K. – HASLINGER, M. – LEITGEB, R. – BAUER, F. – ETTLE, T. – WINDISCH, W. 2006. Carcass and meat quality of broiler chickens at different starving period before slaughter. In *Veterinarija ir Zootechnika*, vol. 35, 2006, p. 85-88.

SONGISEPP, E. – KALS, J. – KULLISAAR, T. – MÄNDAR, R. – HÜTT, P. – ZILMER, M. – MIKELSAAR, M. 2005. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. In *Nutrition Journal*, vol. 4, 2005, p. 22-32.

TANNOCK, G. W. – TILSALA, A. – TIMISJÄRVI, S. – RODTONG, J. – MUNRO, K. – ALATOSSAVA, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. In *Applied and Environmental Microbiology.*, vol. 65, 1999, p. 4264-4267.

WEIS, J. – HRNČÁR, C. – MINDEK, S. 2008. Effect of probiotic preparates with different strain on meat production of broiler ducks. In *Scientifical Papers. Animal Science and Biotechnologies*, vol. 41, 2008, 717-720.

WEIS, J. – HRNČÁR, C. – PÁL, G. – BARAŇSKA, B. – BUJKO, J. – POLIČKA, M. – MALÍKOVÁ, L. 2010. Effect of probiotic strain *Lactobacillus fermentum CCM 7158* supplement on performance and carcass characteristics of broiler chickens. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 13, 2010, p. 96-98.

WILLIS, W. L. – REID, L. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. In *Poultry Science*, vol. 87, 2008, p. 606-611.

YOON, C. – NA, C. S. – PARK, J. H. – HAN, S. K. – NAM, Y. M. – KWON, J. T. 2004. Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. In *Korean Journal of Poultry Science,* vol. 3, 2004, p. 229-235.

ASSESSEMENT OF ACROLEIN-INDUCED CELLULAR DAMAGE IN THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS USING MICROSCOPY TECHNIQUES

Renata ZADRAG-TECZA[*]*, Magdalena KWOLEK-MIREK*

University of Rzeszow, Faculty of Biology and Agriculture, Department of Biochemistry and Cell Biology, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszow, Poland
*Corresponding author: retecza@univ.rzeszow.pl

Abstract

Acrolein is well-known and commonly found a compound showing cytotoxic activity. This study was aimed at a comparison between numerous tests based on the technique of bright-field and fluorescence. We applied the non-fluorescent dye PhloxineB or the single or double staining procedure with specific fluorescent dyes like fluorescein diacetate (FDA), propidium iodide (PI), FUN-1, 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI), MitoTrackerGreen, Rhodamine-Phalloidin and immunofluorescence technique to assess the viability, metabolic activity, structural changes and oxidative protein damages in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to acrolein. The comparison of the results showed that the microscopic methods are a simple and very useful research tool for testing the toxicity of chemicals at the cellular level.

Keywords: *yeast, acrolein, oxidative stress, fluorescence, microscopic methods*

Introduction

Fluorescence microscopy is an essential and very important technique used to assess viability and vitality of the cells, visualization of cellular organelles and localization of macromolecules damages. There are many fluorescent dyes specific for various intracellular structures e.g. DAPI to visualize nuclei, MitoTrackerGreen or RhodamineB to label mitochondria, Rhodamine-Phalloidin to visualize actin cytoskeleton, MDY-64 to label membrane of vacuole or to identify the metabolic activity of the cell e.g. FUN-1 or fluorescein diacetate (FDA). Moreover, the use of fluorescently labeled antibodies allows for the localization of the selected macromolecules. These methods can be especially usefull in toxicological studies.

Cytotoxic substances, which include a number of chemical compounds common occurring in the environment or food products show a multidirectional action in the cell. Disorders which result from their actions affect both the structural elements of the cell and the activities of numerous metabolic pathways. The cell response depends on the concentration and time of exposure of the toxic compounds and it may be: the cell cycle arrest, changes of the metabolic activity and/or intracellular structures of the cell and the cell death induction by necrosis or apoptosis. An example of this type of compound is acrolein, chemically classified to the unsaturated aldehydes. It is a common ingredient / cause of environmental pollution as a by-product the incomplete combustion of petrol or the basic fuel materials as carbon or wood. It is also compound of the tobacco smoke (**Caffaro-Filho *et al.*, 2010**). This aldehyde is also found in many types of food undergoing heat treatment such as animal and vegetable fats (**Abraham *et al.*, 2011**), but also in natural products as vegetables and fruits. It was reported that the toxicity of acrolein involves enhancement of cellular oxidative stress by depletion of glutathione content/level, generation of reactive oxygen species, macromolecules damages (mainly protein and DNA modification) and structural alteration on actin cytoskeleton and mitochondrial network (**Kwolek-Mirek *et al.*, 2009, Kwolek-Mirek and Bartosz, 2011**).

In this paper we present various methods for studying the toxicity of acrolein based on the fluorescence microscopy, using a simple eukaryotic model of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Material and methods

Yeast strains

The following yeast strains were used: wild-type SP4 MATα *leu1 arg4* (**Bilinski *et al.*, 1978**), and Δ*sod1* mutant, isogenic to SP4, MATα *leu1 arg4 sod1::natMX* (**Koziol *et al.*, 2005**).

Media, growth conditions and condition of incubation

Yeast was grown in a standard liquid medium (YPD; 1% yeast extract, 1% yeast bacto-peptone, 2% glucose) on the shaker (150 rpm/min), at a temperature 28°C.

Cells from exponential phase culture were centrifuged, washed twice, suspended to a final density of 10^8 cells/ml in 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA and 0.1% glucose, and incubated with shaking for 60 min with 0.4 mM allyl alcohol (*precursor of acrolein in the cell)* (**Bilinski *et al.*, 2005**), at 28°C.

Viability assays

For verification of budding cells, after incubation with allyl alcohol 5 µl of cell suspension were spotted on the plate with solid YPD medium. At the start of the experiment and after 24 h of culture. Cultures were grown at 28°C.

Viability of cells was estimated with 10 µg/ml PhloxineB (2 mg/ml stock in MilliQ water) (**Minois *et al.*, 2005**). After incubation the cells were collected by centrifugation, washed twice and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). For image acquisition was used OLYMPUS BX-51 fluorescence microscope equipped with a DP-72 digital camera and analysis software Cell^D.

Fluorescent dyes and antibodies

Fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) were from Sigma-Aldrich (Poznan, Poland), 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI), FUN-1, MitoTrackerGreen, Rhodamine-Phalloidin were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA), primary polyclonal rabbit antibody specific to the 2,4-dinitrophenol-hydrazine (DNP) moiety of the proteins (ab6306) and goat anti-rabbit conjugated with Chromeo™ 546 secondary antibody (ab60317) were from Abcam (Cambridge, UK).

Fluorescence microscopy

After incubation the cells were collected by centrifugation, washed twice and resuspended in appropriate medium depending on the staining procedure. Cell suspension contained about 1×10^7 cell/ml were stained in appropriate conditions shown in Table 1 and according to the manufacturer's protocols (Molecular Probes). For image acquisition was used OLYMPUS BX-51 fluorescence microscope equipped with a DP-72 digital camera and analysis software Cell^D.

Table 1

Yeast cell staining conditions

Fluorochrom	Dye concentration in sample	Medium	Incubation time [min]	Staining temperature [°C]	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
FDA/PI	10 µg/ml/5 µg/ml	PBS	15	RT	480	520
FUN-1	5 µM	10 mM Na-HEPES, pH 7.2, 2% glucose	15	28	480	530-570
DAPI	1 µM	PBS	15	RT	340	410
MitoTrackerGreen	100 nM	10 mM Na-HEPES, pH 7.4, 5% glucose	15	RT	490	516
Rhodamine-Phalloidin	0.05 U/ml	PBS	30	RT	540	565

In situ detection of carbonylated protein

The carbonyl groups in the yeast cells were determined by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and detected with anti-DNP antibodies according to the protocol (**Aguilaniu *et al.*, 2003**). The protocol is based on the classical immuno-fluorescence protocols, we used 2,4-dinitrophenol-hydrazine to derivatize protein carbonyl groups and the primary polyclonal rabbit antibody against the dinitrophenyl-carbonyl moieties at a 1:10 000 dilution and the secondary goat anti-rabbit antibodies conjugated with Chromeo™ 546 at a 1:1000 dilution. For image acquisition OLYMPUS BX-63 fluorescence microscope was used, equipped with a DP-72 digital camera and analysis software cellSense.

Results and discussion

The yeast *S. cerevisiae* are very useful model for toxicity studies of various chemical compounds (**Bilinski *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2007, Kwolek-Mirek *et al.*, 2009**). These studies are based mainly on assessment of cell viability. Traditional method of viability assay is the counting colony forming units on agar plates. This method has several limitations and it does not show various cellular parameters changes caused by the cytotoxic compounds (**Breeuwer and Abee, 2000**).

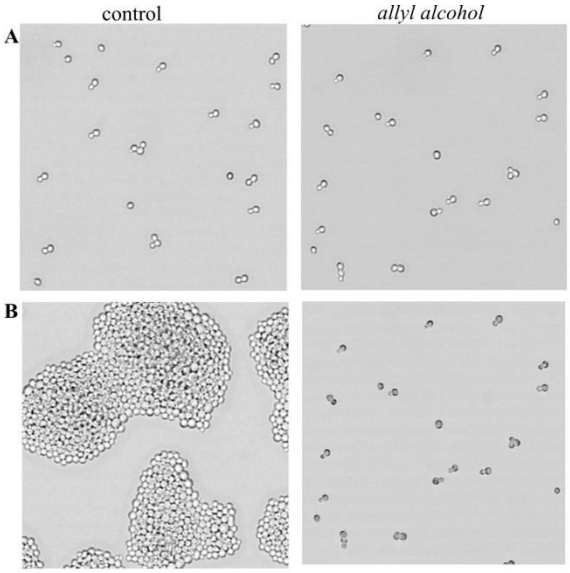


Figure 1
The effect of incubation with allyl alcohol on the yeast growth on solid medium. Cells growth were inspected within 24 h. (A) at the start of the experiment, (B) after 24 h of culture. *Magnification* 200×

Figure 1 shows a decrease in viability of the yeast cells treated with 0.4 mM allyl alcohol, which would indicate a very high toxicity of acrolein, which is produced by conversion of allyl alcohol inside the cell. This result does not allow to clearly state, that the cells which are arrested in the cell cycle are dead, or determine their metabolic state. The ability to divide is in fact the result of the many features as the metabolic activity of cells, the level of intracellular damage or intracellular organization.

Another recommended method to determinate cell viability are based on brightfield stains with a vital, unfluorescent dye PhloxineB (**Minois *et al.*, 2005**). This dye is absorbed by all yeast cells, but metabolically active cells are able to pump it out and remain colorless, and non-active or dead cells are red (Fig. 2A). However, the most interesting staining methods are the fluorescence techniques due to their higher sensitivity and specificity. The changes of the yeast cell viability could be detected using double staining method with fluoresceine diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) (**Zheng *et al.*, 2007**). The non-fluorescent FDA molecules pass through the cell membranes and undergo hydrolysis by the cell esterases (**Breeuwer and Abee, 2000**). The reaction result is a fluorescent product – fluorescein, remains in the cytoplasm of vital cell (green fluorescent). Propidium iodide pass only through disrupted cell membrane and therefore PI positive cells (red fluorescent) are considered as dead cells (Fig. 2B).

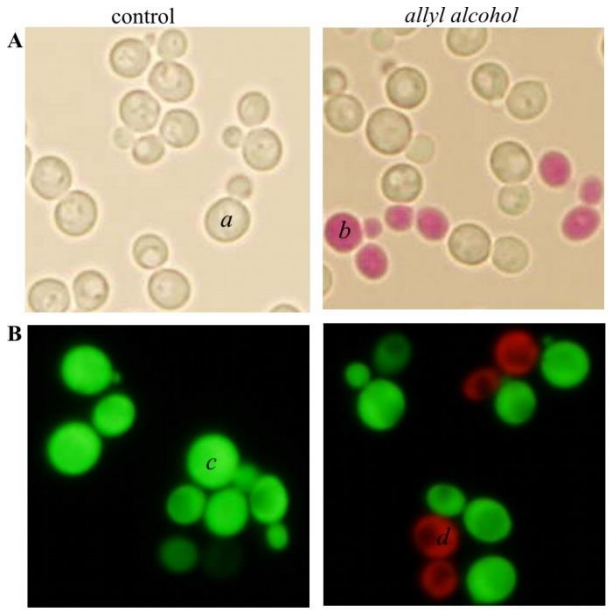


Figure 2
The effect of incubation with allyl alcohol on the yeast viability. (A) cells stained with PhloxineB, *a – live, colorless cell, b – dead, red cell*, (B) cells stained with FDA/PI *c – live, green fluorescent cell, d – dead (PI positive), red fluorescent cell. Magnification* 1000×

The percent of PhloxineB and PI positive cells is much higher for the cells exposed to acrolein and this parameter can be an indicator of the toxicity of this compound.

Both of these methods allow to determine the cell viability but some authors use this method as a test for determination also of the cell vitality as well (**Taya *et al.*, 1989**).

However, much more appropriate fluorophore for studying yeast cell vitality is the FUN-1 dye, which allow to distinguish between metabolically active and inactive or death cells (Fig. 3). This fluorescent, vital dye in metabolically active yeast cells is utilized and given the cylindrical intravacuolar structures within vacuoles (**Eggleston and Marshall, 2007**).

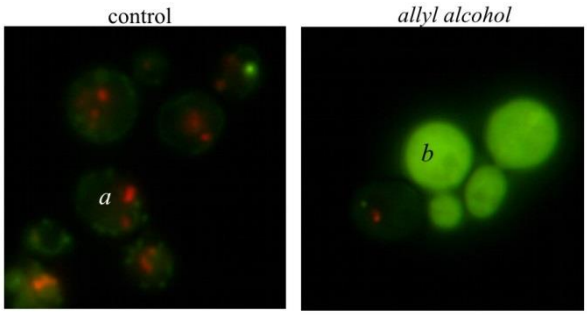


Figure 3
The effect of incubation with allyl alcohol on the metabolic activity of the yeast cells determined with FUN-1 fluorophore. *a – metabolically active cell with red, cylindrical structures within vacuole, b - metabolically inactive cell. Magnification* 1000×

The differences of the vitality and metabolic activity between untreated, controlled cells and cells treated with allyl alcohol, may be a consequence of the changes of cellular structure.

Using the specific for cellular organelles fluorophores as DAPI, Rhodamine-Phalloidin, MitoTrackerGreen can detect any changes in their morphology or localization within the cells (Fig.4). To assess the toxicity of acrolein or other chemicals the changes in the nucleus and DNA are particularly important. DAPI stained cells, after treatment with allyl alcohol, can show apoptotic phenotype as chromatin condensation or nucleus fragmentation (**Madeo *et al.*, 1999**). MitoTrackerGreen is green-fluorescent mitochondrial stain which appears to localize to mitochondria regardless of mitochondrial membrane potential while phalloidin tagged with the fluorescence dye - rhodamine is generally used to monitor distribution of actin microfilaments. The yeast actin cytoskeleton is an important structure that is organized into two structures. The first is actin cables which serve as a tracks for the movement of organelles including mitochondria or vacuoles and second is actin patches (**Pruyne *et al.*, 2004**). The actin microfilaments as highly dynamic structures and sensitive to various drugs and chemicals. Acrolein most likely reduces actin dynamic and it can lead to disintegration of mitochondrial network and a decrease in the cell viability. The changes of actin cytoskeleton are able to modulate also the level of reactive oxygen species (ROS) and consequently lead to increase in the level of oxidative damages (**Gourlay and Ayscough, 2005**).

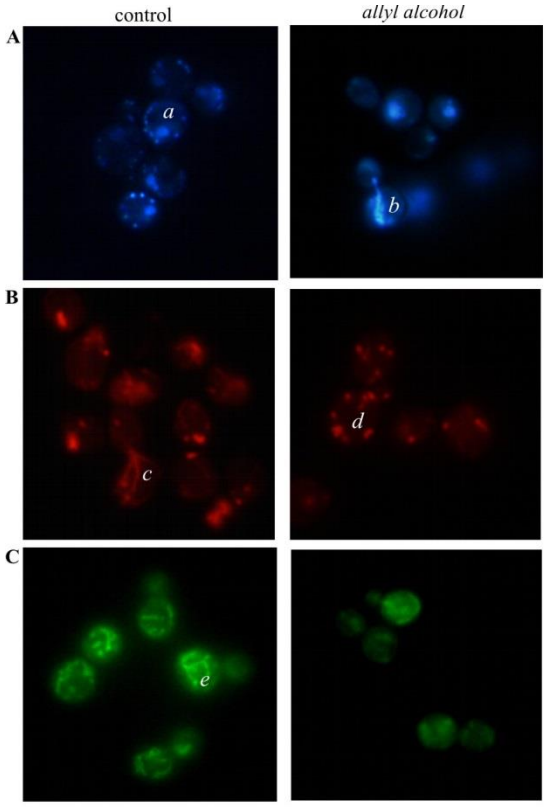


Figure 4
The effect of incubation with allyl alcohol on the cellular organelles. (A) yeast nucleus stained with DAPI, *a – proper nucleus, b - nucleus fragmentation;* (B) yeast actin cytoskeleton stained with Rhodamine-Phalloidin, *c – actin cables, d – actin patches;* (C) yeast mitochondria stained with MitoTrackerGreen, *e – mitochondrial network*. *Magnification* 1000×

To visualization and localization one of the types oxidative damages – oxidative protein damage, indirect immunofluorescence microscopy is the most useful procedure.

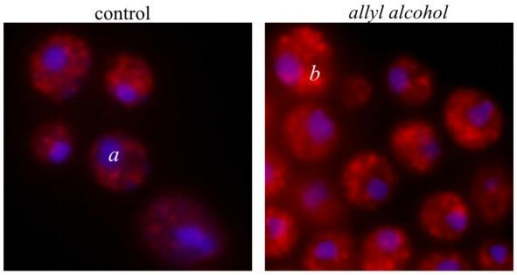


Figure 5
Distribution of oxidatively damaged proteins in yeast cells treated with allyl alcohol,
a – nucleus, b – carbonyl proteins.
Magnification 1000×

This result clearly shows that acrolein leads to increase in the level of the oxidative protein damage within the cells.

All analyzes were performed on both the wild-type strain and Δ*sod1* yeast strain deficient in Cu,Zn-superoxide dismutase, one of the most important enzymes for the cell antioxidant defense. Presented results are based, however, only on the Δ*sod1* yeast cells because these cells are hypersensitive to acrolein, thus observed changes are significantly more pronounced than in wild-type cells and therefore better highlights the advantages of presented methods. This confirms that the mechanism of acrolein toxicity involves induction of oxidative stress in the cell.

Conclusion

The analysis of a various parameters of the cells exposed to acrolein, indicates that the methods based on fluorescence microscopy are a very useful and helpful research tool to assess toxicity of various chemicals. An important advantage is that it is a relatively fast way allowing to determine viability, vitality and metabolic activity of the cells, changes of cellular organelles morphology or intracellular distribution macromolecules damage. These parameters may be therefore useful in identifying the toxicity mechanism of various chemicals. Moreover this fluorescent microscopy method has potential application for high throughput screening for novel drugs or food ingredients.

Acknowledgments:
This study was supported by the Grant Iuventus Plus No. 0289/IP1/2011/71 of Polish Ministry of Science and Higher Education.

References

ABRAHAM, K., ANDRES, S., PALAVINSKAS, R., BERG, K., APPEL, K. E. and LAMPEN, A. 2011. Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Molecular Nutrition & Food Research* 55(9), 1277-1290.

AGUILANIU, H., GUSTAFSSON, L., RIGOULET, M. and NYSTROM, T. 2003. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299(5613), 1751-1753.

BILINSKI, T., KWOLEK, M., SAS, E., KRYNICKA, M., KOZIOL, S., OWSIAK-TELEON, A., KRZEPILKO, A. and BARTOSZ, G. 2005. A novel test for identifying genes involved in aldehyde detoxification in the yeast. Increased sensitivity of superoxide-deficient yeast to aldehydes and their metabolic precursors. *Biofactors* 24(1-4), 59-65.

BILINSKI, T., LUKASZKIEWICZ, J. and SLEDZIEWSKI, A. 1978. Hemoprotein formation in yeast .4. Demonstration of anaerobic catalase synthesis in cz1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 83(3), 1225-1233.

BREEUWER, P. and ABEE, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* 55(1-3), 193-200.

CAFFARO-FILHO, R. A., WAGNER, R., UMBUZEIRO, G. A., GROSSMAN, M. J. and DURRANT, L. R. 2010. Identification of alpha-beta unsaturated aldehydes as sources of toxicity to activated sludge biomass in polyester manufacturing wastewater. *Water Science and Technology* 61(9), 2317-2324.

EGGLESTON, M. D. and MARSHALL, P. A. 2007. Saccharomyces cerevisiae samples stained with FUN-1 dye can be stored at-20 degrees C for later observation. *Journal of Microscopy-Oxford* 225(1), 100-103.

GOURLAY, C. W. and AYSCOUGH, K. R. 2005. A role for actin in aging and apoptosis. *Biochemical Society Transactions* 33), 1260-1264.

KOZIOL, S., ZAGULSKI, M., BILINSKI, T. A. and BARTOSZ, G. 2005. Antioxidants protect the yeast Saccharomyces cerevisiae against hypertonic stress. *Free Radical Research* 39(4), 365-371.

KWOLEK-MIREK, M. and BARTOSZ, G. 2011. *Biochemical and cellular effects of acrolein toxicity in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, *Xenobiotics Environmental exposure, toxicity and physiological response*, Published by the University of Rzeszow, 271-281.

KWOLEK-MIREK, M., BEDNARSKA, S., BARTOSZ, G. and BILINSKI, T. 2009. Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Cell Biology and Toxicology* 25(4), 363-378.

MADEO, F., FROHLICH, E., LIGR, M., GREY, M., SIGRIST, S. J., WOLF, D. H. and FROHLICH, K. U. 1999. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology* 145(4), 757-767.

MINOIS, N., FRAJNT, M., WILSON, C. and VAUPEL, J. W. 2005. Advances in measuring lifespan in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(2), 402-406.

PRUYNE, D., LEGESSE-MILLER, A., GAO, L. N., DONG, Y. Q. and BRETSCHER, A. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20), 559-591.

TAYA, M., YOSHIKAWA, M. and KOBAYASHI, T. 1989. Measurement of viable animal-cell concentration based on fluorometry. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 22(1), 89-94.

ZHENG, K., PAN, J.-W., YE, L., FU, Y., PENG, H.-Z., WAN, B.-Y., GU, Q., BIAN, H.-W., HAN, N., WANG, J.-H., KANG, B., PAN, J.-H., SHAO, H.-H., WANG, W.-Z. and ZHU, M.-Y. 2007. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals. *Plant Physiology* 143(1), 38-49.

Acute Toxicity of Nickel Towards Freshwater Ciliate *Paramecium bursaria*

Patrycja Zagata & Magdalena Greczek-Stachura

Institute of Biology, Pedagogical University, 30-084 Krakow Podchorążych 2

Heavy metals are common contaminants present in aquatic environment and biological systems. The ciliated protista are generally the most abundant group in aquatic ecosystems and they can be used as an effective biological indicators of some pollutants. *Paramecium bursaria* is an unicellular organism which is widely distributed in freshwater environment. *P. bursaria* cells harbor several hundred symbiotic algae in their cytoplasm. The main purpose of this study was to determine in laboratory tests the acute toxicity of nickel chloride ($NiCl_2$) to *Paramecium bursaria*. The ciliates were incubated in solutions with $5x10^{-6}$ to $5x10^{-1}g/dm^3$ of $NiCl_2$ at the temperature of 18^0C, in the light/dark conditions (12L/12D). Observations of cell shape and rate of cell division as well as the swimming behavior of paramecia were conducted after 24, 72 and 120 hours of incubation in the tested solutions and were compared to the control group. Nickel ions might be recognized as one of the most effective immobilizatory agents for cilates. After 10 minutes from the beginning of the incubation the velocity of swimming falls simultaneously the spiralization diminishes and the rotary movement round the long body axis become slower. After next few minutes ciliates becomes a short crawling and stop more frequently. In the immobilization phase cilia of the whole cell work but without performing an effective stroke. The next macronucleus becomes distinctly visible, the vacuoles enlarge and the cell is being deformed. Microscopic observations revealed that the lethal dose was $5x10^{-4}g/dm^3$ and that in less constrained solutions the slowdown and characteristic movements like overturns were observed. The PEA measurements were carried on within 4 days, the first after a 24-hour incubation period in nickel solution. The measured parameter was Fv/Fm. Fv/Fm is a parameter widely used to indicate the maximum quantum efficiency of Photosystem II. These investigations revealed the highest fluorescence efficiency in culture incubating in the least concentration and the shortest time and the lowest one in a control sample, what can indicate the stimulating role of nickel to cells of *Paramecium bursaria*.

HAEMATOLOGICAL CHANGES IN RABBIT'S BLOOD AFTER TWO WEEKS EXPOSURE OF PATULIN.

Katarina Zbynovska[1], Jana Emrichova[1], Anna Kalafova[1], Peter Petruska[1], Lubomir Ondruska[2], Rastislav Jurcik[2], Lubica Chrastinova[2], Anton Kovacik[1], Monika Schneidgenova[1],Eva Tusimova[1], Marcela Capcarova[1]*

[1]Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic
[2]Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecka 2, 949 01 Nitra, Slovak Republic

Abstract

The aim of present study was to analyse haematological parameters in blood of rabbits after patulin administration during two weeks. Animals (adult female rabbits, body weight 4 ± 0.5 kg) were divided into two groups: control group (C) and experimental group (E). Animals in E group received intramuscular injection of patulin (10 μg.kg^{-1}) 4 times. After 2 weeks of exposure the blood was collected and selected haematological parameters (total white blood cell count, lymphocytes count, medium size cell count, granulocytes count, red blood cell count, haemoglobin, haematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration, red cell distribution width, platelet count, platelet percentage, mean platelet volume and platelet distribution width) were analysed by Abacus Junior Vet (Diatron®, Vienna, Austria). Significant decrease ($P < 0.05$) of mean corpuscular haemoglobin concentration in E group in comparison with the C group was observed. In the case of hemoglobin concentration no significant change between both groups were found. Patulin had no effect on the other analysed haematological parameters.

Keywords: patulin, haematology, rabbit

Introduction

Patulin, a genotoxic mycotoxin produced by several species of *Aspergillus, Penicillium* and *Bysochlamys* **(Puel et al., 2010; Ozsoy et al., 2008)** is the most common mycotoxin in apples and apple-derived products **(Puel et al., 2010)**. It contaminates further fruits, such as grapes, oranges, pears, oranges, pears and peaches **(Saxena et al., 2009; Ozsoy et al., 2008)**. The effects caused by this mycotoxin are based on several studies made during the past fifty years; these involve acute, chronic and cellular level effects **(González-Osnaya et al., 2007)**. Cellular effects of patulin include formation of reactive oxygen species, cell cycle arrest, cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, PARP cleavage, ATF3 expression and subseyuent apoptosis **(Kwon et al., 2012; Fribley et al., 2011; Ozsoy et al., 2008)**. Patulin may be neurotoxic, immunotoxic, immunosuppressive, genotoxic, teratogenic and carcinogenic **(González-Osnaya et al., 2007)**. *In vivo* patulin caused severe damage in several organ systems like kidney, intestinal tissue **(McKinley et al., 1982; Speijers et al., 1988)** and immune system **(Escoula et al., 1988)**, if applied at a range between 2.5 and 41 mg.kg^{-1} bw. Regarding carcinogenicity, the International Agency for Research on Cancer classified patulin in group C, since the evidence of carcinogenicity was considered limited in experimental animal **(International Agency for Research on Cancer, 1986)**. Patulin has a strong affinity for sulfhydryl groups. Patulin adducts formed with cysteine are less toxic than the unmodified compound in acute toxicity, teratogenicity, and mutagenicity studies. Its affinity for SH-groups explains its inhibition of many enzymes **(Puel et al., 2010)**. Toxic signs consistently reported in all studies were agitation, in some cases convulsions, dyspnea, pulmonary congestion, edema, and ulceration, hyperemia and distension of the gastro intestinal tract **(WHO, 1998)**. Based on the provisional maximum tolerable daily intake (400 ng.kg^{-1} bw/day), several countries have set legislations for the maximum amount of patulin in apples products. In the Europen Unioin, the limit is

set to 50 μg.kg^{-1} in apple juice and cider, 25 μg.kg^{-1} in solid apple products (*e.g.* apple sauce) and 10 μg.kg^{-1} in products for infants and young children (**Commission of the European Communities, 2003)**. The aim of present study was to analyse haematological parameters in blood of rabbits after patulin administration during two weeks.

Materials and Methods

Animals

Adult female rabbits (n = 32), maternal albinotic line (crossbreed Newzealand white, Buskat rabbit, French silver) and paternal acromalictic line (crossbreed Nitra's rabbit, Californian rabbit, Big light silver) were used in experiment. Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment.

Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Water was available at any time from automatic drinking troughs. Groups of adult animals were balanced for age (150 days) and body weight (4 ± 0.5 kg) at the beginning of the experiment. Adult rabbits were fed diet of a 12.35 MJ.kg^{-1} of metabolizable diet (Table 1) composed of a pelleted concentrate.

Animals were divided into two groups: control group (C) without addition of patulin and experimental group (E) with addition of patulin (10 μg.kg^{-1}). Animlas from experimental group received patulin through intramuscular injection twice a week for two weeks.

In this animal study, institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed, and all experimental procedures involving animals were approved by ethical committee.

Blood sampling and analyses

Blood samples from *vena auricularis* were taken from all animals by macromethods after two weeks of patulin administration.

In whole blood, selected haematological parameters [total white blood cell count (WBC), lymphocytes count (LYM), mediumsize cell count (MID), granulocytes count (GRA), red blood cell count (RBC), haemoglobin (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDWc), platelet count (PLT), platelet percentage (PCT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDWc)] were measured using haematology analyzer Abacus junior VET (Diatron®, Vienna, Austria).

Statistical analyses

The data used for statistical analyses represent means of values obtained in blood collection. To compare the results, t-test was applied to calculate basic statistic characteristics and to determine significant differences among the experimental and control groups. Statistical software SIGMA PLOT 12.0 (Jandel, Corte Madera, CA, USA) was used. Differences were compared for statistical significance at the level $P < 0.05$.

Table 1.

Chemical composition (g.kg^{-1}) of the experimental diet.

Component	
Dry matter	926.26
Crude protein	192.06
Fat	36.08
Fibre	135.79
Non-nitrogen compounds	483.56
Ash	78.78
Organic matter	847.49
Calcium	9.73
Phosphorus	6.84
Magnesium	2.77
Sodium	1.81
Potassium	10.94
Metabolizable energy	12.35 MJ.kg^{-1}

Results and Discussion

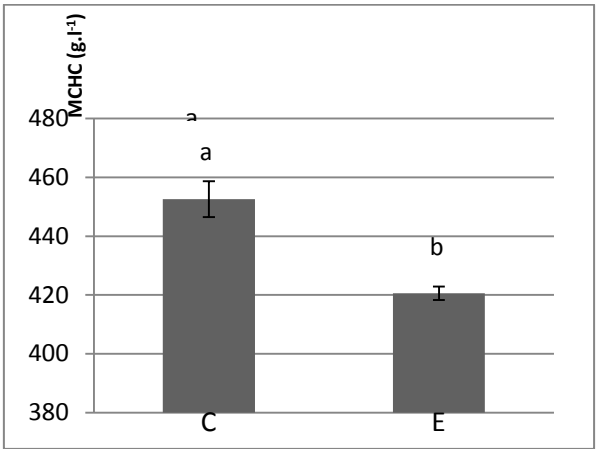
The results are presented in Table (2). Patulin had no significant influence on the most of observed parameters ($P > 0.05$). Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC) is the mean concentration g.l^{-1} of haemoglobin of cells, as an index that is independent of the size of the red cells and therefore, is a true expression of Hb level **(Sharma and Sinhg, 2007)**. In present study significant decrease ($P < 0.05$) of MCHC in E group in comparison with the control group (C) was observed (Figure 1). In another study **Petruška and Capcarová (2012)** observed after chronic application of quercetin and acute dose of T-2 toxin slight–decrease of MCHC in all experimental groups in comparison with the control group. **Capcarová et al. (2011)** found no effect of *Rhus coriaria* on MCHC in rabbits after dietary inclusion. Similar results were observed by **Ewuola and Egbunike (2008)** who examined haematological response of growing rabbit bucks fed dietary fumonisin B_1. In our study in the case of HGB no significant change ($P > 0.05$) in experimental group in comparison with the control group was observed, however slight decreased in E group was noted. In different study **Raju and Dewegoeda (2000)** observed similar effect of aflatoxin, ochratoxin and T2-toxin on HGB of broilers. **Ewuola and Egbunike (2008)** found that after fumonisin B_1 administration in growing rabbits haemoglobin concentration decreased, but only in concentration 10 mg.kg^{-1} of fumonisin B_1 in diet was significantly lower in comparison with other experimental groups. **Gbore and Akele (2010)** found that concentration of haemoglobin of female rabbits significantly decreased after fumonisin administration. Increase of MID and PLT in experimental group in comparison with the control group was found in this study, but without significant differences ($P > 0.05$). **Petruška and Capcarová (2012)** recorded decrease of PLT count in rabbits after quercetin and T-2 toxin treatment. **Ewuola and Egbunike (2008)** found no changes in count of PLT after treatment of fumonisin B_1 in growing rabbits. In this paper lower LYM count was found in E group when compared with the control, but without significant differences ($P > 0.05$). **Gbole and Akele (2010)** observed significant decrease of PLT after fumonisin administration in female rabbits. In another study **Petruška and Capcarová (2012)** found after chronic application of quercetin and acute dose of T-2 toxin slight decrease of PLT in rabbits. Patulin had no effect on the other analyzed parameters. Changes in haematology parameters could be related to the fact that patulin has a strong affinity for sulfhydryl groups. Its affinity for SH-groups explains its inhibition of many enzymes. It is interesting how little is known yet on the pharmacokinetic behaviour and metabolism of patulin.

Table 1

Haematological parameters of rabbits after patulin administration

Parameter	C	E
WBC	9.81±1.78	9.74±2.52
LYM	5.71±1.28	2.19±0.25
MID	0.28±0.09	0.51±0.15
GRA	3.86±0.91	4.75±1.19
RBC	6.00±0.13	5.44±0.12
HGB	142.55±4.74	128.62±8.25
HCT	32.37±2.70	30.59±1.93
MCV	54.05±5.65	56.28±3.61
MCH	23.79±1.31	23.67±1.47
MCHC	452.59±6.07^{a}	420.56±2.79^{b}
RDWc	19.70±1.05	19.37±0.65
PLT	201.52±65.73	235.30±82.55
PCT	0.11±0.04	0.14±0.05
MPV	5.42±0.27	5.79±0.34
PDWc	27.44±2.03	28.97±1.97

WBC. total white blood cell count ($10^{9}.l^{-1}$); LYM. lymphocytes count ($10^{9}.l^{-1}$); MID. medium-sized cell count; GRA. granulocytes count ($10^{9}.l^{-1}$); RBC. red blood cell count ($10^{12}.l^{-1}$); HGB. haemoglobin ($g.l^{-1}$); HCT. haematocrit (%); MCV. mean corpuscular volume (fl); MCH. mean corpuscular haemoglobin (pg); MCHC. mean corpuscular haemoglobin concentration ($g.l^{-1}$); RDWc. red cell distribution width (%); PLT. platelet count ($10^{9}.l^{-1}$); PCT. platelet percentage; MPV. mean platelet volume (fl); PDWc. platelet distribution width (%).
C - control group without addition of patulin. E - experimental group with addition of patulin (10 $\mu g.kg^{-1}$). The values shown are the mean ± SD (standard deviation). a.b - in row means significant difference (P ‹ 0.05).



Figure

Effect of patulin on MCHC in blood of rabbits

C = control group. E = experimental group

Conclusion

In this experiment the two weeks intramuscular application of patulin resulted in slight changes in haematological parameters of rabbits. Administration of patulin three times a week significantly decreased MCHC in E group in comparison with control group. Decrease in HGB was found without significant differences. We observed insignificant increase in MID and PLT in E group in comparison with the control group.

Further investigation with haematological response of animals will be worthy of further investigation.

Acknowledgments
This work was financially supported by VEGA scientific grant, 1/0084/12, and 1/0022/13.

References

Capcarová, M., Slamečka, J., Abbas, K., Kolesárová, A., Kalafová, A., Valent, M., Filipejová, T., Chrastinová, L., Ondruška, L., Massányi, P. (2011): Effects of dietary inclusion of Rhus coriaria on internal milieu of rabbits. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96. 459-465.

Commission of thze European Communities. Commission Regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin 2003.

Escuola, L., Thomsen, M., Bourdiol, D., Pipy, B., Peuriere, S., Roubinet, F. (1988): Patulin immunotoxicology:effect on ohagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. International Journal of Immunopharmacology, 10. 983-989.

Ewuola, E.O., Egbunike, G.N. (2008): Haematological and serum biochemical response of growing rabbit bucks fed dietary fumonisin $B_{1.}$ African Journal of Biotechnology, 7. 4304-4309.

Fribley, A.M., Cruz, P.G., Miller, J.R., Callaghan, M.U., Cai, P., Narula, N., Neubig, R.R., Showalter, H.D., Larsen, S.D., Kirchhoff, P.D., Larsen, M.J., Burr, D.A., Schultz, P.J., Jacobs, R.R., Tamayo-Castillo, G., Ron, D., Sherman, D.H., Kaufman, R.J. (2011): Complementary cell-based high-throughput screens identify novel modulators of the unfolded protein response. Journal of Biomolecular Screening, 16. 825-835.

Gbore, F.A., Akele, O. (2010): Growth performance, haematology and serum biochemistry of female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) fed dietary fumonisin. Veterinarski Arhiv, 80. 431-443.

González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2007): Exposure to patulin from consumption of Apple-based products. Food Aditives and Contaminants, 24. 1268-1274.

IARC. (1986): Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 40. 83–98.

Kwon, O., Soung, N.K., Thimmegowda, N.R., Jeong, S.J., Jang, J.H., Moon, D.O., Chung, J.K., Lee, K.S., Kwon, Y.T., Erikson, R.L., Ahn, J.S., Kim, B.Y. (2012): Patulin induces colorectal cancer cells apoptosis through EGR-1 dependent ATF3 up-regulation. Cell Signal, 24. 943-950.

McKinley, E.R., Carlton, W.W., Boon, G.D. (1982): Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology and clinical pathology. Food and Chemical Toxicology, 20. 289-300.

Ozsoy, N., Selmanoglu, G., Kockaya, E. A., Gul, N., Cebesoy, S. (2008): Effect of patulin on the interdigitating dendritic cells (IDCs) of rat thymus. Cell Biochemistry and Function, 26. 192-196.

Petruška, P., Capcarová, M. (2012): Effect of chronic application of quercetin and acute dose of T-2 toxin on haematological parameters of rabbits. Mendel Net, Internation students conference 2012 in Brno. 981-988.

Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. (2010): Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins, 2. 613-631.

Raju, M.V., Devegowda, G. (2000): Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). British Pultry Science, 41. 640-650.

Saxena, N., Ansari, K.M., Kumar, R., Dhawan, A., Dwivedi, P.D., Das, M. (2009): Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p(53) and p(21/WAF1) proteins in skin of mice. Toxicology and Applied Pharmacology, 234. 192-201.

Sharma, G., Singh, S. (2007): Effect of indofil toxicity on MCHC of *Channa punctatus.* Journal of Environmental Research And Development, 1. 261-263.

Speijers, G.J., Franken, M.A., van Leeuwen, F.X. (1988): Subacute toxicity study of patulin in the rat:effects on the kidney and the gastrointestinal tract. Food and Chemical Toxicology, 26. 23-30.

WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives (JECFA), Position paper on patulin, 30th session, The Hague, The Netherlands, 9–13 March, 1998.

ENTEROTOXIGENIC POTENTIAL THE SAME BACTERIA OF *STAPHYLOCOCCUS SPP.* IN MASTITIS OF DAIRY COWS AND SHEEP

Zigo F[1], Vasiľ M[1], Elečko J[1], Farkašová Z[1], Bulla J.[2]*

1. *Department of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic*
2. *Slovak University of Agriculture, A. Hlinku, Nitra, Slovak Republic*

Abstract

The aim of this work was to evaluate the occurrence of *Staphylococcus spp.* on the overall prevalence of mastitis in cows and sheep farms in eastern Slovakia, and determine incidence of enterotoxigenicity and other characteristics of bacterial isolates. Were tested presence of genes encoding production of enterotoxins (*sea, seb, sec, sed, see*) and the production individual types of staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) in milk samples of cows and sheep. In a two-year experiment of testing 2916 individual samples of cow's and sheep's milk were recorded bacteria *Staphylococcus spp.* 18.41% (537). Using PCR methods was confirmed the presence of the gene (*seg*) encoding staphylococcal enterotoxins (SE) in 5.21% (28 cases). By using the Ridascreen® Set, (B), (C), (D), (E) was recorded *in vitro* production of SE in 4.28% (23 cases). Four species isolated from samples of cow's milk produced the following types of SE: *S. aureus* - SEC (4) and SEE (1), *S. haemolyticus* - SEA, *S. chromogenes* - SEC (2) and SED (1), *S. simulans* - SEA (1). The staphylococci isolated from samples of sheep's milk produce SE: *S. aureus* - SEA, SEB (1) and (2) SEC (3), *S. intermedius*, *S. chromogenes* - SEC-SEC (3), *S. xylosus* - SED (1). A common feature of the enterotoxigenic bacteria was the creation of a biofilm. Formation of hyaluronidase and lysins α, β and δ have been confirmed as positive for *S. aureus* and *S. intermedius*. Creation of lysine α has been confirmed for strains of *S. chromogenes.* The production of hyaluronidase in CPS was significant on significant level $\alpha = 0.001$. Formation of hemolysines only on significant level $\alpha = 0.01$. Other following properties were non significant.

In spite legislatively obligatory pasteurization of milk before further processing, a relatively high percentage of enterotoxigenic strains of staphylococci isolated from the milk of sheep and cows can pose a significant risk especially in the marketing of milk and milk products directly from the farm as organic products.

Keywords: mastitis; dairy cow; sheep; staphylococcal enterotoxins; genes

Introduction

Bacteria of *Staphylococcus spp.* as the cause of a wide range of diseases in humans and animals are well known, but in recent decades, especially coagulase-negative staphylococci (CNS) were subsequently diagnosed as the aetiological agent of a wide range of infectious processes and healthy complications (Bansal et al. 2004, Favre et al. 2005, Huang et al. 2006, Lalani et al. 2006). Common are also reported increases frequency of CNS as ruminant mastitis agents in many countries, with significant impact on the economy of milk production.

From samples of cows and sheep milk were isolated strains of bacteria, in which by ELISA and PCR methods were determined the production some of the types of staphylococcal enterotoxins (SE), and was confirmed the presence of the gene (*seg*) responsible for the production of SE (Fagundes et al. 2010).

Enterotoxigenic staphylococci activity is an important virulence factor and was mentioned in relation to their specific contribution to the pathogenesis of mastitis (da Silva et al. 2005) with very frequent

property is the ability to naturally acquire resistance to antibiotics (Orwin et al. 2001). Among equally
important virulence factors of pathogens mammary gland include biofilm formation (Melchior et al. 2006).

Treatment of dairy milk for consumption ensures a standard of consumer protection to the public prior to the occurrence of staphylococcal enterotoxicosis. The free market, however, allows the consumption of milk in homes and other alternative sources without pasteurization. The solution for reducing the risk of enterotoxicosis in these cases is treatment by boiling milk.

The aim of this work was to evaluate the occurrence of *Staphylococcus spp.* on the overall prevalence of mastitis in cows and sheep farms in eastern Slovakia, and determine incidence of enterotoxigenicity and other characteristics of bacterial isolates.

Materials and methods

In the course of two years in the framework of the periodic complex examination were in herd of 120 dairy cows taken 968 samples, and in herd of 350 sheep exanimate 1948 individual milk samples. Clinical examination of udder, classification of mastitis and bacteriology examination were carried out according to Vasiľ (2004).

Taxonomy of staphylococci was used by set STAPHYtest 24 and evaluated by program TNW, version 7.0 ProAuto (Erba Lachema, Brno, ČR). Identified bacteria *Staphylococcus spp.* were examined on presence of genes coding their enterotoxigenic activity *(sea, seb, sec, sed, see)* by PCR method according to (Becker et al. 1998). On the separation of DNA was used QiAMP tissue kit (OIAGEM, Hilden, Germany). Within the PCR method were used reference strains for SEA, SAB, SEC, SED and SEE types of enterotoxins – (Bergdoll; CNCTC, Brno) and commercial oligonukleotids primers. Every strain with confirmed gene was examined for production of enterotoxins by Ridascreen ® Set A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

In relation to forms of mastitis were in enterotoxigenic strains of staphylococci followed production of hemolysins α, β, δ, hyaluronidase and production of biofilm by methods according to Türkyilmaz and Kaya (2006), Boynukara et al. (2008), Krukowski et al. (2008).

On statistical evaluation was used Chi-quadrate test, was tested individual properties of enterotoxigenc CNS compare to enterotoxigenic CPS at significant level $\alpha = 0.001$ (0.1%), and significant level $\alpha = 0.01$, testing criteria G = 45.387; critical value df = 32.91.

Results and discussion

From 2916 examined milk samples were (24.24%) bacteriological positive while *Staphylococcus spp.* was found in 537 cases (18.41%). Summary of isolated staphylococci are described in Table 1.

Table 1

Total result of bacteriology examinations, prevalence of mastitis, percentage ration of the *Staphylococcus spp.* isolated from individual milk samples of dairy cows and sheep

Sample	Individually milk samples			*Staphylococcus spp.*					
	examined	positive	find[1]	CPS		CNS		∑	
	n	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*	*n*	*%*
dairy cow	968	280	28.92	21	2.17	170	17.56	191	19.73
sheep	1948	427	19.73	38	1.95	308	15.81	346	17.76
summary	*2916*	*707*	*24.24*	*59*	*2.02*	*478*	*16.39*	*537*	*18.41*

1 prevalence of mastitis (percentage of positive cases from total number of examined cows and sheep);
CPS – coagulase-positive staphylococci (*S.aureus; S.intermedius*); CNS – coagulase-negative staphylococci

By PCR and ELISA analyses of all strains of *Staphylococcus spp.* was determined enterotoxigenic potential in 28 cases (5.21%). Four species isolated from samples of cow's milk produced the following types of SE: *S. aureus* - SEC (4) and SEE (1), *S. haemolyticus* - SEA, *S. chromogenes* - SEC (2) and SED (1), *S. simulans* - SEA (1).

Presence only gene coding relevant enterotoxigenic activity was certified in *S. aureus* (*sea, sec*), and *S. simulans* (*sec*). General 13 (6.80%) strains of *Staphylococcus spp.* had an enterotoxigenic potential, but only in 10 cases (5.23%) were determined *in vitro* production of SE.

The staphylococci isolated from samples of sheep's milk produce SE: *S. aureus* - SEA, SEB (1) and (2) SEC (3), *S. intermedius*, *S. chromogenes* - SEC-SEC (3), *S. xylosus* - SED (1). In two cases was certified presence of gene *sec* in strains of *S. intermedius, S. xylosus*. General 15 (4.33%) strains of *Staphylococcus spp.* had an enterotoxigenic potential, but only in 13 cases (3.75%) were determined *in vitro* production of SE.

Enterotoxigenic staphylococci isolated from milk of ruminants were in generally presented by strains of *S. aureus* (7/6), and *S. chromogenes* (7/6). While cow's milk accounted for generic representation of *S. haemolyticus* (1) S. simulanss (2), originating from sheep's milk has been linked to the species S. intermedius (2), *S. epidermidis* (2) and *S. xylosus* (2). Up to half of the strains produced SEC, in particular, it was the *S. aureus* and *S. chromogenes*.

Table 2

Occurrence of enterotoxigenic staphylococci (n = 28) according to number of samples and species of isolated bacteria (n = 537)

Enterotoxigenic bacteria *Staphylococcus spp.* (n / %)			Production of SE, presence of genes					
			SEA	SEB	SEC	SED	SEE	*seg*
Isolated from mastitis in cow (n = 191)								
S. aureus	7	3.66			4		1	*sea*, *sec*
S. haemolyticus	1	0.52	1					
S. chromogenes	3	1.57			2	1		
S. simulans	2	1.04	1					*sec*
summary	13	6.80	2	0	6	1	1	3
Isolated from mastitis in sheep (n = 346)								
S. aureus	6	1.73	2	1	3			
S. intermedius	2	0.57			1			*sec*
S. chromogenes	3	0.86			3			
S. epidermidis	2	0.57	1		1			
S. xylosus	2	0.57				1		*sec*
summary	15	4.33	3	1	8	1	0	2

Accompanying the origin and some properties of the tested species of *Staphylococcus spp.* are shown in Table 3. Staphylococci isolated from cow's milk are equally involved in acute, subacute and subclinical mastitis. In contrast enterotoxigenic staphylococci from sheep's milk came primarily from acute and subacute mastitis. The common feature of enterotoxigenic strains, were the biofilm formation. The production of hyaluronidase and lysine α, β and δ were certified as properties characteristic for coagulase positive *S. aureus* and *S. intermedius*. Formation of lysine α was determined also in *S. chromogenes*.

Increased incidence of coagulase-negative staphylococci (CNS) at intramammary infections in cows is closely associated with an increased number of somatic cells (SCC) in milk, which is an important indicator of the quality of milk in its economic recovery (Lam et al. 1997, White et al. 2001).

Correlation between the prevalence of mastitis caused by CNS and increased SCC in cow's milk confirmed Borm et al. (2006), when antibiotic therapy reduced the proportion both variables to a minimum. Taponen et al. (2006) report the occurrence of CNS in the context of severe inflammatory reactions of udder in primiparous before calving, which threaten favourable onset of lactation.

Table 3

Forms of mastitis and selected factors of pathogenity in enterotoxigenic species of staphylococci (n = 28)

Enterotoxigenic *Staphylococcus spp.* (n)		Forms of mastitis	Lysine	Hyaluronidase	Biofilm
Isolated from mastitis in cows					
S. aureus	7	AK 3; SBA 2; SBK 2	α 4; β 2	3	7
S. haemolyticus	1	SBK	-	-	1
S. chromogenes	3	AK 1, SBA 2	α 2	-	2
S. simulans	2	SBK 2	-	-	-
summary	13	AK 4; SBA 4; SBK 5	α 6; β 2	3	10
		Isolated from mastitis in sheep			
S. aureus	6	AK 4; SBA 2; SBK 1	α 1; β 1; δ	5	6
S. intermedius	2	AK 1; SBA 1	α 1	1	2
S. chromogenes	3	AK 2; SBA 1	α 1	-	3
S. epidermidis	2	SBA 1; SBK 1	-	-	2
S. xylosus	2	SBA 1; SBK 1	-	-	2
summary	15	AK 7; SBA 6; SBK 2	α 3; β 1; δ	6	15

AK - acute mastitis; SBA – subacute mastitis; SBK - subclinical mastitis

Among the many literary sources follows that CNS frequently isolated from mastitis cows and sheep are: *S. chromogenes, S. haemolyticus, S. capitis, S. capri, S. cohnii, S. epidermidis, S. hominis, S. saprophyticus. S. sciuri, S. simulans, S. warneri* and *S. xylosus,* while in many of whom were recorded production of any type of staphylococcal eneterotoxins *in vitro*, and has been validated gene (*seg*) responsible for the production of SE (Cenci-Goga et al. 2003; Loncarevic et al. 2005).

From the mutual comparison of selected properties in individual lines in Table 4 resulted, that the production of hyaluronidase in CPS was significant on significant level $\alpha = 0.001$. Formation of hemolysines only on significant level $\alpha = 0.01$. Other following properties were non significant.

Table 4

Evaluation of relation of coagulase-positive and coagulase-negative enterotoxigenic staphylococci causing different forms of mastitis to selected properties

Selected properties of enterotoxigenic staphylococci		CPS (n = 15)		CNS (n = 13)		Test* (α = 0.001)
		+	-	+	-	
caused	clinical mastitis	12	3	8	5	1.171 ^{N}
	subclinical mastitis	3	12	6	7	2.181 ^{N}
produced	hemolysine α, β, δ	12	3	3	10	9.053 ^{X}
	hyaluronidase	9	6	0	13	11.502^{Z}
	biofilm	15	0	10	3	3.890^{N}

CPS (coagulase-positive staphylococci – *S. aureus; S. intermedius*); CNS (coaguase-negative staphylococci – *S. haemolyticus; S. chromogenes; S.epidermidis; S. simulans; S. xylosus*);

*- Chi-quadrate test (in significant level α = 0.001 (0.1%) critical value df = 10.828); ^{N} – independence of individual signs is on significant level α = 0.001; ^{Z} – dependence of individual signs is on significant level α = 0.001; ^{X} – dependence of individual signs is only on significant level α = 0.01n (1.0%), valid critical value df = 6.635

Conclusion

The work presents results from testing of 968 individual milk samples originating from herd of 120 dairy cows for a period of two years. In the total bacteriological finding 280 positive samples (28.92%), was recorded incidence of *Staphylococcus spp.* in 191 cases (19.73%). Was confirmed the presence of the gene (*seg*) encoding staphylococcal enterotoxins (SE) in 6.80% (13) cases, *in vitro* production of SE was observed in 5.23% (10) cases.

From the examination of 1948 individual milk samples originating from herd of 350 sheep for the same period were 427 samples positive (19.73%), and was recorded 17.76% incidence of *Staphylococcus spp.* (346 bacteria). The presence of the gene responsible for production of SE was reported in 4.33% (15) cases. *In vitro* production of SE was determined in 3.75% (13) cases. The production of hyaluronidase in enterotoxigenic CPS was significant on significant level α = 0.001. Formation of hemolysines only on significant level α = 0.01. Other following properties were non significant.

The observed results highlight the need for increased attention to the species of coagulase-negative staphylococci groups who was demonstrated enterotoxigenic potential, for example in evaluating the effectiveness of hygienic programs in facilities processing the milk into dairy products.

Acknowledgements

This work was supported by projects APVV-0679-10, APVV-0629-07 and project VEGA 1/0449/13.

References

BANSAL, S., JAIN, A.., AGARWAL, J., MALIK, G.K. 2004. Significance of coagulase negative staphylococci in neonates with late onset septicaemia. *Indian J Pathol Microbiol,* 47, 4, 586-588.

BECKER, K., ROTH, R., PETERS, G. 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin-1 gene. *J Clin Microbiol*, 36, 2548-2553.

BORM, A.A., FOX, L.K., LESLIE, K.E., HOGAN, J.S., ANDREW, S.M., MOYES, K.M., OLIVER, S.P., SCHUKKEN, Y.H., HANCOCK, D.D., GASKINS, C.T., OWENS, W.E., NORMAN, C. 2006. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *J Dairy Sci*, 89, 2090-2098.

BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALISARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. 2008. Classical enterotoxigenic characteristics of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van. Turkey. *Int J Food Microbiol*, 125, 209-211.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. 2003. Research note enterotoxin production by Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. *J Food Protect*, 66, 9, 1693–1696.

DA SILVA, E.R., DO CARMO, L.S., DA SILVA, N. 2005. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in Staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 106, 103–107.

FAGUNDES, H., BARCHESI, L., FILHO, A.N., FERREIRA, L.M., OLIVEIRA, C.A.F. 2010. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Braz J Microbiol*, 41, 376-380.

FAVRE, B., HUGONNET, S., CORREA, L., SAX, H., ROHNER, P., PITTET, D. 2005. Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 26, 8, 697-702.

HUANG, YHU-CH., WANG, Y.H., CHOU, YI-H., LIEN, R. 2006. Significance of coagulase-negative staphylococci isolated from a single blood culture from neonates in intensive care. *Ann Trop Paediatr*, 26(4), 311-318.

KRUKOWSKI, H., SZYMANKIEWICZ, M., LISOWSKI, A. 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Pol J Microbiol*, 57, 3, 253-255.

LALANI, T., KANAFANI, Z.A., CHU, V.H., MOORE, L., COREY, G.R., PAPPAS, P., WOODS, C.W., CABELL, C.H., HOEN, B., SELTON-SUTY, C., DOCO-LECOMPTE, T., CHIROUZE, C., RAOULT, D., MIRO, J.M., MESTRES, C.A., OLAISON, L., EYKYN, S., ABRUTYN, E., FOWLER, V.G. 2006. Prosthetic valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: findings from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25, 6, 365-368.

LAM, T.J.G.M., SCHUKKEN, Y.H., VANVLIET, J.H., GROMMERS, F.J., TIELEN, M.J.M., BRAND, A. 1997. Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am J Vet Res*, 58, 17-22.

LONCAREVIC, S., JØRGENSEN, H.J., LØVSETH, A., MATHISEN, T., RØRVIK, L.M. 2005. Diversity of Staphylococcus aureus enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol*, 98, 2, 344–350.

MELCHIOR, M.B., VAARKAMP, H., FINK-GREMMELS, J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis Infections? *Vet Journal*, 171, 396-407.

ORWIN, P.M., LEUNG, D.Y.M., DONAHUE, H.L., NOVICK, R.P., SCHLIEVERT, P.M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun*, 69, 360-366.

TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H.D., PYÖRÄLÄ, S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol*, 115, 199-207.

TURKYLMAZ, S., KAYA, O. 2006. Determination of some virulence factors in Staphylococcus spp. isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science,* 30, 1, 127-132.

VASIĽ, M. 2004. Inflammatory of udder in dairy cows. UVLF in Kosice, Study text on CD, 132 p. ISBN 89-8077-005-0.

WHITE, L.J., SCHUKKEN, Y.H., LAM, L.J., MEDLEY, G.F., CHAPPELL, M.J. 2001. A multispecies model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. *Epidemiol Infect*, 127, 567-576.

LEAD AND COPPER CONTENT OF THE ROACH, WHITE BREAM AND PERCH ORGANS

ZYŚK Bartłomiej, BINKOWSKI Łukasz, GUZIK Marek, STAWARZ Robert, SCHIMSCHEINER Lucjan

Department of Zoology and Human Biology, Institute of Biology, Cracow Pedagogical University, ul. Podbrzezie 3; 30-054 Kraków

The aim of this study was to describe the place where elements like lead and copper has the highest level. Only females of three species of fish from Nida River were taken. After collected organs – (bones, gonads and heart muscle) elements by atomic absorption spectrophotometry (AAS) was determined in it. The highest level of lead and copper were detected in heart muscle of roach. But in case of the lowest level of lead and copper were detected in white bream gonads.

Keywords: white bream, roach, perch, AAS, lead, copper, fish organs

Introduction

These elements can get to an organism with food, by taking air or by a direct contact with skin. They have mainly an influence on the functionality of the organism they get to. The most harmful metals for living organisms and occurring in environment we are toxic elements such as cadmium, mercury, lead, or caesium. However, biogenic elements which are essential for the functionality of the organism such as zinc or copper, can become as toxic as xenobiotic elements if they are absorbed in too big amount.

Water organisms such as fish are particularly sensitive to water pollution. Since years scientists throughout the world have been doing some researches into the water pollution by different toxins and by some elements, too.

Copper is an essential element to live and it is presented in all organism tissues. . Copper is essential to the process of hemoglobin synthesis, as a coenzyme it falls in the composition of certain enzymes involved in redox processes. It is a component, inter alia, of ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) – plasma protein which regulates metabolism and transport of iron, cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1) taking part in transport of electrons, tyrosinase (EC 1.14.18.1) involved in the process of melanin production, lysine oxidase (EC 1.4.3.13) which takes part, inter alia, in collagen fibers synthesis, dopamine beta – monooxygenase (EC 1.14.17.1) which takes part in the synthesis of peptide hormones, superoxide dismutase (EC 1.11.1.6) which takes part in the protection of aerobic organisms against cytotoxic activity of superoxide, and peptidyl α-amidating monooxygenase (PAM) (EC 1.14.17.3) taking part in the catalysis of incorporating an oxygen atom to the hydroxyl substrate (Mercer, 2001).

It is considered that the tissues of certain animals have a particular tendency to collect copper. The highest level of copper was found in invertebrates - in the blood of annelids, crustaceans and molluscs, where it is a component of hemocyanins (Kabata – Pendias, Pendias, 1999). In vertebrate animals, high copper content was found, inter alia, in the liver of birds (Eun – Young, et al., 1996), human milk (Dorea, 2000), muscles of dolphin (Wood, Van Vleet, 1996), kidneys of rat (Cui, Okayasu, 2008) and gills of fish (Romeo, et al., 1999).

However, lead is an element which gets to living organisms similarly as another xenobiotic element – cadmium by the digestive and respiratory track. Independently of the way of absorption lead gets to peripheral blood, where it is tied by erythrocyte membranes and it is transported together with

blood to different organs and tissues (Hoffman et al., 1985). The highest lead concentration in animals body occurs mainly in the liver, kidneys, brain and bones. Other organs like muscles, gonads, feathers or adipose tissue can also absorb easily lead, what was shown for example of small Australian birds – Zebra Finches by Dauwe et al. (2002). High concentration of this element was found also in human milk teeth, where the highest lead content was in the incisors (Karahalil, et al., 2007).

This metal has a strong influence on activity of many enzymes as acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) (Reddy, et al., 2007), which takes part in nervous impulses transmitting or glutamine synthetase (EC 1.4.1.14), which takes part in transforming glutamate into glutamine (Sierra, Tiffany-Castiglioni, 1991). It also impacts on blood and haematological system harmfully, it hinders the process of hemoglobin synthesis and it shortens the life of erythrocytes (Orłowski 2008). Lead is a strong cytoplasmic poison, it combines with groups of sulfhydryl enzymes and cellular proteins inactivating them. It disorders redox processes, nucleic acids synthesis (RNA and DNA), transformation of high-energy compounds as well as metabolism of some elements (Czerwionka-Szaflarska, Nowak, 1996).

In human's point of view it is important how undesirable substances get to his body. The content of elements in various products eating by man was studied by many scientists throughout the world. The content of such metals for example as Pb, Ni, Cd or Cu was found among others things in honey and bees products (Formicki et.al. 2013), in milk (Abdou, K.A. and Korashy, E. 2001), or in cheese (Ekbal M.A. Ibrahim, 2004), as well as in fish muscles (Yilmaz, et al., 2007, Zyśk, 2013). Fish are an integral component of human's diet so it is important to get to know the content of these elements which have important roles in life in these animal's tissues. All the elements that got to the body wander through it with blood and get beside dorsal muscles also to the myocardium, gonads or bones. Three species of fish: roach (*Rutilis rutilus* L.), white bream (*Blicca bjoerkna* L.) and perch (*Perca fluviatilis* L.) were chosen to the study because they represent various ecological types and they are often caught by anglers in many countries. Roach was chosen as a pelagic species living in the water depths and it eats mainly plant food. White bream is a species living at the bottom of water body and it eats both plant food and animal food, whereas perch is a predatory species penetrating different parts of water.

Materials and methods

The study involved 10 females of three species of white bream (*Blicca bjoerkna*), roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*). The fish were caught in Nida River in the south of Poland. From all caught alive fish were dissected samples (1g) of fresh weight. The samples were dissected from particular organs such as heart muscle (all), fragment of gonads, and bones (ribs). Taken organs were dried at 105° C in order to obtain dry mass of organs. Next the material was mineralized in concentrated nitric acid (HNO3) at the temperature of 90° C until complete dissolution of tissues using VELP Scientifica DK 20 mineralizator. Next the samples were thinned with spectrally pure water to cubic capacity of 10 ml. The samples obtained this way were analysed for the content of lead and copper, which were assayed with atomic absorption spectrophotometry (AAS) in a Cole – Palmer, BUCK 200A apparatus. The results were subjected to statistical analysis using the STATISTICA software involving ANOVA tests and post hoc Tuckey analysis.

Results distribution was checked by Shapiro – Wilk's test. Homogeneity of variance was checked by Levene's test. Statistical significance was defined at $P < 0,05$.

The content of studied elements in water and bottom sediment from Nida River was compared on the basis of the information received from Voivodship Inspectorate for Environmental Protection in WIOŚ Kielce.

Tab.1. Copper and lead content in water and bottom sediment of Nida River according to WIOŚ Kielce

Water	**Cu**	0,0013 mg Cu•L^{-1}
Bottom sediment		4 mg•kg^{-1}
Water	**Pb**	0,0015 mg Pb•L^{-1}
Bottom sediment		8 mg•kg^{-1}

Results

The average copper content in gonads of roach coming from Nida River was 18.645±14.244 µg•g^{-1} s.m but in gonads of white bream was the lowest and it was 7.700±3.372 µg•g^{-1} s.m. The highest copper content in gonads of the examined fish species was in perches and it was 24.899±8.395 µg•g-1 s.m.

There was statistical significance in copper content in gonads between white bream and roach (p=0.001).

The average lead content in gonads of roach was 29.300±36.830 µg•g^{-1} s.m. and was the highest among examined fish species. The average lead concentration in gonads of white bream was 4.043±4.340 µg•g^{-1} s.m and it was the lowest among examined fish species. However, the average lead content in gonads of perches was 16.980±3.931 µg•g^{-1} s.m.

There was statistical significance in lead content in gonads between white bream and roach (p=0.001).

Tab.1 The average lead and copper content in gonads of white breams, perches and roaches expressed in *µg•g^{-1} s.m.±* standard deviation (SD)

	River	**Roach**	**White bream**	**Perch**
Copper	Nida	18.645 ±14.244[a]	7.700 ± 3.372[a]	24.899 ± 8.395
Lead	Nida	29.300 ±36.830[a]	4.043 ± 4.340[a]	16.980 ± 3.931

a- statistical significance ,p < 0.05, between individual fish species

The average copper content in the heart muscle of roach was the highest - 105.423±115.751 µg•g^{-1} s.m, whereas white breams accumulated in their heart only 34.101±24.572 µg•g^{-1} s.m., what gave the lowest average concentration of this element among examined fish species. The concentration of copper in the myocardium of perches was 104.915±9.765 µg•g^{-1} s.m.

There was statistical significance between the roach and white bream (p=0.018).

The average lead content in the heart muscle of roach was 105.484±80.284 μg•g^{-1} s.m. and similarly like in case of copper was the highest in this species among examined fishes. However, the average concentration of lead in the myocardium of white bream was 58.281±108.769 μg•g^{-1} s.m., and in the myocardium of perch was 41.191±30.502 μg•g^{-1} s.m.

There was not statistical significance in lead content in the heart muscle between species (p=0.807).

Tab.2 The average lead and copper content in the heart muscle of white breams, perches and roaches expressed in *μg•g^{-1} s.m.±* standard deviation (SD)

	River	**Roach**	**White bream**	**Perch**
Copper	Nida	105.432±115.751[a]	34.101±24.572[a]	104.915±9.765
Lead	Nida	105.484±80.284	58.281±108.769	41.191±30.502

[a]- statistical significance p < 0.05, between individual fish species

The average copper content in bones of roach was 23.448±19.633 μg•g^{-1} s.m., in white bream only 9.547±6.754 μg•g^{-1} s.m., while the highest average copper content was in bones of perch - 45.287±25.117 μg•g^{-1} s.m.

There was statistical significance in copper content in bones between white bream and roach (p=0.020), and between white bream and perch (p=0.026).

The highest average lead content was found in bones of roach - 70.976±40.992 μg•g^{-1} s.m., the lowest lead concentration was found in bones of white bream - 36.544±10.746 μg•g^{-1} s.m., and the average lead content was in bones of perches - 59.816 ±10.646 μg•g^{-1} s.m.

There was statistical significance in lead content in bones between white bream and roach coming from the Nida (p=0.001).

Tab.3 The average lead and copper content in bones of white breams, perches and roaches expressed in *μg•g^{-1} s.m.±* standard deviation (SD)

	River	**Roach**	**White bream**	**Perch**
Copper	Nida	23.448±19.633[a]	9.547±6.754[a,b]	45.287±25.117[b]
Lead	Nida	70.976±40.992	36.544±10.746	59.816±10.646

[a] - statistical significance, p < 0.05, between individual fish species

[b] - statistical significance, p < 0.05, between individual fish species

Conclusion

Fish are a very specific group of vertebrate animals because they spend all their life in water. They are continually under the influence of various physical and chemical factors which occurs in water. Fish food are different water organisms, plants and animals which are under the influence of the same factors. Metals absorption to the body of fish takes place in two ways, the first one is to absorb them directly from the environment and the second to take them together with food (Sapota, 2008).

Taking into account the concentration of both studied elements in water and the bottom of water body of Nida River it was possible to expect the presence of these metals in examined fish tissues as well.

It was found that organs of all examined fish species – white bream, perch and roach contain as well copper as lead. However, the concentration of these elements in organs of particular fish species was different. Analyzing the results it is important to note high standard errors that were caused by a large result of single scattering group. This can prove about a big interspecific variation in the way of food intake or about presence of single individuals coming from Nida River.

The highest copper level among studied organs was found in the heart muscle of all examined fish species. The concentration of this element in the heart of roaches and perches was definitely higher than in the heart of white breams. Clearly higher copper content was also found in the bones of perches. Similar results of high copper accumulation in the bones were obtained by Moissenko i Kurdyavtseva (2001), studying organs of lavaret (Coregonus lavaretus) and brown trout (*Salmo trutta morpha fario*). High level of this metal in the heart muscle may be associated with high metabolic activity of this organ.

The lowest copper content was in gonads, wherein the lowest its level was found in white bream. However, copper concentration in animals gonads can have seasonal changes which depend on the biology of the species. This fact was found in common frog (*Rana temporaria*), between the period of winter torpor and the mating season of this species - that is the time spent in the water (Stawarz, 1998). According to the author copper content in ovaries of frogs rises in the mating season. Examined fishes were caught in the spring period where it is spawning season of these species. It can be inferred that copper accumulation in gonads of studied fishes was also higher in this period. Apart from that a big amount of substances as well as examined elements is washed out from fields and meadows directly to rivers where fish live during the spring thaw.

The highest lead content was in the heart muscle and bone tissue in all examined fish species. Average the highest lead level was in the heart of roach, whereas the lowest its concentration was in gonads of white bream. At the same time gonads were the place where the lowest was lead accumulation in all studied fish species.

The lead content in the bone tissue of fish was high. This can be attributed to the fact that this metal is continuously installing in the bone structure and its accumulation occurs throughout the life of the organism (Orłowski, 2008). High lead concentration in bones of 6 fish species from the Mediterranean was found by Khalifa et al. (2010), studying some elements content In their organs. Study of lead content, inter alia, in bones of amphibians was also conducted by Stawarz (1998). He found that lead accumulation in bones of common frog (*Rana temporaria*) was very high during the mating season and the period of winter torpor, that is the time spent in the water.

Lead is a metal that has a harmful influence on gonads, it impairs, inter alia, the secretion of testosterone in testicles, thus it causes disorders of spermatogenesis and steroidogenesis (Martynowicz, et al., 2005).

No great concentration of this metal in gonads of examined fish can provide about the processes occurring in the body, which protect gonads against the absorption of harmful substances such as lead to them. Kosior‘s et al. (2002) research confirms the low lead content in gonads of female fish living in the Southern Baltic Sea Lagoons.

The heart muscle of all examined by me fish species contained lead in a very large amount. Most likely it appears that the big amounts of lead in the heart muscle are caused by high metabolic activity of this organ. Lead is transported through the animals’ body with blood (Hoffman et al., 1985). The whole blood contained in the body together with all compounds contained therein,

passes through the heart, and some of these compounds like, for instance lead can be accumulated in cardiac tissue.

The conducted research also demonstrated that the species the least susceptible to accumulation of heavy metals in its organs is white bream, although, it takes the most amount of food from the bottom of water body. Perch and roach contained much more examined elements in their organs than white bream. Such high contents of examined elements that were marked in organs of roach can be explained by UV radiation, which penetrates easier in the high part of water, so in the place of roach living in the reservoirs. Formicki et al. (2006) wrote about such cases studying amphibian larvae. It is possible that physical and chemical factors or species-individual properties have also an influence on it but they were not taken into account. However, high concentration of examined chemical elements in perches can be ca mainly used by predation of this species.

References

Abdou, K.A., Korashy, E., 2001. Lead, Cadmium and management in milk and some milk products in upper Egypt. Assuit. Vet. Med. J., 45, 89: 336-348.

Cui, X., Okayasu, R., 2008. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats. Food and Chemical Toxicology: 46, 12, 3646-3650.

Czerwionka – Szaflarska, M., Nowak, A., 1996. Ołów – nowe spojrzenie na stary problem. Czy istnieje dziś zagrożenie ołowiem? Problemy Lekarskie: 35, 1-2, 65-69

Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2002. Tissue Levels of Lead in Experimentally Exposed Zebra Finches (Taeniopygia guttata) with Particular Attention on the Use of Feathers as Biomonitors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology: 42, 1, 88-92

Dorea, J.G., 2000. Iron and copper in human milk**.** Nutrition: 16, 3, 209-220.

Ekbal, M.A., Ibrahim. 2004. Cadmium, Copper and Lead in Some Kinds of Cheeses. Benha Vet.Med.J., Vol.15, No.2, Dec.2004, 55

Eun-Young, K., Ichihashi, H., Saeki, K., Atrashkevich, G., Tanabe, Sh., Tatsukawa, R., 1996. Metal accumulation in tissues of seabirds from Chaun, Northeast Siberia, Rusia. Environmental Pollution: 92, 3, 247-252.

Formicki, G., Stawarz, R., Zamachowski, W., 2006. Combined effects of lead ions and UV radiation on general metabolism In common frog *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 larvae. Ecological Chemistry and Engineering:13, 1-2, 23-27.

Formicki. G., Greń, A., Stawarz, R., Zyśk, B., Gał, A., 2013. Metal Content in Honey, Propolis, Wax and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. Pol. J. Environ. Stud. Vol. 22. No. 1 (2013), 99-106

Hoffman, D.J., Franson, F.C., Pattee, O.H., Bunck, C.M., Murray, H.C., 1985. Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). Comparative Biochemistry and Physiology: 80 C, 431-439.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 1-400.

Karahalil, B., Avkanat, B., Ertas, N., 2007. Dental lead levels in children from two different urban and suburban areas of Turkey. International Jurnal of Hygiene and Environmental Health: 210, 2, 107-112.

Khalifa, K.M., Hamil, A.M., Al-Houni, A.Q.A., Ackacha, M.A. 2010. Determination of Heavy Metals in Fish Species of the Mediterranean Sea (Libyan coastline) Using Atomic Absorption Spectrometry. Internatrional Journal of PharmTech Research: 2, 2,1350-1354

Kosior,M., Barska, I., Domagała-Wieloszewska, M., 2002. Heavy Metals, ΣDDT and ΣPCB in the Gonads of Pikeperch Females Spawning in Southern Baltic Sea Lagoons. Polish Journal of Environmental Studiem: 11, 2 (2002), 127-133

Martynowicz, H., Andrzejak, R., Mędraś, M., 2005. Wpływ ołowiu na funkcję gonad męskich. Medycyna Pracy: 56 (6), 495-500.

Mercer, J.F.B., 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. Trends in Molecular Medicine: 7, 2, 64-69.

Moissenko, T.I., Kudryavtseva, L.P., 2001. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. Environmental Pollution: 114, 2, 285-297.

Orłowski, Cz., 2008. Metale. W Podstawy toksykologii. (red. Piotrowski J.), Wydawnictwo Naukowo – Techniczne Warszawa: 6, 148-194.

Reddy, G.R., Devi, B.C., Chetty C.S., 2007. Developmental lead neurotoxicity: alterations in brain cholinergic system. Neurotoxicology: 28 (2), 402-407.

Roméo, M., Siau, Y., Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., 1999. Heavy metal distribution in different fish species from Mauritania coast. The Science of the Total Environment: 232, 3, 169-175.

Sapota, A., 2008. Drogi wchłaniania, metabolizm i wydalanie ksenobiotyków. W Podstawy toksykologii. (red. Piotrowski J.). Wydawnictwo Naukowo – Techniczne Warszawa 2008. 3, 63-86.

Sierra, E.M., Tiffany-Castiglioni, E., 1991. Reduction of glutamine synthetase activity in astroglia exposed in culture to low levels of inorganic lead. Toxicology: 65; 295-304.

Stawarz, R., 1998. Analiza zawartości niektórych pierwiastków u żaby trawnej *Rana temporaria* L. w okresie odrętwienia zimowego i pory godowej. Maszynopis pracy doktorskiej. Zakład Zoologii Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

Wood, C.M., Van Vleet, E.S., 1996. Copper, Cadmium and Zinc in Liver, Kidney and Muscle Tissues of Bottlenose Dolphins (Tursiops truncatus) Stranded in Florida. Marine Pollution Bulletin: 32, 12, 886-889.

Yilmaz, F., Özdemir, N., Demirak, A., Tuna, A.L. 2007. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. Food Chemistry: 100, 2, 830-835.

Zyśk, B. 2013. The distribution of cadmium and copper in fish organs. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. April – May 2013, vol. 2, no. 5, 2306-2309