

VĚDECKÝ ČASOPIS

NKF

1998/99



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

20. června 1994

P14



1

ROČNÍK 37 (LXV)
PRAHA
LEDEN 1992
CS ISSN 0375-8427

AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD ČSFR
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Rídí redakční rada: doc. MVDr. Karel Hruška, CSc. [předseda], prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., prof. MVDr. Bohumír Hofírek, DrSc., doc. MVDr. Gabriel Kováč, DrSc., doc. MVDr. Imrich Maraček, DrSc., doc. MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., doc. MVDr. Ivan Rosíval, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Zdeňka Radošová

OBSAH

Antalíková L., Rozínek J.: Morfologicko-cytochemické studium jadérek Sertoliho buněk přežvýkavců	1
Jalč D., Baran M., Petkov A. I., Oblakov N. C., Enev E. I.: Efektivnost vplyvu monenzínu [USA, ČSFR, Bulharsko] na fermentáciu krmnej dávky v umelom bachore [Rusitec]	11
Hanuš O., Benda P., Genčurová V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. Ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu	21
Hanuš O., Genčurová V., Žváčková I.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. Ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze	33
Massanyi L., Janisch R.: Ultraštruktúra membrán kančích spermií preparovaných mrazovým lomom	45
Zajac J., Novotná L., Lopašovský E.: Vyšetřovanie protilátok proti infekčnej bronchitíde hydiny metódami ELISA, HIT a AGPT	57

CONTENTS

Antalíková L., Rozínek J.: Morphological and cytochemistry studies of nucleoli of Sertoli's cells in ruminants	8
Jalč D., Baran M., Petkov A. I., Oblakov N. C., Enev E. I.: The effects of monensin [USA, CSFR, Bulgaria] on the fermentation of feed rations in a artificial rumen [Rusitec]	19
Hanuš O., Benda P., Genčurová V.: Tests of Milkofix, a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I: Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect	31
Hanuš O., Genčurová V., Žváčková I.: Tests of Milkofix, a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part II: Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis	43
Massanyi L., Janisch R.: The ultrastructure of boar spermatozoon membranes treated with freeze fracturing	54
Zajac J., Novotná L., Lopašovský E.: Detection of antibodies to infections bronchitis of fowl by means of ELISA, HIT and AGPT techniques	62

NÁRODNÍ KNIHOVNA



1000931349

MORFOLOGICKO-CYTOCHEMICKÉ STUDIUM JADÉREK SERTOLIHO BUNĚK PŘEŽVÝKAVCŮ

L. Antalíková, J. Rozinek

ANTALÍKOVÁ, L. — ROZINEK, J. (Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha-Uhřetěves): *Morfológico-cytochemické studium jadérek Sertoliho buněk přežvýkavců*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 1—9.

Ve varleční tkáni býka a berana jsme studovali jádra a jádérka Sertoliho buněk. Je známo odlišné morfológico uspořádání jádérka, označované jako multivezikulární jádérko, ale jeho funkční interpretace není jasná. Použili jsme cytochemické metody pro průkaz nukleoproteinů, abychom mohli sledovat jejich výskyt a distribuci v multivezikulárním jádérku. Z výsledků našich pozorování vyplývá, že fibrilární složka, která se nachází mezi vezikuly jádérka, zahrnuje jak acidické, tak bazické nukleoproteiny. Ribonukleoproteiny (RNP) jsme prokázali ve fibrilární složce i v granulích na povrchu jednotlivých vezikul. Tato fakta dokumentují zde probíhající RNA syntézu. Usuzujeme, že jádérka Sertoliho buněk, i když jsou morfológicky odlišná od jadérek somatických buněk, lze považovat za plně funkční.

býk; beran; varle; Sertoliho buňka; jádérko; cytochemie; nukleoproteiny; fibrilární komponenta

V epitelu semenotvorných kanálků dospělých savců existují vedle sebe dvě buněčné populace: zárodečné, proliferační a diferencující se buňky, a Sertoliho buňky, trvale somatické, které se nedělí. Sertoliho buňky mají široké funkční spektrum. Kontrolují a regulují průběh spermiogeneze. Celé chomáče prodlužujících se spermatid jsou zanořeny do výběžků Sertoliho buněk (Wang a Russell, 1983). Ale nejsou to jen transformující se spermatidy, nýbrž i ostatní diferencující se zárodečné buňky, které mají úzkou vazbu na Sertoliho buňky (Weber et al., 1983), jako na elementy mechanické — podpůrné. Syntetická aktivita Sertoliho buněk se projevuje produkcí bílkovin schopných vazby s testosteronem a dihydrotestosteronem (De Jong et al., 1973) a sekrecí estrogenů (Armstrong et al., 1975). Další fyziologickou aktivitou Sertoliho buněk je schopnost fagocytózy jednak degenerujících zárodečných buněk, jednak cytoplazmatických zbytků spermatid (Reddy a Svoboda, 1967).

Z toho všeho vyplývá, že Sertoliho buňky lze považovat za elementy udržující integritu zárodečného epitelu. Sertoliho buňky byly rovněž celou řadou autorů analyzovány morfologicky, resp. ultrastrukturálně, a to u nejrozličnějších druhů savců, od laboratorních zvířat po hospodářsky významné druhy a člověka. V naší elektronmikroskopické studii Sertoliho buněk dvou druhů přežvýkavců (býk, beran) jsme soustředili pozornost na jádérko. Jádérko je velmi dynamická jaderná struktura. Počet, velikost a vzhled jadérek závisí na funkci buňky a jejím aktuálním metabolickém stavu. Jedná se o jasně definovanou oblast interfázního jádra buňky, ve které jsou lokalizovány ribosomální geny a kde probíhá biogeneze ribosomů. Četné morfologické, biochemické a genetické studie ukázaly, že jádérko produkuje 80–90 % buněčné RNA a vytváří komplexní složku hrající úlohu při, již zmíněné, biogenezi ribosomů (Busch a Smetana, 1970; Goessens, 1984; Hadjiolov, 1985).

Klasické schéma jadérka funkční somatické buňky ukazuje skladbu z pěti základních stavebních komponent: folikulární centra, denzní fibrilární komponenta, granulární komponenta, nukleolární intersticiem, (peri) nukleolární chromatin (Busch a Smetana, 1970; Jordan, 1984; Goessens, 1984; Raška et al., 1990). Jádérka Sertoliho buněk různých druhů savců jeví značné morfologické mezidruhové rozdíly. Nejvíce se uvedenému schématu přibližují jádérka Sertoliho buněk člověka (Wachtler et al., 1989). V Sertoliho buňkách myši (Motta 1970; Mirre a Knibiehler, 1982), krysa (Ramos a Dym, 1979) a králíka (Couve a Esponda, 1982) se vedle jadérek běžného typu vyskytují ještě rozsáhlé masy heterochromatinu v blízkosti jadérek nebo ve vazbě na jadernou membránu. Konečně v Sertoliho buňkách beranů (Cigánková, 1983) a býků (Courot, 1970; Zibrin, 1972, 1974) byla nalezena a popsána typově zvláštní vezikulární jádérka (multivezikulární jádérka). Při studiu varletní tkáně berana a býka nás zajímalo kromě ultrastruktury jadérek Sertoliho buněk zejména chemické složení jeho jednotlivých částí. K tomuto záměru jsme využili metody stříbrící, která umožňuje sledovat lokalizaci acidických nehistonových proteinů v jádře a zejména v jádérku. Metoda s alkoholickou PTA (kyselina fosfotungstová) dovoluje demonstrovat distribuci bazických, na lyzin bohatých proteinů, resp. nukleoproteinů.

Regresivní barvení je založeno na bázi účinku chelatonového agens EDTA (kyselina etylen-diamino-tetraoctová). Jeho použití umožní snadné odstranění deoxyribonukleoproteinů a zdůraznění těch složek, které obsahují ribonukleoproteiny, resp. RNA.

MATERIÁL A METODA

Vyšetřili jsme varletní tkáň tří klinicky zdravých, pohlavně dospělých býků a tří pohlavně dospělých beranů. Po odporažení zvířete byla vyjmuta varlata a z nich odebrány malé kousky tkáně. Odebrané vzorky varletní tkáně jsme zpracovali pro elektronmikroskopické zkoumání několika způsoby.

RUTINNÍ ELEKTRONMIKROSKOPICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Fixace 2,5% glutaraldehydem, postfixace 1% OsO₄, obě fixační činidla v 0,2M kakovodlanovém nárazníku, dehydratace řadou alkoholů, zalití do pryskyřice Epon 812. Ultra-tenké řezy kontrastovány uranylacetátem a citrátem olova.

Fixace pouze 2,5% glutaraldehydem, dehydratace alkoholy, zalití do Eponu 812. Ultratenké řezy na zlatých sítkách byly kontrastovány 20 min 5% vodním roztokem uranylacetátu, mořeny v 0,2M EDTA 60 min, a dokontrastovány citrátem olova 6 min.

STŘÍBŘENÍ METODOU PRO PRŮKAZ ACIDICKÝCH ARGYROFILNÍCH PROTEINŮ (Likovský a Smetana, 1981)

Fixace 2,5% glutaraldehydem, postfixace Carnoyovou tekutinou, vlastní stříbření v 100% AgNO₃ smíchaném s 12,5% formaldehydem v poměru 1:1 při teplotě 65 °C 10 min, odvodnění řadou alkoholů a zalití do Eponu 812. Ultratenké řezy se běžně kontrastují. Nekontrastované řezy slouží jako kontrola reakce.

PRŮKAZ BAZICKÝCH, LYZINEM BOHATÝCH BÍLKOVIN METODOU S PTA (Sheridan a Barrnett, 1969)

Fixace 1,25% glutaraldehydem 120 min, odvodnění vzestupnou řadou alkoholů, aplikace 3% roztoku PTA (phosphotungstic acid) v absolutním alkoholu 16 h při pokojové teplotě, zalití do Eponu 812. Ultratenké řezy se nektrastují.

Na ultramikrotomu LKB NOVA III zhotovené ultratenké řezy byly prohlíženy elektronovým mikroskopem JEOL JEM 100 CX II při urychlovacím napětí 80 kV.

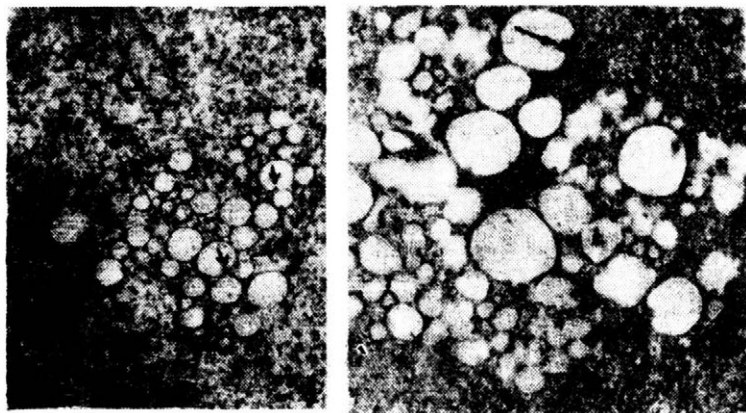
VÝSLEDKY

JÁDRO A JADÉRKO SERTOLIHO BUNĚK BÝKA

Z á k l a d n í e l e k t r o n m i k r o s k o p i c k ý o b r a z .

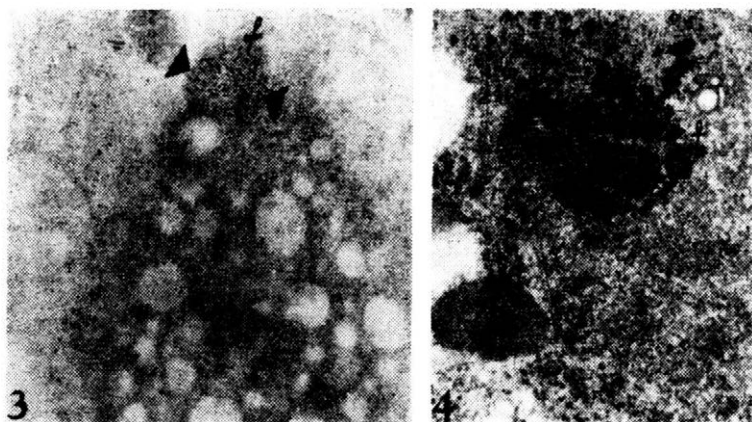
Jádra Sertoliho buněk jsou v podstatě oválná, přerušovaná na řadě míst hlubokými invaginacemi jaderné membrány. Jsou poměrně světlá s relativně rovnoměrně distribuovaným chromatinem. Nápadným útvarem uvnitř jádra jsou tzv. multivezikulární jadérka, složená z většího či menšího počtu váčků — vezikul. Počet váčků skládajících jadérko se velice liší, kvantifikace je velmi obtížná a je nutné přihlížet k rovině, ve které je řez veden. Váčky mohou na sebe těsně naléhat nebo jsou od sebe separovány. Materiál, který váčky odděluje, je dvojitý. Buď je svým charakterem, tj. elektronovou denzitou, obdobný nukleoplazmě, nebo je formován v pruhy či shluky silně elektrondenzní. Tento tmavý materiál má filamentózní složení a je pravděpodobně obdobou, popř. pozůstatkem denzní fibrilární komponenty jak ji známe u běžného typu jadérka (obr. 1-f). Vezikuly jsou opatřeny limitující membránou, na její zevní povrch často nasedají granula. Na vnitřní straně mnohých váčků jsou zachyceny sférické invaginace (obr. 1 — šipka, 2 — šipka). Vezikuly se zpravidla jeví jako elektronově prázdné útvary.

Aplikace stříbřicí metody slouží k průkazu kyselých nehistonových argyrofilních proteinů. Depozita stříbra jsme nacházeli soustředěná ve shlucích filamentózního materiálu okolo váčků nebo mezi nimi (obr. 2-f). Jelikož na kontrastovaných preparátech filamentózní složka sama o sobě má značnou denzitu, je někdy obtížné depozita stříbra přesvědčivě rozlišit. Proto jsme použili pro srovnání a osvětlení situace nektrastovaných preparátů, kde jsou jasně demonstrovány agregáty stříbra a jejich distribuce v oblastech odpovídajících nahromadění filamentózního materiálu (obr. 3-f) a na povrchu a v těsné blízkosti povrchu vezikul.



1. Sertoliho buňka býka, multivezikulární jádro; f — shluky filamentózního materiálu, šipky — invaginace vnitřního povrchu vezikul (zv. 22 000x) — Sertoli's cell of bull, multivesicular nuclear body; f — clusters of filamentous material, arrows — invagination of the inner surface of vesicles (enl. 22 000x)

2. Sertoliho buňka býka, stříbření s kontrastováním, multivezikulární jádro; f — Ag pozitivní fibrilární složka, šipka — invaginace uvnitř vezikul (zv. 40 000x) — Sertoli's cell of bull, silver-staining technique with contrasting, multivesicular nuclear body; f — Ag positive fibrillar component, arrow — intravesicular invagination (enl. 40 000x)



3. Sertoliho buňka býka, stříbření bez kontrastování; f — depozita stříbra v oblasti filamentózního materiálu jádra (zv. 44 000x) — Sertoli's cell of bull, silver-staining technique without contrasting; f — silver deposits in the region of the nuclear body filamentous material (enl. 44 000x)

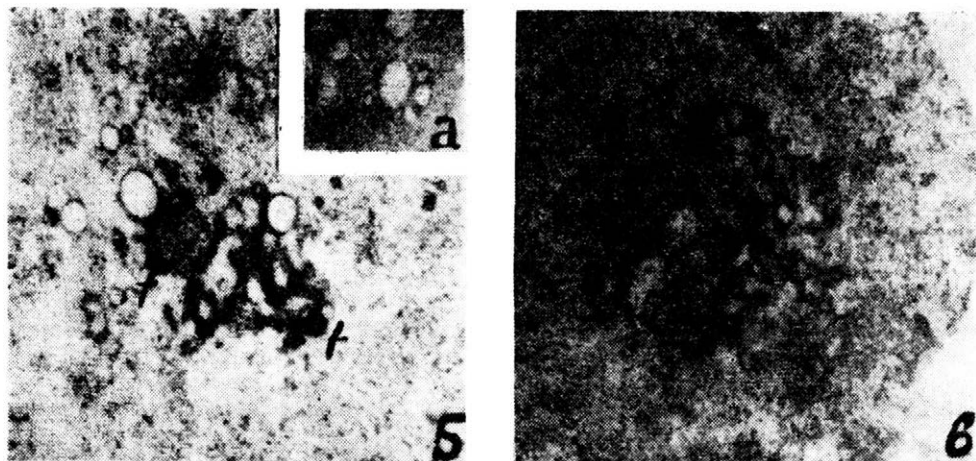
4. Sertoliho buňka berana, stříbření s kontrastováním; jádro tvořeno shluky fibrilárního materiálu s Ag pozitivní reakcí a několika vezikulami na periferii (zv. 23 000x) — Sertoli's cell of ram, silver-staining technique with contrasting; the nuclear body consists of clusters of fibrillar material with Ag positive reaction and of several vesicles on the periphery (enl. 23 000x)

Aplikace metody s alkoholickou PTA má demonstrovat výskyt bazických, lyzinem bohatých jaderných bílkovin. Nápadnou pozitivní reakci nacházíme na filamentózní složce multivezikulárních jadérek (obr. 5-f). Shluky PTA pozitivního materiálu jsou rovněž prokazatelné ve vazbě na heterochromatin (obr. 5 — šipka).

Preferenční barvení RNP. Zřetelně zbarvené jsou struktury, v nichž převažující složkou je RNA. V případě multivezikulárních jadérek vykazují pozitivitu granula nasedající na povrch váčků (obr. 7 — šipky) a filamentózní materiál, tvořící okrsky mezi váčky (obr. 7-f).

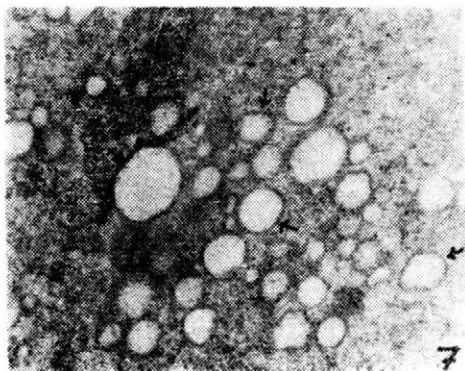
JÁDRO A JADÉRKO SERTOLIHO BUNĚK BERANA

Základní elektronmikroskopický obraz. Jaderná blána, obdobně jako v Sertoliho buňkách býků, vytváří četné hluboké invaginace. Shluky heterochromatinu jsou distribuovány rovnoměrně po celé nukleoplazmě, mnohdy se hromadí v těsné blízkosti jaderné membrány. Jadérko je vezikulárního typu, s tím rozdílem, že jsme pravidelně nacházeli převažující fibrilo-granulární složku jadérka a na její periferii několik málo vezikul. Vezikuly jsou opticky prázdné, jsou obklopeny a vzájemně propojeny pruhy filamentózního materiálu.



5. Sertoliho buňka býka, PTA; f — jadérko se silně zbarvenými pruhy filamentózního materiálu, šipka — pozitivní reakce v nukleoplazmě (zv. 22 000x), a — pozitivní materiál mezi vezikulami (zv. 16 000x) — Sertoli's cell of bull, PTA; f — nuclear body with markedly stained striae of filamentous material, arrow — positive reaction in the nucleoplasm (enl. 22 000x), a — intervesicular positive material (enl. 16 000x)

6. Sertoliho buňka berana, PTA; silná pozitivní reakce na filamentózním materiálu jadérka a v okolí vezikul (zv. 22 000x) — Sertoli's cell of ram, PTA; marked positive reaction in the filamentous material of nuclear body and around the vesicles (enl. 22 000x)



7. Sertoliho buňka býka, preferenční barvení, ribonukleoproteiny jsou lokalizovány ve filamentózní složce jadérka (f) a v zrnech na povrchu vezikul (šipky); zv. 39 000x — Sertoli's cell of bull, preferential staining, ribonucleoproteins are localized in the filamentous component of nuclear body (f) and in granules on the outer surface of vesicles (arrows); enl. 39 000x

Výsledky cytochemických reakcí jsou identické s výsledky popsanými v jadérkách Sertoliho buněk býků. Argyrofilní proteiny detekované prostřednictvím depozit stříbra, jsou soustředěny výhradně na fibrilo-granulární složce jadérka (obr. 4-f). Výrazně PTA-pozitivní byl materiál tvořící filamentózní pruhy okolo vezikul a probíhající fibrilogramulární složkou jadérka v mnoha směrech. Tyto filamentózní pruhy byly rovněž výrazně pozitivní při preferenčním barvení RNP struktur.

DISKUSE

Jadérko, resp. nukleolární aparát, Sertoliho buněk přežvýkavců je vezikulární (multivezikulární) a tímto svým uspořádáním se výrazně liší od jadérek jiných somatických buněk. Při studiu Sertoliho buněk býka a berana jsme se zaměřili vedle morfologického popisu jadérka zejména na získání informací o skladbě a rozložení jeho funkčních složek. K tomuto účelu jsme zvolili metodu sledování několika typů nukleoproteinů a jejich distribuce.

Jak bylo již v úvodu zmíněno, jadérko je místem rRNA syntézy a zdrojem ribosomů. Vystává otázka, kde syntéza rRNA a tvorba ribosomů probíhá v jadérku vezikulárního typu. Zibrin (1972) vyslovil hypotézu, že filamentózní materiál, obklopující vezikuly multivezikulárního jadérka je zřejmě identický s denzní fibrilární komponentou. Je známo, že denzní fibrilární komponenta se skládá z ribonukleoproteinových vláček o tloušťce kolem 5 nm, která obsahují nově syntetizovanou rRNA. Tato skutečnost byla v našem materiálu potvrzena preferenčním barvením RNP. Stejně se nám touto metodou výrazně značila granula na povrchu nukleolárních vezikul. Tato granula popsal Zibrin (1972, 1974), který je považuje za reprezentanty granulární komponenty. Denzní fibrilární komponenta z funkčního hlediska je místem aktivní transkripce (Wachter et al., 1989). Jako hlavní acidické nukleolární proteiny, které se stříbří, byly identifikovány proteiny C23 a B23 (Lischwe et al., 1979;

Daskal et al., 1980). Místem jejich výskytu je fibrilární komponenta jadérka. Podle Howella (1977) stříbří se acidické proteiny váží nově transkribovanou rRNA. Morfologie jadérka je závislá na buněčném typu a fyziologickém stavu buňky. Tato skutečnost je podmíněna a plně závisí na rovnováze mezi RNA syntézou, produkcí a hromaděním nukleolárních proteinů a transportem ribosomálních podjednotek ven z jadérka [Goessens et al., 1977]. Reakce se stříbrem a alkoholickou PTA dávají v našem materiálu obdobné výsledky, tj. v obou případech nacházíme pozitivní reakci na shlucích a pružích filamentózního materiálu, odpovídajících denzní fibrilární komponentě. Lyzinem bohaté bazické bílkoviny mohou být některým typem histonů, a tím složkou internukleolárního chromatinu. Tedy histonové a nehistonové proteiny existují vedle sebe a jsou navázány na fibrilární elementy jadérka [Olson et al., 1981]. Jiné vysvětlení přítomnosti PTA pozitivních proteinů může vycházet z faktu, že na lyzin bohatá histonová frakce má přímou interakci s RNA polymerázou [Spelsberg et al., 1989].

Celkem jsme pro tuto studii prohlédli více než 300 elektronogramů, ale v žádném případě jsme nenalezli v oblasti vezikulárního jadérka fibrilární centra nebo útvary, které jim morfologicky odpovídají. Nevíme, proč tomu tak je a snaha o vysvětlení by vedla jen k nepodloženým spekulacím.

Vznik a existenci vezikul v jadérku, tedy vlastně nahloučení membránových struktur, vysvětluje Zibrin (1972, 1974) zvýšenou potřebou membránového materiálu v látkové výměně mezi jadérkem a cytoplasmou.

Neobvyklý nukleolární aparát Sertoliho buněk u přežvýkavců může představovat mezičlánek mechanismu, pomocí kterého se uplatňuje na Sertoliho buňkách vliv FSH a jejich prostřednictvím pak ovlivňuje celou spermiogenezu [Zibrin, 1976; Cigánková, 1983]. Závěrem můžeme konstatovat, že multivezikulární nukleolární systémy se od normálních jadérek morfologicky liší, nicméně funkčně je lze pokládat za skutečné nukleoly, protože jejich struktury (filamentózní složka) jsou jediným místem syntézy ribosomální RNA v jádru buňky.

Literatura

- ARMSTRONG, D. T. — MOON, Y. S. — FRITZ, I. B. — DORRINGTON, J. H.: Synthesis of estradiol-17 β by Sertoli cells in culture. In: FRENCH, F. S. — HANSSON, V. — RITZEN, E. M.: Hormonal regulation of spermatogenesis. New York, Plenum Press 1975, s. 85—96.
- BERNHARD, W.: A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. ultrastruct. Res., 27, 1969, s. 250—265.
- BUSCH, H. — SMETANA, K.: The nucleolus. New York, London, Academic Press 1970.
- CIGÁNKOVÁ, V.: Prenatální a postnatální vývoj Sertoliho buněk u baranů. Veter. Med. (Praha), 28, 1983, s. 613—620.
- COUROT, M. — HOCHEREAU de REVIERS, M. T. — ORTAVANT, R.: Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D. — GOMES, W. R. — VANDEMARK, N. L.: The testis. New York, Academic Press 1970, s. 339—432.
- COUVE, E. — ESPONDA, P.: Analysis of nucleolar components by combined silver staining and serial sections procedures. Cell Biol. Int. Rep., 6, 1982, s. 659—667.
- DASKAL, Y. — SMETANA, K. — BUSCH, H.: Evidence from studies segregated nucleoli than nucleolar silver stained protein C 23 and B 23 are in fibrillar components. Exptl. Cell Res., 127, 1980, s. 285—291.

- DeJONG, F. H. — HEY, A. H. — Van Der MOLEN, H. J.: Effect of gonadotrophins on the secretion of estradiol-17 β and testosterone by the rat testis. *J. Endocrinol.*, 57, 1973, s. 277—284.
- GOESSENS, G.: Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.*, 87, 1984, s. 107—158.
- GOESSENS, G. — THIRY, M. — LEPOINT, A.: Relations between nucleoli and nucleolus organizing regions during the cell cycle. *Chromosomes today*, 9, 1987, s. 61—71.
- HADJILOV, A. A.: The nucleolus and ribosomes biogenesis. *Cell biology monographs*, 12, Wien — New York, Springer Verlag, 1985.
- HOWELL, M. W.: Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62, 1977, s. 361 to 367.
- JORDAN, E. G.: Nucleolar nomenclature. *J. Cell Sci.*, 67, 1984, s. 217—220.
- LIKOVSKY, Z. — SMETANA, K.: Further studies on the cytochemistry of the standardized silver staining of interphase nucleoli in smear preparations of Yoshida ascitic sarcoma cells in rats. *Histochemistry*, 72, 1981, s. 301—313.
- LISCHWE, M. A. — SMETANA, K. — OLSON, M. J. — BUSCH, H.: Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci.*, 25, 1979, s. 701—708.
- MIRRE, C. — KNIBIEHLER, B.: A re-evaluation of the relationship between the fibrillar centres and the nucleolus-organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse Sertoli cells. *J. Cell Sci.*, 55, 1982, s. 247—259.
- MOTA, M.: The nucleolus and heterochromatin in Sertoli nuclei. In: 7th Congr. intern. of electron microscopy. Grenoble, France, 1970, s. 239—240.
- OLSON, M. O. J. — GUETZOW, K. — BUSCH, H.: Localization of phosphoprotein C23 in nucleoli by immunological methods. *Exp. Cell Res.*, 135, 1981, s. 259—265.
- RAMOS, Jr, A. S. — DYM, M.: Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 21, 1979, s. 909—922.
- RASKA, I. — OCHS, R. L. — SALAMIN-MICHEL, L.: Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microsc. Rev.*, 3, 1990, s. 301—353.
- REDDY, K. J. — SVOBODA, D. J.: Lysosomal activity of Sertoli cells of normal and degenerating seminiferous epithelium of rat testis. An ultrastructural and biochemical study. *Amer. J. Pathol.*, 51, 1967, s. 1—17.
- SHERIDAN, W. F. — BARNETT, R. J.: Cytochemical studies on chromosome ultrastructure. *J. ultrastruct. Res.*, 27, 1969, s. 216—229.
- SPELBERG, J. C. — TANKERSLEY, S. — HNILICA, L. S.: The interaction of RNA polymerase with histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Washington)*, 62, 1969, s. 1218—1225.
- WACHTLER, F. — HARTUNG, M. — DEVICTOR, M. — WIEGANT, J. — STAHL, A. — SCHWARZACHER, H. G.: Ribosomal DNA is located and transcribed in the dense fibrillar component of human Sertoli cell nucleoli. *Exp. Cell Res.*, 184, 1989, s. 61—71.
- WEBER, J. E. — RUSSELL, L. D. — WONG, V. — PETERSON, R. M.: Three-dimensional reconstruction of a rat stage V. Sertoli cell. II. morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. *Amer. J. Anat.*, 167, 1983, s. 163—179.
- WONG, V. — RUSSELL, L. D.: Three-dimensional reconstruction of a rat stage V. Sertoli cell. I. methods, basic configuration and dimensions. *Amer. J. Anat.*, 167, 1983, s. 143—161.
- ZIBRÍN, M.: Multivesicular nuclear body with nucleolar activity in Sertoli cells of bulls. *Z. Zellforsch.*, 135, 1972, s. 155—164.
- ZIBRÍN, M.: Multivesicular nucleolar bodies with nucleolar activity in the bull Sertoli cells and their development. In: Biogenesis of cell organelles. Ed. Dvořák, M., *Acta Fac. Med. Univ. Brunensis*, 49, 1974, s. 239—245.
- ZIBRÍN, M.: Nukleolární aparát Sertoliho buniek niektorých cicavcov. *Folia Veter.*, 20, 1976, s. 69—79.

Došlo dne 15. 3. 1990

ANTALÍKOVÁ, L. — ROZINEK, J. (Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves): *Morphological and cytochemistry studies of nucleoli of Sertoli's cells in ruminants*. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992 [1]: 1—9.

Nuclei and nucleoli were examined at an ultrastructural level in the testicular tissue of bulls and rams. In the two species there occurs a morphologically interesting so called multivesicular nuclear body; the interpretation of its function is not quite clear.

The tissue was processed by a routine electron microscope technique and then a cytochemical demonstration of several types of proteins was used. Acidic argyrophilic proteins were demonstrated by a silver-staining technique, basic lysine-rich proteins by means of ethanolic PTA, and ribonucleoproteins (RNP) by the method of Bernhard's regressive preferential staining. Multivesicular nuclear bodies in bull Sertoli's cells are composed of a greater number of membrane bound vesicles with granules on the outer surface (Fig. 1). The results of cytochemistry reactions show that the granules contain acidic argyrophilic proteins (Fig. 3) and RNP (Fig. 7). The intervesicular material is an analogy of the dense fibrillar component of normal nucleoli of somatic cells. This component contains the three types of investigated proteins (Figs. 2, 3, 5, 7). In the nuclear bodies of ram Sertoli's cells the number of vesicles is much lower, the fibrillar component is prevailing, in form of clusters and striae of filamentous material around the vesicles. The cytochemistry reactions proved that this material contains acidic argyrophilic proteins (Fig. 4) and basic PTA positive (Fig. 6) proteins. The presence of acidic and basic regulatory proteins in the fibrillar component of multivesicular nuclear bodies indicates the active synthesis of RNA occurring in this material. It is therefore possible to consider this special type of nuclear bodies as a full equivalent of nucleoli of somatic cells as to the function.

bulls; rams; Sertoli's cell; nucleus; cytochemistry; nucleoproteins; fibrillar components

Adresa autorů:

RNDr. Libuše Antalíková, CSc., ing. Jiří Rozínek, CSc., Výzkumný ústav živočišné výroby, 104 00 Praha 10-Uhřetěves

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 2/92 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Zralý Z., Kummer V., Čanderle J., Raszyk J., Šišák M.:
Vliv estrogenů na fagocytární aktivitu krevních leukocytů jalovic a krav

Bomba A., Žitňan R.: Vývoj bachorovej fermentácie teliat v období
mliečnej výživy

Tančin V., Pješčak M.: Hladina inzulínu a glukózy u teliat v prvých
šiestich mesiacoch života

Hanuš O., Čenčurová V., Gabriel B., Žváčková I.: Srovnání
účinnosti konzervačního přípravku Milkofix s tradičními konzervačními
prostředky pro účely stanovení počtu somatických buněk ve vzorcích mléka
fluoro-opto-elektronickou metodou

Pástorová B., Váradý J.: Hladiny katecholaminů v krvnej plazme
oviec v estrickom období počas superovulácie

Svobodová V., Nevoľe M.: Diagnostika sarkocystózy ovci metodami
NFR a ELISA

Krokavec M., Šimo K., Martinko A., Krokavcová M.: Štú-
dium hodnôt ukazovateľov metabolického profilu vo veľkochovoch kôz v prie-
behu ročných období

Máchová M., Drobníková V., Titěra D., Vejvodská A.,
Křišťanová O., Henzl Š.: Preventivní použití tylosinu ve včelstvech
ohrožených morem plodu a jeho rezidua v medu a cukerných zásobách

EFEKTÍVNOSŤ VPLYVU MONENZÍNU (USA, ČSFR, BULHARSKO) NA FERMENTÁCIU KŔMNEJ DÁVKY V UMELOM BACHORE (RUSITEC)

D. Jalč, M. Baran, A. I. Petkov, N. C. Oblakov, E. I. Enev

JALČ, D. — BARAN, M. — PETKOV, A. I. — OBLAKOV, N. C. — ENEV, E. I. (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice; Vysoká škola zooveterinárska, Stará Zagora, Bulharsko): *Efektívnosť vplyvu monenzínu (USA, ČSFR, Bulharsko) na fermentáciu kŕmnej dávky v umelom bachore (Rusitec)*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 11—19.

Pokus bol uskutočnený v umelom bachore (Rusitec), v ktorom fermentácia kŕmnej dávky pozostávajúcej zo sena a jačmeňa (80:20 %) bola porovnávaná s fermentáciou tej istej kŕmnej dávky v prítomnosti 5 mg monenzínu získaného z USA, ČSFR a Bulharska. Všetky tri druhy monenzínu významne ovplyvnili fermentáciu kŕmnej dávky. Prejavilo sa to zníženou stráviteľnosťou sušiny zo 48 na 40 %, detergentnej vlákniny, celulózy a hemicelulózy kŕmnej dávky, zníženou produkciou metánu (—75 %) a CO₂. Významne sa znížila produkcia celkových UMK (—21 %), kyseliny octovej (—35 %), n-maslovej, n-valérovej a izovalérovej. Produkcia kyseliny propiónovej vplyvom monenzínu bola významne zvýšená (+60 percent) a v dôsledku toho pomer acetát: propionát významne znížený (—60 %). Produkcia, utilizácia a návratnosť metabolického vodíka (H₂) bola vplyvom monenzínu tiež významne znížená. Dodanie monenzínu ku kŕmnej dávke významne ovplyvnilo aj konečné produkty fermentácie. Prejavilo sa to vyššou energetickou výťažnosťou UMK, nižšou produkciou ATP, fermentovaných hexóz, organickej hmoty fermentovanej a nižším využitím glukózy. Vplyvom monenzínu z USA, ČSFR a Bulharska sa zvýšila účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty Y_{ATP} z 6,20 (kontrola) na 9,55, 9,75 a 8,29.

Rusitec; monenzín; UMK; metán; konečné produkty fermentácie; účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty

Pre dosiahnutie lepšej efektívnosti výkrmu prežúvavcov sa v poslednom desaťročí používajú vo svete rôzne mikrobiálne, chemické a enzymatické preparáty. V najväčšej miere sa z nich používa monenzín — biologicky aktívna látka produkovaná plesňou *Streptomyces cinnamonensis*. Výhodou monenzínu je, že zvyšuje využiteľnosť krmiva u prežúvavcov (Thomney a i., 1981; Goodrich a i., 1984). Jeho vplyvom dochádza k zvýšenej produkcii kyseliny propiónovej, zníženej produkcii kyseliny octovej a n-maslovej a k inhibícii metanogenézy v bachore prežúvavcov (Jouany a Senaud, 1978; Chalupa a i., 1980).

Vplyv monenzínu na bachorovú fermentáciu bol sledovaný *in vivo* (Richardson a i., 1976; Thornton a Owens, 1981), *in vitro* (Van Nevel a Demeyer, 1977) a tiež v umelom bachore — Rusitec (Wallace a i., 1980, 1981; Stanier a Davis, 1981). Keďže používanie monenzínu vo svete je značne rozšírené, avšak jeho vplyv na bachorovú fermentáciu prežuvavcov nie je rovnako účinný, cieľom tejto práce bolo porovnať účinnosť monenzínu z ČSFR (Spofa), USA (Eli Lilly, Indianapolis) a Bulharska (Pharmachim) a sledovať jeho vplyv na základné a konečné produkty fermentácie kŕmnej dávky v umelom bachore (Rusitec).

MATERIÁL A METÓDY

Fermentácia kŕmnej dávky prebiehala v štyroch fermentačných nádobách (V₁, V₂, V₃ a V₄) umelého bachora ako ho popisuje Czerkawski a Breckenridge (1977). Ako inokulum sme použili bachorový obsah troch dospelých baranov kŕmených dobrým lúčnym *ad libitum*. Zvieratá mali dobrý prístup k vode a minerálnemu lízu pre ovce. Tekutý bachorový obsah bol odobratý cez bachorovú fistulu vývevou a tuhý bachorový obsah kliešťami. 80 g tuhého bachorového obsahu bolo navážené do nylonových vrecúšok o veľkosti ok 200 μ m a dané do každej fermentačnej nádoby, ktoré boli naplnené zmesou bachorovej tekutiny a McDougallovo pufru (umelých slín) v pomere 1:1. Objem fermentačných nádob bol 850 ml a prietok umelých slín (McDougall, 1948) 750–850 ml/deň. V denných intervaloch zahrňujúc 1. deň experimentu, všetky nádoby boli tiež doplnené kŕmnou dávkou pozostávajúcou zo sena (11,84 DM) a jačmeňa (2,86 g DM). Krmivo bolo uzavreté v nylonových vrecúškach a každé vrecúško zotrvalo vo fermentačnej nádobe dva dni. Monenzín sme rozpustili v 96% metanole a počnúc od 2. dňa experimentu sme denne dodali do V₁ 1 ml 96% metanolu, do V₂, V₃ a V₄ 5 mg monenzínu z USA (V₁), ČSFR (V₂) a Bulharska (V₃), rozpusteného v 1 ml 96% metanolu. Do 1 l McDougallovo pufru, infundovaného cez peristaltickú pumpu do Rusitecu, sme denne dodali 255 mg močoviny, čím sme dosiahli, že kŕmna dávka obsahovala 13 % hrubého proteínu (CP).

Experiment trval 12 dní. Počas prvých 6 dní (steady state perióda) sa stabilizovali podmienky fermentácie. Na 7.–12. deň sa odoberali vzorky effluentu, plynu a zbytkového (nestráveného) krmiva na analýzy ako to uvádza Czerkawski a Breckenridge (1977). Nestrávené zbytky krmiva po premytí s McDougallovým pufrom boli sušené do konštantnej hmotnosti pri teplote 105 °C k stanoveniu stráviteľnosti sušiny (DM) a detergentnej vlákniny (Goering a Van Soest, 1970). Mikrobiálna sušina effluentu (PDM) bola získaná dvojnásobným centrifugovaním effluentu pri 20 000 g po dobu 30 minút, dvojnásobnom premytí vodou a vysušením zbytku do konštantnej hmotnosti pri teplote 105 °C. V nestrávených zbytkoch krmiva sme stanovili kyselinu diaminopimelovú (DAPA) za účelom stanovenia mikrobiálnej biomasy zbytkového krmiva (Czerkawski, 1974; Wallace a i., 1981). Koncentrácia unikavých mastných kyselín (UMK) v effluente bola stanovená metódou plynovej chromatografie (Cottyn a Boucque, 1968) za použitia kyseliny krotónovej ako interného štandardu na plynovom chromatografe Perkin Elmer 8500. Objem produkovaných plynov bol meraný prietokovým plynomerom a plyny (metán a CO₂) boli analyzované plynovou chromatografiou (Czerkawski a Clapperton, 1968) na plynovom chromatografe Chrom 4. Konečné produkty fermentácie boli vypočítané na základe stoichiometrie bachorovej fermentácie ako to uvádza Czerkawski (1986).

VÝSLEDKY

Fermentácia kŕmnej dávky počas celej doby experimentu prebiehala pri pH 6,82–6,96 fermentačného média. Všetky tri druhy monenzínu významne ovplyvnili základné parametre fermentácie kŕmnej dávky v umelom bachore. Prejavilo sa to významne nižšou stráviteľnosťou sušiny (DM), neutrálnej detergentnej vlákniny (NDF), kyslej detergentnej vlákniny (ADF), celulózy (C) a hemicelulózy (HC) kŕmnej dávky, ako aj významne nižšou celkovou produkciou plynov, metánu a CO₂ (tab. I).

I. Vplyv monenzínu na stráviteľnosť sušiny a vláknniny kŕmnej dávky a produkciu plynov — The effects of monensin on the digestibility of feed ration dry matter and fibre and on gas production

Monenzín (mg . deň ⁻¹) ¹	0	5 USA	5 ČSFR	5 Bulharsko ¹⁰
Stráviteľnosť DM diéty ² (%)	48,18 ± 1,11	40,70 ± 0,40 ***	40,92 ± 0,62 ***	40,81 ± 0,85 ***
Stráviteľnosť NDF ³ (%)	44,02 ± 1,10	30,58 ± 0,93 ***	32,67 ± 0,69 ***	31,48 ± 0,99 ***
Stráviteľnosť ADF ⁴ (%)	39,31 ± 1,30	22,62 ± 0,52 ***	23,27 ± 0,80 ***	22,46 ± 0,50 ***
Stráviteľnosť celulózy ⁵ (%)	41,91 ± 1,24	27,48 ± 0,49 ***	28,99 ± 0,89 ***	27,88 ± 0,46 ***
Stráviteľnosť hemicelulózy ⁶ (%)	58,83 ± 0,92	47,83 ± 0,35 ***	49,94 ± 0,52 ***	48,65 ± 0,73 ***
Celková produkcia plynov (ml . deň ⁻¹) ⁷	2 376,66 ± 87,49	1 898,33 ± 84,49 **	1 818,33 ± 93,27 ***	1 979,16 ± 85,34 **
Produkcia CH ₄ (mmol . deň ⁻¹) ⁸	12,67 ± 0,99	1,50 ± 0,68 ***	4,01 ± 0,77 ***	3,74 ± 0,93 ***
Produkcia CO ₂ (mmol . deň ⁻¹) ⁹	22,10 ± 2,17	13,51 ± 0,82 **	13,29 ± 1,08 **	10,92 ± 1,40 ***

¹monensin (mg per day), ²diet DM digestibility, ³NDF digestibility, ⁴ADF digestibility, ⁵cellulose digestibility, ⁶hemicellulose digestibility, ⁷total gas production (ml per day), ⁸CH₄ production (mmol per day), ⁹CO₂ production (mmol per day), ¹⁰Bulgaria

Vysvětlivky pro tab. I—IV — Explanatory notes to Tabs. I—IV:

± štandardná stredná chyba (SEM); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ — ± standard error mean (SEM); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Monenzín ovplyvnil aj produkciu celkových i jednotlivých UMK (tab. II). Svedčí o tom významné zníženie produkcie celkových UMK, kyseliny octovej, n-maslovej, n-valérovej a izovalérovej, ako aj pomeru acetát : propionát. Produkcia kyseliny propiónovej bola vplyvom monenzínu významne zvýšená.

Okrem spomenutých základných parametrov fermentácie všetky tri druhy monenzínu ovplyvnili aj konečné produkty fermentácie kŕmnej dávky, ktoré sme stanovili kalkuláciou zo známych stoichiometrických vzťahov v bachore.

V tab. III uvádzame hodnoty týchto ukazovateľov konečných produktov fermentácie: energetická výťažnosť UMK (E), využitie glukózy, produkcia adenosintrifosfátu (ATP), fermentované hexózy a fermentovaná organická hmota. Hoci monenzín významne zvýšil energetickú výťažnosť UMK, ostatné spomínané ukazovatele konečných produktov fermentácie boli významne znížené.

II. Vplyv monenzínu na produkciu celkových i jednotlivých UMK — The effects of monensin on the production of total and individual VFA

Monenzín (mg . deň ⁻¹) ¹	0	5 USA	5 ČSFR	5 Bulharsko ¹¹
Produkcia effluentu (ml . deň ⁻¹) ²	910,83 ± 6,51	925,00 ± 8,92	765,50 ± 8,65	845,00 ± 8,71
NH ₃ -N (mmol . deň ⁻¹) ³	5,75 ± 0,63	5,61 ± 0,72	6,19 ± 0,61	5,46 ± 0,70
Produkcia celkových UMK (mmol . deň ⁻¹) ⁴	45,07 ± 1,71	33,89 ± 1,27	35,68 ± 0,73	37,19 ± 0,91
Produkcia kyseliny octovej (mmol . deň ⁻¹) ⁵	29,92 ± 1,20	18,00 ± 0,54	19,79 ± 0,54	20,33 ± 0,51
Produkcia kyseliny propiónovej (mmol . deň ⁻¹) ⁶	8,63 ± 0,47	13,40 ± 0,64	13,55 ± 0,53	14,63 ± 0,95
Produkcia kyseliny n-maslovej (mmol . deň ⁻¹) ⁷	3,41 ± 0,27	1,27 ± 0,05	1,30 ± 0,05	1,18 ± 0,17
Produkcia kyseliny n-valérovej (mmol . deň ⁻¹) ⁸	1,13 ± 0,05	1,00 ± 0,14	0,86 ± 0,09	0,81 ± 0,18
Produkcia kyseliny izovalérovej (mmol . deň ⁻¹) ⁹	1,59 ± 0,14	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Pomer acetát : pro- pionát ¹⁰	3,48 ± 0,29	1,34 ± 0,07	1,45 ± 0,08	1,39 ± 0,08

¹monensin (mg per day), ²effluent production (ml per day), ³NH₃-N (mmol per day),
⁴total VFA production (mmol per day), ⁵acetic acid production (mmol per day), ⁶pro-
pionic acid production (mmol per day), ⁷n-butyric acid production (mmol per day),
⁸n-valeric acid production (mmol per day), ⁹isovaleric acid production (mmol per day),
¹⁰acetate : propionate ratio, ¹¹Bulgaria

Na základe výsledkov stanovenia mikrobiálnej sušiny (PDM) effluentu a DAPA v zbytkovom krmive sme stanovili celkovú produkciu mikrobiálnej sušiny vytvorenej počas fermentácie v Rusitecu. V tab. III sme ju vyjadřili v g . kg⁻¹ strávenej DM křmnej dávky podobne ako produkciu ATP v mol . kg⁻¹ strávenej DM. Pomocou týchto ukazovateľov sme vypočítali účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty — Y_{ATP}. Ako je vidieť z výsledkov v tab. III, najvyššia Y_{ATP} bola zistená pri použití monenzínu z ČSFR a USA.

III. Vplyv monenzínu na konečné produkty fermentácie a na účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty — The effects of monensin on the end products of fermentation and on the efficiency of microbial matter synthesis

Monenzín (mg . deň ⁻¹) ¹	0	5 USA	5 ČSFR	5 Bulharsko ⁸
E (%)	73,51 ± 0,27	81,91 ± 0,29 ***	81,11 ± 0,27 ***	81,61 ± 0,66 ***
Využitie glukózy (mmol . deň ⁻¹) ²	23,83 ± 0,94	17,98 ± 0,69 ***	18,81 ± 0,36 ***	17,18 ± 1,35 **
Produkcia ATP (mmol . deň ⁻¹) ³	108,66 ± 4,72	83,29 ± 3,01 ***	89,34 ± 2,11 **	79,14 ± 8,48 **
Mikrobiálna sušina (g . kg ⁻¹) strávenej DM ⁴	94,44 ± 3,12	132,35 ± 4,56 ***	144,42 ± 4,12 ***	128,83 ± 3,81 ***
ATP (mol . kg ⁻¹) strávenej DM ⁵	15,34 ± 0,61	13,91 ± 0,65 **	14,85 ± 0,72 *	15,52 ± 0,78
Y _{ATP} (g . mol ⁻¹)	6,20 ± 0,28	9,55 ± 0,33 ***	9,75 ± 0,24 ***	8,29 ± 1,28 **
Fermentované hexózy (mmol . deň ⁻¹) ⁶	22,69 ± 0,89	16,98 ± 0,63 ***	17,94 ± 0,36 ***	16,34 ± 1,36 **
OMF (g . deň ⁻¹) ⁷	3,86 ± 0,15	2,91 ± 0,11 ***	3,04 ± 0,05 ***	3,16 ± 0,08 **

¹monensin (mg per day), ²glucose utilization (mmol per day), ³ATP production (mmol per day), ⁴microbial dry matter (g per kg) of digested DM, ⁵ATP (mol per kg) of digested DM, ⁶fermented hexoses (mmol per day), ⁷OMF (g per day), ⁸Bulgaria

Všetky tri druhy monenzínu mali značný vplyv na bilanciú metabolického vodíka (H₂) — tab. IV. Jeho vplyvom sa významne znížila produkcia, utilizácia i návratnosť metabolického H₂. Metabolický H₂ bol najviac využitý na produkciu UMK, menej na produkciu metánu a mikrobiálnej hmoty.

DISKUSIA

Hlavný účinok monenzínu počas 12dňového experimentu na fermentáciu v Rusitecu sa prejavil vo forme jeho vplyvu na stráviteľnosť sušiny a vláknniny krmnej dávky (tab. I). Všetky tri druhy monenzínu (5 mg . deň⁻¹) znížili stráviteľnosť DM o 15 %, celulózy o 33 %, hemicelulózy o 14 %, ADF o 42 % a NDF o 28 %. V experimente s prídavkom 33 mg monenzínu sa znížila stráviteľnosť krmnej dávky pozostávajúcej zo sena a jačmeňa (50 : 50 %) o 16 % (Wallace a i., 1980). Stráviteľnosť sušiny a vláknniny krmnej dávky bola tiež znížená vplyvom 2, 10 a 50 mg monenzínu (Wallace a i., 1981).

IV. Vplyv monenzínu na produkciu, utilizáciu a návratnosť metabolického vodíka —
The effects of monensin on the production, utilization and recovery of metabolic hydrogen

Monenzín (mg . deň ⁻¹) ¹	0	5 USA	5 ČSFR	5 Bulharsko ⁸
Produkcia vodíka (mmol . deň ⁻¹) ²	85,55 ± 3,34	57,53 ± 2,08 ***	60,82 ± 1,25 ***	62,50 ± 2,63 ***
Utilizácia vodíka na produkciu UMK (mmol . deň ⁻¹) ³	28,67 ± 1,33	33,37 ± 1,61 *	32,92 ± 0,52 **	34,91 ± 1,26 **
Utilizácia vodíka na produkciu metánu (mmol . deň ⁻¹) ⁴	50,69 ± 3,98	6,03 ± 1,23 ***	16,05 ± 3,09 ***	14,97 ± 1,66 ***
Utilizácia vodíka na produkciu mikrobiálnej biomasy (mmol . deň ⁻¹) ⁵	5,41 ± 0,12	6,41 ± 0,13 ***	7,04 ± 0,12 ***	6,26 ± 0,11 **
Utilizácia vodíka celková (mmol . deň ⁻¹) ⁶	84,77 ± 3,22	45,81 ± 2,12 ***	56,01 ± 1,86 ***	56,14 ± 2,02 ***
Návratnosť vodíka (%) ⁷	99,08	79,62	92,09	89,82

¹monensin (mg per day), ²hydrogen production (mmol per day), ³utilization of hydrogen for VFA production (mmol per day), ⁴utilization of hydrogen for methane production (mmol per day), ⁵utilization of hydrogen for microbial biomass production (mmol per day), ⁶total hydrogen utilization (mmol per day), ⁷hydrogen recovery, ⁸Bulgaria

V kŕmnych pokusoch na zvieratách monenzín zvyšoval (Joyner a i., 1979), resp. neovplyvňoval (Utley a i., 1977) stráviteľnosť kŕmnej dávky. Vysvetlenie tohto diferencovaného účinku monenzínu na stráviteľnosť krmiva je, že v umelom bachore je rozsah riedenia a doba fermentácie konštantná (v tomto experimente to bolo 0,034 a 48 h), zatiaľ čo monenzín v podmienkach *in vivo* predlžuje retenčný čas krmiva v bachore (Allen a Harrison, 1979). Ďalšie výsledky ukázali, že všetky tri druhy monenzínu významne redukovali produkciu celkových UMK (o 8 až 12 mmol . deň⁻¹), kyseliny octovej (o 9—11 mmol . deň⁻¹), n-maslovej (o 2,1—2,2 mmol . deň⁻¹), n-valérovej a izovalérovej a zvýšili produkciu kyseliny propiónovej (o 4,8—6,0 mmol . deň⁻¹) — tab. II. Zmeny v proporcií jednotlivých UMK sa prejavili aj v pomere acetát : propionát, ktorý bol významne znížený (—60 %). Tento profil aktivity monenzínu je po-

rovnateľný k iným experimentom *in vitro* (Van Nevel a Demeyer, 1977; Wallace a i., 1981; Stanier a Davis, 1981). V tomto experimente bola vplyvom monenzínu znížená aj celková produkcia plynov, produkcia metánu a CO_2 (tab. I). Produkcia metánu resp. CO_2 bola znížená z 12,67 na 1,50–4,01 mmol.deň⁻¹, resp. z 22,10 na 10,52–12,67 mmol.deň⁻¹. Podobné výsledky dosiahli v pokusoch s monenzínom na Rusitecu aj Wallace a i. (1980, 1981) a Stanier a Davis (1981).

Zo známych stoichiometrických vzťahov v bachore je možné kalkuláciou stanoviť konečné produkty fermentácie (Czerkawski, 1986) a energetickú výťažnosť UMK (Orskov a i., 1968). Vplyvom monenzínu sa významne zvýšila energetická výťažnosť UMK, avšak utilizácia glukózy, množstvo fermentovaných hexóz a fermentovanej organickej hmoty sa významne znížili. Je to odrazom vplyvu monenzínu hlavne na produkciu kyseliny octovej, propiónovej, n-maslovej a n-valérovej.

Významným zdrojom energie v mikrobiálnom metabolizme je ATP. Vplyvom monenzínu v tomto experimente, hlavne v dôsledku zníženej tvorby metánu, poklesla produkcia ATP (tab. III). Monenzín z USA, ČSFR a BLR pozitívne ovplyvnil (zvýšil) syntézu mikrobiálnej hmoty (v g) vytvorenej na mol ATP. Na základe výsledkov uvedených v tab. III však usudzujeme, že najvýraznejší vplyv na účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty (Y_{ATP}) vykazoval monenzín z ČSFR a USA. Naše výsledky sú v zhode so stanovením Y_{ATP} , ktoré sa zvyšovalo pri dodaní 2, 10 a 50 mg.deň⁻¹ (Wallace a i., 1981) resp. 33 mg monenzínu na deň (Wallace a i., 1980), avšak v kontraste s údajmi Van Nevel a Demeyer (1979), Stanier a Davis (1981). Hoci príčiny týchto diferencií nie sú známe, je možné, že použitie rozdielnych metód použitých k stanoveniu mikrobiálnej sušiny effluentu a zbytkového krmiva sú toho príčinou. My sme stanovili množstvo DAPA baktérií spojených s nestrávenými časticami krmiva, ako aj množstvo mikrobiálnej sušiny effluentu (PDM) čo reprezentuje väčšinu produkovanej mikrobiálnej biomasy (Czerkawski a Breckenridge, 1977, 1979a, b).

Kalkuláciu návratnosti metabolického H_2 sme uskutočnili podľa stoichiometrie, ktorú popísali Marty a Demeyer (1973) a Demeyer a Van Nevel (1975). Ako vyplýva z tab. IV vplyvom monenzínu sa významne znížila produkcia, utilizácia i návratnosť metabolického H_2 a jeho distribúcia do UMK a mikrobiálnej biomasy sa zvyšovala a do metánu znižovala. Podobné výsledky dosiahol v pokuse s monenzínom v umelom bachore aj Stanier a Davis (1981).

Záverom je možné konštatovanie, že všetky tri druhy monenzínu mali veľmi podobný vplyv na základné a konečné produkty fermentácie kŕmnej dávky v Rusitecu a významne ovplyvnili bachorovú fermentáciu. Rozdielny vplyv však vykazovali na účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty (Y_{ATP}), ktorá sa prejavila vyššími hodnotami pri použití monenzínu z ČSFR a USA.

Literatúra

- ALLEN, J. D. — HARRISON, D. G.: The effect of the dietary addition of monensin upon digestion in the stomachs of sheep. Proc. Nutr. Soc., 1979. 32 A.
COTTYN, B. G. — BOUCQUE, C. V.: Rapid method for the gas chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. J. agric. fd Chem., 16, 1968. s. 105–107.

- CZERKAWSKI, J. W. — CLAPPERTON, J. L.: Analysis of gas produced metabolism of microorganisms. *Lab. Pract.*, 17, 1968, s. 994—996.
- CZERKAWSKI, J. W.: Methods for determining 2—6 diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J. Sci. fd Agric.*, 25, 1974, s. 45—55.
- CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Design and development of a longterm human Simulation Technique [Rusitec]. *Brit. J. Nutr.*, 38, 1977, s. 371—384.
- CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Experiments with the longterm Rumen Simulation Technique [Rusitec]: response to supplementation of basal rations. *Brit. J. Nutr.*, 42, 1979a, s. 217—228.
- CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Experiments with the longterm Rumen Simulation Technique [Rusitec]: use of soluble food and an inert solid matrix. *Brit. J. Nutr.*, 42, 1979b, s. 229—245.
- CZERKAWSKI, J. W.: An introduction to rumen studies. Oxford — New York — Toronto — Sydney — Frankfurt. Pergamon Press 1986.
- DEMEYER, D. I. — VAN NEVEL, C. J.: Methanogenesis an integrated part carbohydrate fermentation and its control. In: McDONALD, I. W. — WARNER, A. C. (eds): Digestion and metabolism in ruminant. The University of New England. Publishing Unit, Armidale, Australia, 1975, s. 366—382.
- GOERING, H. K. — VAN SOEST, P. J.: Forage fiber analyses. U. S. D. A., Agriculture Handbook No. 379, 1970, s. 1—20.
- GODDRICH, R. D. — GARRETT, J. E. — GAST, D. R. — KIRICK, M. A. — LARSON, D. A. — MEISKE, J. C.: Influence of monensin on the performance of cattle. *J. anim. Sci.*, 58, 1984, s. 1484—1498.
- CHALUPA, W. — CORBETT, W. — BRETHOURE, J. R.: Effects of monensin and amicaloral on rumen fermentation. *J. anim. Sci.*, 51, 1980, s. 170—179.
- JOYNER, A. E. Jr. — BROWN, L. J. — FOGG, T. J. — ROSSI, R. T.: Effect of monensin on growth, feed efficiency and energy metabolism of lambs. *J. anim. Sci.*, 48, 1979, s. 1065—1069.
- JOUANY, J. P. — SENAUD, J.: Utilisation du monensin dans la ration des ruminants. *Ann. Zootechn.*, 27, 1978, s. 61—74.
- MARTY, R. J. — DEMEYER, D. I.: The effects of inhibitors of methane production on fermentation pattern and stoichiometry in vitro using rumen contents from given molasses. *Brit. J. Nutr.*, 30, 1973, s. 369—376.
- Mc DOUGALL, E. I.: Studies on rumen saliva. 1. The composition and output of sheeps saliva. *Biochem. J.*, 43, 1948, s. 99—109.
- ORSKOV, E. R. — FLATT, W. P. — MOE, P. W.: Fermentation balance approach to estimated extent of fermentation and efficiency of VFA fermentations in ruminants. *J. Dairy Sci.*, 51, 1968, s. 1429—1435.
- RICHARDSON, L. F. — RAUN, A. P. — POTTER, E. L. — COOLEY, C. O. — RATHERMA-CHER, R. P.: Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. anim. Sci.*, 43, 1976, s. 657—664.
- STANIER, G. — DAVIS, A.: Effect of the antibiotic monensin and an inhibitor methanogenesis on in vitro continuous rumen fermentation. *Brit. J. Nutr.*, 45, 1981, s. 567 to 578.
- THONNEY, M. L. — HEIDE, E. K. — DUHAIME, D. J. — HAND, R. J. — PEROSIO, D. J.: Growth, feed efficiency and metabolite concentrations of cattle fed high forage diets with lasalocid or monensin supplement. *J. anim. Sci.*, 52, 1981, s. 427—433.
- THORNTON, J. H. — OWENS, F. N.: Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. *J. anim. Sci.*, 52, 1981, s. 628—634.
- UTLEY, P. R. — NEWTON, G. L. — WILSON, D. M. — Mc CORMICK, W. C.: Dry and propionic acid treated-high moisture corn fed with and without monensin to feedlot heifers. *J. anim. Sci.*, 45, 1977, s. 154—159.
- VAN NEVEL, C. J. — DEMEYER, D. I.: Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 1977, s. 251—257.
- VAN NEVEL, C. J. — DEMEYER, D. I.: Effect of monensin on some rumen fermentation parameters. *Ann. Rech. Veter.*, 10, 1979, s. 338—340.
- WALLACE, R. J. — CHENG, K. J. — CZERKAWSKI, J. W.: Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1980, s. 672 to 674.
- WALLACE, R. J. — CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Effect of monensin on fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique [Rusitec]. *Brit. J. Nutr.*, 46, 1981, s. 131—147.

JALČ, D. — BARAN, M. — PETKOV, A. J. — OBLAKOV, N. C. — ENEV, E. I. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice; University of Zooveterinary Medicine, Stará Zagora, Bulgaria): *The effects of monensin (USA, CSFR, Bulgaria) on the fermentation of feed rations in a artificial rumen (Rusitec)*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 11—19.

An experiment was made with the Rumen Simulation Technique (Rusitec) in which the fermentation of a mixed ration of hay (12.8 g/d) and bruised barley (3.2 g/d) was compared with the fermentation of the same diet in the presence of 5 mg monensin/d from the USA, CSFR and Bulgaria. The fermentation of the mixed ration was significantly affected by all three kinds of monensin. The digestibility of dry matter (DM) in the rations declined in the presence of monensin from 48 % to 40 % (tab. I). The digestibility of detergent fibre, cellulose and hemicellulose also declined in the presence of monensin (tab. I). The production of methane decreased (—70 %) and CO₂ production dropped too, but this decrease could be accounted for by the changes in the production of volatile fatty acids and redistribution of metabolic hydrogen (tab. I). Monensin decreased the production of total volatile fatty acids (—21 %), the production of acetic (—35 %), n-butyric, n-valeric and isovaleric acids (tab. II) and increased the production of propionic acid (+60 %). The production, utilization and recovery of metabolic hydrogen were significantly increased in the presence of all three kinds of monensin (tab. IV). The end products of fermentation were affected by an addition of monensin to the mixed ration. All three kinds of monensin increased energetic efficiency of volatile fatty acids, decreased adenosinetriphosphate (ATP) production, the amounts of fermented hexose, organic matter fermented and utilization of glucose (tab. III). The efficiency of microbial matter synthesis (Y_{ATP}) by the effect of monensin from the USA, CSFR and Bulgaria increased from 6.20 to 9.55; 9.79 and 8.29, respectively (tab. III). It follows from this result that monensin from the CSFR and USA had the greatest effect on the synthetic processes of microbial ecosystem. Also, monensin caused a considerable shift in the microbial ecosystem in Rusitec, which was reflected by increased propionate production, reduced methane production and increased efficiency of microbial matter synthesis at fermentation of the mixed ration.

Rusitec; monensin; VFA; methane; end products of fermentation; efficiency of microbial matter synthesis

Adresy autorov:

MVDr. Dušan Jalč, CSc., MVDr. Miroslav Baran, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, ul. Dukelských hrdinov 1/B, 040 01 Košice
Prof. Avran Iliev Petkov, DrSc., doc. Enčo Ivanov Enev, CSc., dr. Nikolaj Cvetkov Oblakov, Vysoká škola zooveterinárska, katedra fyziológie hospodárskych zvierat, 6000 Stara Zagora, Bulharsko

Upozornění pro přispěvatele a čtenáře časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Pro lepší zpřístupnění výsledků československého výzkumu zahraničním odběratelům rozhodla redakční rada časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňovat rozšířené, podrobně zpracované (s odkazy na tabulky a obrázky) souhrny v angličtině. Od ročníku 1992 jsou tyto souhrny podmínkou pro přijetí příspěvků do tisku.

Proto žádáme autory našeho časopisu, aby příspěvky zasílané do redakce vybavili kratším souhrnem, který bude publikován v češtině či slovenštině, a dále delším souhrnem (v rozsahu do dvou rukopisných stran), který bude přeložen do angličtiny.

Doufáme, že se toto opatření setká s příznivým ohlasem jak u autorů, tak i u čtenářů našeho časopisu.

Redakce časopisu

TESTOVÁNÍ NOVÉHO KONZERVAČNÍHO PŘÍPRAVKU VZORKŮ MLÉKA MILKOFIX PRO ÚČELY INFRAČERVENÉ ANALÝZY ZÁKLADNÍHO SLOŽENÍ MLÉKA. I. OVĚŘENÍ BAKTERIOSTATICKÝCH A BAKTERICIDNÍCH VLASTNOSTÍ A INTERFERENCEVNÍHO VLIVU

O. Hanuš, P. Benda, V. Genčurová

HANUŠ, O. — BENDA, P. — GENČUROVÁ, V. (Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín): *Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. Ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferencevního vlivu*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 [1]: 21–31.

Hygienické, ekologické a zdravotní problémy s konzervací vzorků pro analýzu základních složek mléka vedou ke stále snaze nalézt méně závadný chemický konzervační prostředek, který udrží po potřebnou dobu originální složení vzorku a neovlivní analýzy. Tržický [1990] navrhl konzervační prostředek Milkofix (M) na bázi sloučeniny stříbra. Autor uvádí minimální rizikovitost přípravku v porovnání k tradičním konzervovadlům. Konzervační účinnost Milkofixu byla srovnána s jinými konzervovadly: $K_2Cr_2O_7$ (C), NaN_3 (A) a bronopol (B). Byly použity následující koncentrace: A — 0,0085 g NaN_3 a 0,0630 g NaCl, B — 0,0050 g bronopolu a 0,0500 g NaCl, C — 0,0330 g $K_2Cr_2O_7$ a 0,0670 g KCl v tabletě, M — 0,1250 g směsi, vše na 25 ml mléka. Zjištěná antibakteriální účinnost M se projevila pomalejším poklesem aktuální kyselosti, resp. vzrůstem titrační kyselosti ve vzorcích s M oproti nekonzervovaným (N). Ze startovací hodnoty pH 6,3 klesla hodnota varianty N po dvou dnech na 3,8, varianty M po devíti dnech na 4,9 a varianty A po dvanácti dnech na 5,7. Pro SH vzrostla hodnota v stejném čase z 6,5 [2,5 mmol.l⁻¹] na 28,6 u N, 22,3 u M a 9,4 u A. Při uložení vzorků mléka při teplotě 4 °C je tendence podobná, ovšem rozdíly mezi způsoby konzervace jsou oproti uložení při teplotě 20 °C poněkud zastřené. Normovaná hodnota SH 9,0 [2,5 mmol.l⁻¹] pro měření na infraanalýzátoru byla překročena u vzorků N po 24 h, u M po 4 dnech a u A po 12 dnech při teplotě 20 °C. Rovněž při sledování růstu mikroorganismů (CPM) byl tento pomalejší u M než u N, ale rychlejší než u vzorků varianty C. Generační doba CPM u N činila 1,6 h, u M 2,4 h a u C 7, 9 h. Délka lag fáze těchto smíšených kultur činila u M 24 h, u C 60 h a chyběla u varianty N. Prokázané antibakteriální účinky Milkofixu byly slabší než u A, bronopolu a C, což se projevilo i v hodnotách minimálních inhibičních koncentrací vůči *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (IN test). Nejvyšší interferencevní vliv konzervovadel na infračervenou analýzu [Milko-Scan 133 B] byl zaznamenán u Milkofixu pro laktózu v hodnotě 0,140 %. Tuto hodnotu je ještě možné kompenzovat kalibrační přístroje. Na základě dosažených výsledků lze připustit při konzervaci vzorků mléka Milkofixem jejich měření maximálně do 4 dnů po odběru v uložení při teplotě 20 °C a do 9 dnů při teplotě 4 °C.

vzorky mléka; infračervená analýza; Milkofix; bronopol; azid sodný; dvojchroman draselný; aktuální kyselost

Při transportu vzorků mléka k analýze je často obtížné zajistit adekvátní chlazenou konzervaci. Proto je zpravidla nutné používat chemická kon-

zervační činidla. Tím vzniká ekologický problém odpadního mléka a často riziko pro pracovníky při dlouhodobé expozici účinků konzervačního činidla. Jsou popsána rizika při použití různých konzervačních prostředků a jejich konzervační účinnost (Weaver aj., 1977; Kroger, 1985; PSL Microtabs, 1987). Kroger (1985) dále podrobně specifikoval všeobecné požadavky na případné konzervační prostředky.

V současné době jsou v různých zemích používány různé konzervační prostředky. Skandinávské země a Velká Británie používají Bronopol, ve Spolkové republice Německo je to azid sodný, místy, podobně jako u nás, přetrvává použití dříve nejrozšířenějšího dvojchromanu draselného. Ten vykazuje zřejmě zatím nejlepší konzervační účinky, v posledním desetiletí je označován velmi často minimálně jako problematický (karcinogen, alergen). Jeho použití je spojeno s hygienickým problémem likvidace odpadního mléka, kdy je nutné urychlit redukci šestimocného toxického chromu na biologicky neškodný trojmocný (Weaver, 1977). Posouzením různých konzervačních prostředků z různých hledisek se v posledním období dále zabývali Renner a Ömeroglu (1971), Buchberger aj., (1971, 1975), Kvapilík a Suchánek (1974), Thomasow a Paschke (1976, 1981), Ardö (1979), Ng-Kwai-Hang a Hayes (1982), Hanuš a Žváčková (1987).

Minimálním požadavkem pro vhodný chemický konzervační prostředek je schopnost zajistit „testovatelnost vzorku“. To znamená, že vzorek mléka si zachová své originální složení od okamžiku odběru do okamžiku analýzy, přičemž použité substance neovlivní výsledky analýzy (Kroger, 1985). To v případě použití infračervené analýzy mléka předpokládá pokud možno co nejnižší interferenční vliv použitého konzervačního prostředku na vlnových délkách příslušejících tuku, bílkovinám a laktóze. Všeobecně se považuje za možné „malý“ interferenční vliv kompenzovat kalibrací přístrojů. Firma Multispec uvedla výsledné hodnoty interferenčního vlivu některých substancí používaných jako konzervační činidla vzorků mléka (tab. I).

Hygienické problémy spojené s likvidací odpadního mléka konzervovaného dvojchromanem draselným vedly k ověřování několika druhů konzervačních činidel. Tržický (1990) navrhl nový konzervační prostředek vzorků mléka s pracovním názvem Milkofix Forte (dále jen Milkofix — M) na bázi sloučeniny stříbra. Podle údajů autora jde o prostředek s minimální ekologickou rizikovostí ve srovnání s jinými používanými konzervačními prostředky. Cílem práce je posoudit vhodnost tohoto prostředku pro účely infračervené analýzy mléka. Aby bylo dosaženo širší informace i mimo rámec Milkofixu, byl srovnán s několika běžně používanými konzervovadly.

MATERIÁL A METODA

Do testování byly zahrnuty čtyři konzervační prostředky vzorků mléka v těchto koncentracích:

1. Azid sodný (A) NaN_3 podle údajů Milchprüfing Bayern (1988). Konzervační směs 0,0085 g NaN_3 a 0,063 g NaCl na 25 ml mléka.
2. Bronopol (B) — (2-bromo-2 nitro- 1,3 propandiol), upraveno podle údajů PSL Microtabs (1987). Konzervační směs 0,005 g bronopolu a 0,050 g NaCl na 25 ml mléka.
3. Dvojchroman draselný. ON 57 0532 a 57 0536 připouštějí 1 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ na 1 ml mléka. V kontrole užítivosti, kde je nutno počítat s delší přepravou vzorků se používá 1,3 mg. ml⁻¹. V pokuse byl použit tabletovaný dvojchroman draselný (MERCK)

což činilo 0,033 g $K_2Cr_2O_7$ a 0,067 g KCl na 25 ml mléka (C). Dále byl použit tabletovaný dvojchroman draselný (ŠPP Trnava) obdobného složení (D).

4. Milkofix Forte (M). Podle údajů autora (Tržický, 1990) 0,125 g konzervační práškové směsi na 25 ml mléka. Směs byla použita v testování nebarvená a ve žluté barvě. Nekonzervované vzorky jsou značeny symbolem N.

V testu 1 byly dva bazénové vzorky mléka ošetřené způsoby A, M, N rozpipetovány do vzorkovnic (bez sterilizace vzorkovnic) a uloženy při teplotě 20 °C (I) a 4 °C (II) v temnu. Denně po dobu 12 dnů (I) a 18 dnů (II) byla v těchto vzorcích stanovována hodnota aktuální kyselosti (pH) a titrační kyselosti (°SH resp. 2,5 mmol.l⁻¹). Z hodnot dvou vzorků byl vypočten aritmetický průměr pro hodnotu pH a SH za příslušný den.

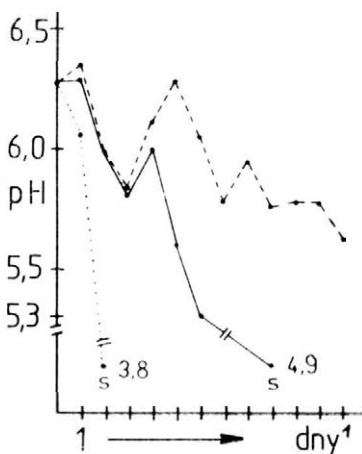
V testu 2 byly tři bazénové vzorky mléka sterilně odebrány. V laboratorii byly rozděleny do inkubačních nádobek s ošetřením C, M, N. Varianta M byla ověřována ve třech koncentracích bez barviva: M 1 0,075 g, M 2 0,100 g a M 3 0,125 g na 25 ml mléka, přičemž variantě M odpovídá varianta M 2 (0,100 g bez barviva = 0,125 g s barvivem). Každý bazénový vzorek byl inkubován ve dvou opakováních pěti variant což znamenalo 30 vzorků k denní analýze. Vzorky byly uloženy při pokojové teplotě v temnu. Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl stanovován denně ve vzorcích nesražených, vzorky s masivní sraženinou byly vylučovány z pokusu. CPM byl stanoven kultivační metodou na Petriho miskách v agaru obohaceném glukózou při teplotě 32 °C po 72 hodin. Počítány byly veškeré izolované kolonie mikroorganismů, vyrostlé na povrchu či uvnitř kultivačního média. K hodnocení vlivu konzervačních činidel na CPM byla použita generační doba v logaritmické fázi růstu, délka lag fáze růstové křivky a maximální dosažená hodnota CPM během inkubace.

V testu 3 byly postupným ředěním výchozích koncentrací konzervačních činidel A, B, C a M ve vodě a v mléce stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIK) těchto substancí na mikrodestičkách IN test (MP Klatovy). K ředění byly použity pouze ty vzorky mléka, které v syrovém nekonzervovaném stavu vykazaly nepřítomnost inhibičních látek metodou IN test.

V testu 4 bylo provedeno stanovení interferenčního vlivu přídavku konzervovaďla A, B, C, D a M do destilované vody a mléka na vlnové délky použité k měření obsahu tuků, bílkovin a laktózy na automatickém infraanalýzátoru mléka Milko-Scan 133B (Foss Electric, Dánsko). Měření bylo provedeno hned po rozpuštění činidel, tj. asi do 2 h po přidání do vzorku a pak po 24 h od přidání při teplotě uložení 4 °C. Bylo použito pět bazénových vzorků mléka. Diference pro tuk, bílkoviny a laktózu byly vypočteny v případě vodných roztoků jako rozdíly mezi nulovým bodem přístroje seřazeným na destilované vodě a hodnotami změřenými ve vodných roztocích konzervačních činidel a v případě mléka jako průměrné rozdíly mezi nekonzervovanými a konzervovanými vzorky.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky testu 1 jsou shrnuty v obr. 1 až 4. Z obr. 1 a 3, které zachycují dynamiku hodnot pH a SH ve vzorcích mléka uložených při teplotě 20 °C je patrné, že vzorky nekonzervované (N) se srazily po dvou dnech, vzorky M po devíti dnech a vzorky A se nesrazily po dvanáct dnů sledování. Ze startovací hodnoty pH 6,3 (obr. 1) klesla hodnota varianty N po dvou dnech na 3,8, varianty M po devíti dnech na 4,9 a varianty A po dvanácti dnech na 5,7. Ze startovací hodnoty SH 6,5 (2,5 mmol.l⁻¹) vzrostla tato u N ve stejné době na 28,6; u M na 22,3 a u A na 9,4 (obr. 3). Hodnota SH 9,0 (2,5 mmol.l⁻¹), která je podle ON 57 0536 maximálně přípustná pro vzorky měřené na infračervených analyzátoch byla překročena u vzorků N již po 24hodinovém uložení, u M po čtyřech dnech a u A po dvanácti dnech. Obr. 2 a 4 znázorňují vývoj pH a SH vzorků uložených při teplotě 4 °C. Zde nedošlo během skladování ke sražení vzorků, přičemž hodnota pH poklesla z 6,3 (obr. 2) u N na 5,3 po dvanácti dnech u M na 5,6 po 18 dnech a u A rovněž na 5,6 po stejné době. Hodnota SH (obr. 4) ve stejné době vzrostla z 6,5 (2,5 mmol.l⁻¹) u N na 16,0;

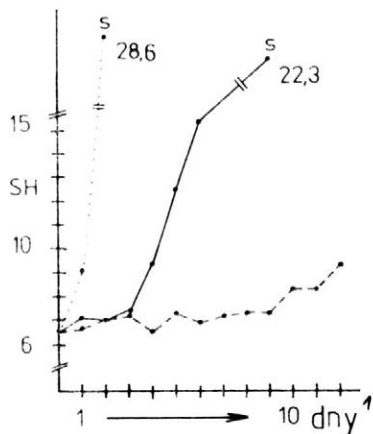
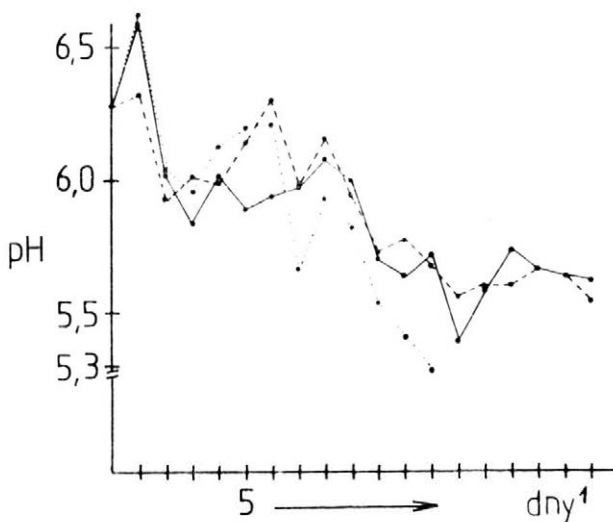


1. Dynamika hodnot pH v čase uložení vzorků mléka při teplotě 20°C pro vzorky nekonzervované (N...), konzervované Milkofixem (M—) a konzervované azidem sodným (A---); S = sražení vzorku mléka (výsvětlivky platí pro obr. 1—4) — Variations in pH values in the course of milk sample storage at a temperature of 20°C for untreated samples (N...), Milkofix-treated (M—) and sodium azide treated samples (A---); S = coagulation of milk sample (explanatory notes appl. to Figs. 1—4)

1 days

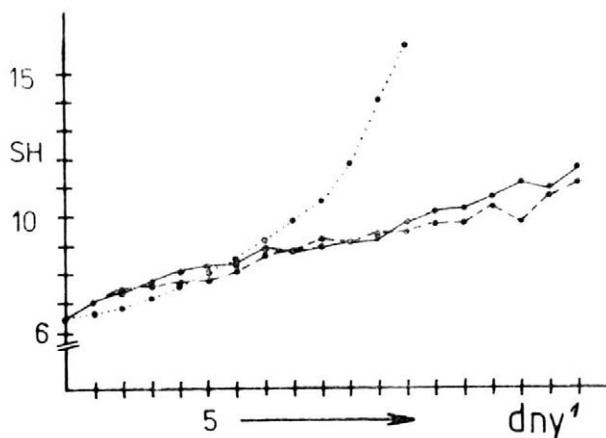
2. Dynamika hodnot pH v čase uložení vzorků mléka při teplotě 4°C pro vzorky N, pro vzorky M a pro vzorky A — Variations in pH values in the course of milk sample storage at a temperature of 4°C for N samples, for M samples and for A samples

1 days



3. Dynamika hodnot SH [2,5 mmol.l⁻¹] v čase uložení vzorků mléka při teplotě 20°C pro vzorky N, pro vzorky M a pro vzorky A — Variations in SH values [2,5 mmol/l] in the course of milk sample storage at a temperature of 20°C for N samples, for M samples and for A samples

1 days



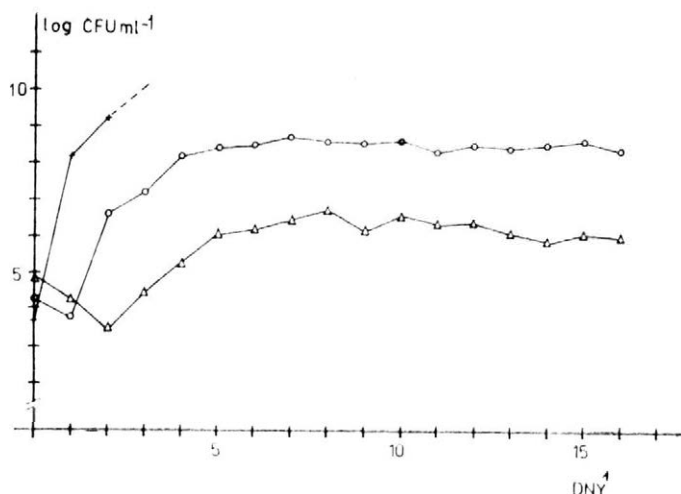
4. Dynamika hodnot SH ($2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) v čase uložení vzorků mléka při teplotě 4°C pro vzorky N, pro vzorky M a pro vzorky A — Variations in SH values ($2,5 \text{ mmol/l}$) in the course of milk sample storage at a temperature of 4°C for N samples, for M samples and for A samples

u M na 11,7 a u A na 11,2. Kritická normovaná hranice SH byla překročena u N 7. den uložení, u M 10. den a u A 9. den uložení.

Při srovnání vývoje v obr. 1 a 3, 2 a 4 je zřejmé, že při teplotě uložení 4°C je rozdíl mezi způsoby ošetření vzorků N, M, A vlivem efektu chladové konzervace poněkud zastřen, zatímco při teplotě 20°C je zřetelný. Poněkud větší kolísání především u hodnot pH ze dne na den (obr. 1 a 2), u SH je vývoj v čase plynulejší — obr. 3 a 4, lze vysvětlit jednak použitím nesterilizovaných vzorkovnic k uložení, takže mikrobiální vklad k vzorku mléka byl různý od vzorkovnice k vzorkovnici a pak kolísáním stability pH metru ze dne na den. Rovněž vzorky v terénu jsou však pro účely infračervené analýzy základního složení mléka přepravovány v nesterilních vzorkovnicích, proto byl tento způsob zvolen i v pokuse.

Poněvadž dynamika hodnot pH a SH ve vzorcích mléka v čase uložení může být považována za obraz metabolické aktivity mikrobiální kontaminace, která je spojena s fyzikálně chemickými změnami, lze konstatovat následující: preparát Milkofix vykázal inhibiční účinek (bakteriostatické, popř. baktericidní vlastnosti) vůči mikrobiálnímu rozkladu vzorků mléka, což se projevilo pomalejším poklesem pH, resp. vzrůstem SH v čase oproti vzorkům nekonzervovaným. Tento konzervační účinek byl však nižší než u srovnávaného azidu sodného NaN_3 , zřetelně při teplotě uložení 20°C .

Výsledky testu 2 jsou zachyceny v obr. 5. U varianty N výchozí celkový počet mikroorganismů (CPM) se pohyboval v rozmezí $5 \cdot 10^3$ – $8 \cdot 10^3 \text{ CFU.ml}^{-1}$. Již po 24 h inkubace vzorku došlo k masivnímu pomnožení CPM na hodnoty asi 10^8 CFU.ml^{-1} . Po 48 h byly již vzorky částečně sražené, hodnoty CPM dosahovaly 10^9 CFU.ml^{-1} . 72 h od počátku inkubace byly vzorky již zcela sražené. Vzhledem k dlouhým odběrovým interválům zcela chyběla lag fáze. Generační doba CPM byla značně krátká, pouze 1,6 h.



5. Růstové křivky celkového počtu mikroorganismů v čase uložení při teplotě 20 °C pro vzorky mléka N (+), M (o) a konzervované dvojchromanem draselným (Δ) — The growth curves of total counts of microorganisms in the course of sample storage at a temperature of 20 °C for milk samples (+), M milk samples (o) and potassium dichromate treated samples (Δ)

Výchozí CPM u varianty C (obr. 5) byl výrazně vyšší než u varianty N, pravděpodobně v důsledku kontaminace konzervačního činidla, které se aplikuje v pevném stavu. CPM dosahoval 10^5 CFU . ml⁻¹ mléka. Následoval výrazný pokles CPM až na hodnoty $4 \cdot 10^3$ CFU . ml⁻¹ mléka pro termín 48 h. Poté následoval růst CPM až do termínu asi 6 dní od počátku inkubace, kdy růstová křivka CPM dosáhla vrchol hodnotami asi $3 \cdot 10^6$ CFU . ml⁻¹. Od šestého dne po ukončení sledování 16. den již nedošlo k podstatným výkyvům CPM. Délka fáze lagu byla výrazně nejdelší ze sledovaných variant (mezi 48 a 72 h) a také generační doba v logaritmické fázi růstu nedosáhla nižších hodnot než 7,9 h. Průběh růstové křivky CPM u variant M 1 až M 3 (obr. 5) měl podobný průběh jako v případě C. Po počátečním poklesu CPM z $2 \cdot 10^4$ v čase startu až na $6 \cdot 10^3$ po 24 h inkubace následoval rychlý vzrůst, přičemž maxima CPM bylo dosaženo již 4. den hodnotou $2 \cdot 10^8$ CFU . ml⁻¹. Obdobně jako u varianty C nedochází pak již až do skončení pokusu k výrazným změnám CPM. Lag fáze růstové křivky trvala pouze 24 h a generační doba se pohybovala kolem 2,4 h, přičemž rozdíly mezi subvariantami M 1 a M 3 byly statisticky neprůkazné jak pro délku lag fáze, tak pro generační dobu a maximální dosažené hodnoty CPM.

Práce je zaměřena na konzervační účinky přípravku Milkofix ve vztahu nikoliv k mikrobiálním, ale k fyzikálně chemickým ukazatelům mléka. Proto je výsledky nutno posuzovat z hlediska pravděpodobnosti změn látkového složení mléka a CPM do hodnot 10^5 CFU . ml⁻¹ považovat za přijatelné. Dále je nutné poznamenat, že k hodnocení výsledku byly použity charakteristiky růstových křivek, které jsou exaktní pouze v případech, kdy je rostoucí kultura uniformní. V našem případě se většinou jedná o typické smíšené kultury, a proto je nutno s tímto vědomím výsledky posuzovat. Zcela jasně nejvyšší konzervační účinek vykázal dvojchroman draselný (C), kde nedošlo po 4 dny ke zvýšení CPM nad 10^5 CFU . ml⁻¹.

I. Srovnání testů mezi kontrolními vzorky a kontrolními vzorky s přidáním konzervovadly (upraveno podle Multispec, Blandford Systems Ltd, měřeno na přístrojích Milco-Scan 203 Foss Electric); vyjádřeno průměrnými diferencemi od kontrolních vzorků — Comparison of the tests between control samples and control samples with an addition of preservatives (adjusted according to Multispec, Blandford Systems Ltd, measurements performed on apparatuses Milco-Scan 203 Foss Electric); presented as average differences from control samples

Konzervační činidlo ¹	Tuk ² [%]		Bílkoviny ³ [%]	Laktóza ⁴ [%]
	A filtr ⁵	B filtr ⁶		
Labs Preservo, (Bronopol), prášková směs 10/25/82 ⁷	—0,003	—0,001	+0,004	+0,001
Labs Preservo, (Bronopol), prášková směs 12/8 82 ⁸	—0,015	—0,0005	—0,002	0
Labs Preservo, (Bronopol), tablety ⁹	0	—0,004	—0,005	+0,001
Bronopol, čistý prášek ¹⁰	+0,003	+0,001	+0,010	+0,011
Boots Bronotab	—0,029	—0,079	+0,038	+0,001
Nasco, dvojchroman draselný tablety ¹¹	—0,021	—0,060	—0,037	—0,020
Nasco, kyselina boritá, tablety ¹²	+0,001	—0,005	—0,753	+0,336
German Milk Marketing Board, azid sodný, tablety ¹³	—0,028	—0,074	—0,014	+0,008

¹preservative substance, ²fat, ³proteins, ⁴lactose, ⁵A filter, ⁶B filter, ⁷powder mixture 10/25/82, ⁸powder mixture 12/8/82, ⁹tablets, ¹⁰pure powder, ¹¹Nasco, potassium dichromate, tablets, ¹²Nasco, boric acid, tablets, ¹³sodium azide, tablets

Také generační doba CPM v logaritmické fázi růstu byla průkazně nejnižší a naopak nejdelší (asi 3 dny) byla fáze lagu, kdy nedochází k vzrůstu CPM nad startovní hodnoty.

Milkofix ve srovnání s dvojchromanem draselným vykazoval průkazně nižší konzervační účinek. Doba lagu činila 24 h, generační doba v logaritmické fázi byla průkazně kratší, vzestup CPM nad 10^5 CFU . ml⁻¹ nastal již po 2. dni. Rozdíl M oproti variantě N je však statisticky vysoce významný, což umožňuje konstatovat určitou konzervační schopnost Milkofixu. Zajímavé je, že koncentrace Milkofixu měla velmi malý vliv na hodnocená kritéria a její zvýšení by pravděpodobně nevedlo k významně vyšší konzervační schopnosti. Pozoruhodné dále je, že kolonie vyrostlé v M měly výrazně menší velikost a byly značně potlačené v růstu. Lze proto předpokládat, že vliv na metabolickou aktivitu bakterií bude vyšší než vliv na schopnost dělení. Opačně kolonie z varianty C byly normální velikosti, což je možné opět vysvětlit tím, že je zasažen genetický aparát

II. Minimální inhibiční koncentrace (MIK) konzervačních prostředků pro vzorky mléka vůči testovacímu mikroorganismu *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* v mikroleštičkách IN-test (MP Klatovy) — Minimum inhibiting concentration (MIC) of preservatives for milk samples with respect to the test microorganism *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* in IN-test microplates (Klatovy Dairy Industry)

Konzervační činidlo ¹	Běžné dávkování ² (mg . ml ⁻¹)		MIK konzervační směsi ⁵			
	konzervační směs ³	účinná látka ⁴	v destilované vodě ⁶		v mléce ⁷	
			ředěno ⁸	mg . ml ⁻¹	ředěno ⁸	mg . ml ⁻¹
Azid sodný ⁹	3	0,36	2×	1,50	2×	1,50
Bronopol ¹⁰	2	0,20	40×	0,05	20×	0,10
Dvojchroman draselný tablety MERCK ¹¹	4	1,32	10×	0,40	7×	0,57
Milkofix	5	—	3×	1,67	2×	2,50

¹preservative substance, ²current dosage, ³preservative mixture, ⁴active ingredient, ⁵MIC of preservative mixture, ⁶in distilled water, ⁷in milk, ⁸diluted, ⁹sodium azide, ¹⁰Bronopol, ¹¹potassium dichromate, MERCK tablets

III. Interferenční vlivy konzervačních prostředků (směsí o běžné koncentraci) na měření tuku, bílkovin a laktózy infraanalyzátozem Milco-Scan 133B ve vodném roztoku. A — azid sodný, B — bronopol, C — dvojchroman draselný MERCK tablety, D — dvojchroman draselný tablety ŠPP Trnava, M — Milkofix (průměry šesti měření) — Interferential effects of preservative substances (mixtures with current concentrations) on the records of fat, proteins and lactose on a Milco-Scan 133B infraanalyzer in water solution. A — sodium azide, B — bronopol, C — potassium dichromate, MERCK tablets, D — potassium dichromate, tablets made by the State Animal Breeding Enterprise at Trnava, M — Milkofix (averages of six measurements)

Konzervace ¹	Tuk ² (%)	Bílkoviny ³ (%)	Laktóza ⁴ (%)
A	—0,02	—0,01	0,01
B	—0,01	0,01	0,02
C	—0,04	—0,03	—0,02
D	—0,01	—0,02	0,01
M	—0,06	—0,02	0,14

¹preservation, ²fat, ³proteins, ⁴lactose

buňky oproti enzymatickému jako v případě M. Růstové křivky CPM jak ve vzorcích C, tak v M měly poněkud atypický průběh oproti teoretickým. Po dosažení maxima klesaly pouze zvolna, což mohl zapříčinit konzervační účinek vznikajících produktů mikrobiálního metabolismu (kyselina mléčná, octová a další).

IV. Interferenční vlivy konzervačních prostředků (směsí o běžné koncentraci) na měření tuku, bílkovin a laktózy infraanalyzátozem Milko-Scan 133B ve vzorcích mléka. A — azid sodný, B — bronopol, C — dvojchroman draselný MERCK tablet, D — dvojchroman draselný tablety ŠPP Trnava, M — Milkofix ($\bar{x} \pm s_x$ z pěti vzorků mléka). Měření provedeno hned po rozpuštění konzervovadla v mléce (asi po 2 h) a pak po 24 h uložení při teplotě 4 °C — Interferential effects of preservative substances (mixtures with current concentration) on the records of fat, proteins and lactose on a Milko-Scan 133B infraanalyzer in milk samples. A — sodium azide, B — bronopol, C — potassium dichromate, MERCK tablets, D — potassium dichromate, tablets made by the SABE at Trnava, M — Milkofix ($\bar{x} \pm s_x$ of five milk samples). The readings took place immediately after the preservative had dissolved in milk (in about 2 hours) and then after 24-hour storage at 4 °C

Konzervace ¹	Po 2 hodinách ²			Po 24 hodinách ³		
	tuk ⁴ (%)	bílkoviny ⁵ (%)	laktóza ⁶ (%)	tuk ⁴ (%)	bílkoviny ⁵ (%)	laktóza ⁶ (%)
A	-0,078 ± 0,008	-0,012 ± 0,008	-0,004 ± 0,011	-0,032 ± 0,028	0,002 ± 0,008	-0,006 ± 0,009
B	-0,052 ± 0,033	-0,006 ± 0,009	0,008 ± 0,016	-0,036 ± 0,032	0,000 ± 0,012	0,006 ± 0,009
C	-0,050 ± 0,044	-0,024 ± 0,005	-0,034 ± 0,009	-0,040 ± 0,016	-0,036 ± 0,009	-0,024 ± 0,005
D	-0,026 ± 0,022	-0,022 ± 0,008	-0,028 ± 0,013	-0,042 ± 0,029	-0,018 ± 0,013	-0,006 ± 0,011
M	-0,122 ± 0,016	-0,012 ± 0,008	0,102 ± 0,013	-0,072 ± 0,028	0,000 ± 0,012	0,098 ± 0,013

¹preservation, ²after 2 hours, ³after 24 hours, ⁴fat, ⁵proteins, ⁶lactose

Výsledky testu 3 jsou v tab. II. Minimální inhibiční koncentrace jsou vyjádřeny v množství konzervační směsi inhibující růst testovacího mikroorganismu v IN testu (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) a dále ředěním běžně používané koncentrace. Ze stupně ředění lze sestavit řadu ve směru k slábnoucímu inhibičnímu účinku: B, C, A a M. I zde byl prokázán antibakteriální vliv M slabší než pro ostatní konzervovadla. Výsledek tohoto testu je však nutno brát pouze jako orientační, neboť testovací mikroorganismus není významný při rozkladu vzorků mléka.

Přímý vztah testovaných činidel k infračervené analýze je zachycen v tab. III a IV. Výsledky jsou v případech A, B, C a D zpravidla srovnatelné s hodnotami v tab. I.

Nejvyšší interferenční vliv byl zaznamenán pro M u laktózy v hodnotě 0,098 až 0,14% u mléka a vodného roztoku. Nelze proto doporučit další zvyšování koncentrace této směsi ve vzorcích mléka. Je však možné ještě připustit při použití Milkofixu ke konzervaci vzorků kompenzaci tohoto vlivu kalibrací přístroje vzorky ošetřenými stejným způsobem.

ZÁVĚR

Testovaný preparát Milkofix vykázal antibakteriální účinky, které však byly slabší, než účinky srovnávacích konzervovadel: dvojchromanu draselného, bronopolu a azidu sodného. Vzhledem k maximální normované hodnotě SH pro měření na infraanalýzátoru (9,0.25 mmol.l⁻¹) lze doporučit, aby vzorky konzervované Milkofixem nebyly měřeny déle než 4 dny po odběru při teplotě uložení 20 °C a 9 dní po odběru při teplotě uložení 4 °C. Vyšší interferenční vliv Milkofixu na měření laktózy je ještě možné kompenzovat kalibrací.

Literatura

- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, 1979, s. 14—16.
- BUCHBERGER, J. — WEISS, G. — KIERMEIER, F. — PROBST, A.: Reproduzierbarkeit und Genauigkeit bei Fett-, Eiweiss- und Lactosebestimmung mit Hilfe der Infrarot-Spektrophotometrie (IRMA II-Gerät). *Milchwissenschaft*, 26, 1971, č. 11, s. 687—693.
- BUCHBERGER, J. — KIERMEIER, F.: Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Dtsch. Molk. Ztg.*, F8, 1975, s. 192—194.
- HANUŠ, O. — ZVÁČKOVÁ, I.: Ověření konzervačního prostředku mléka Bronopol pro účely kontroly užitkovosti skotu ve vztahu k infračervené spektrofotometrii. *Výzk. v chovu skotu*, 1987, č. 4, s. 28—34.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985, s. 783—787.
- KVAPILÍK, J. — SUCHÁNEK, B.: Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živoč. Vyr.*, 19, 1974, č. 1, s. 31—38.
- MILCHPRÜFRING BAYERN e. V., Tätigkeitsbericht. 1988.
- MULTISPEC, BLANDFORD SYSTEMS Ltd.: Summary of comparison tests between control samples and control samples with added preservatives. *Firemní literatura*.
- NG-KWAI-HANG, K. F. — HAYES, J. F.: Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by a modified Pro-Milk Mk II method. *J. Dairy Sci.*, 65, 1982, s. 1895—1899.
- ON 57 0332 Stanovení počtu somatických buněk v mléce.
- ON 57 0536 Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem.
- PSL MICROTABS — Milk preservative Tablets. *Technical Bulletin*, January 1987. Nottingham-England, San Francisco-USA. 1987. *Firemní literatura*.
- RENNER, E. — ÖMEROGLU, S.: Untersuchungen über die automatisierte Fett- und Eiweissgehaltsbestimmung in Milch mit dem Infrarot-Milchanalysator (IRMA). *Dtsch. Molk. Ztg.*, 92, 1971, s. 2079—2123.

THOMASOW, J.: Simultanbestimmung des Fett- und Eiweißgehaltes der Milch durch Messung der Infrarotabsorption mit dem Milco-Scan 300. *Milchwissenschaft*, 31, 1976, č. 3, s. 149–156.

THOMASOW, J. — PASCHKE, M.: Bestimmung des Fett-, Eiweiß- und Milchzuckergehaltes von Milch durch Messung der Infrarotabsorption mit dem Gerät Multispec. *Milchwissenschaft*, 36, 1981, s. 65–68.

TRZICKÝ, V.: Milkofix Forte. Osobní sdělení, 1990.

WEAVER, J. C. — KROGER, M. — MC CARTHY, R. D.: Distribution of dichromate in preserved milk-toward utilization of spent milk samples from centralized testing laboratories. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977, s. 706–709.

Došlo dne 18. 2. 1991

HANUŠ, O. — BENDA, P. — GENČUROVÁ, V. [Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín]: *Tests of Milkofix, a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part 1: Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect.* *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992 (1): 21–31.

Hygienic, ecological and health problems of sample preservation for an analysis of basic milk components make us continually to develop a safer chemical preservative substance which will preserve the original sample composition for the time required and which will not influence the analyses. Tržický (1990) proposed Milkofix (M), a preservative substance on the basis of silver compound. The author reports on minimum risks of the use of this preparation, in comparison with traditional preservatives. Preservative efficiency of Milkofix was compared with other preservatives: $K_2Cr_2O_7$ (C), NaN_3 (A) and bronopol (B). The following concentrations were used: A — 0.0085 g NaN_3 and 0.0630 g NaCl, B — 0.0050 g bronopol and 0.0500 g NaCl, C — 0.0330 g $K_2Cr_2O_7$ and 0.0670 g KCl in tablet, M — 0.1250 g of the mixture, all amounts are per 25 ml milk. The observed antibacterial efficiency of M could be seen in a slower decrease in actual acidity, and/or in an increase in titratable acidity in M-treated samples unlike untreated ones (N). From the starting value pH 6.3 (Fig. 1), the value of N treatment dropped to 3.8 after two days, the values of M and A treatments dropped to 4.9 after nine days and to 5.7 after twelve days, respectively. As for SH, the values increased within the same interval from 6.5 (2.5 mmol/l) to 28.6 in N, and to 22.3 in M and 9.4 in A (Fig. 3). There was a similar trend when the milk samples were stored at a temperature of 4°C, but the differences between the preservation methods were not so clear in comparison with storage at a temperature of 20°C (Figs. 1 and 3). The standardized SH value of 9.0 (2.5 mmol) for infraanalyzer measurements was exceeded after 24 hours in N samples, after four days in M samples and after 12 days in A samples at a temperature of 20°C. The observation of the growth of microorganism counts (CPM) showed that this growth was slower in M than in N, but faster in the samples of C treatment (Fig. 5). The generative time of CPM in N made 1.6 hours, in M 2.4 hours and in C 7.9 hours. The lag phase of these mixed cultures was 24 hours in M, 60 hours in C and in N treatment the lag phase was zero. The demonstrated antibacterial effects of Milkofix were weaker than those of A, bronopol and C; this could also be seen in the values of minimum inhibitory concentrations with respect to *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (IN-test, Tab. II). The highest interferential effects of preservatives on infraanalysis (Milko-Scan 133 B) were observed in Milkofix for lactose at the value of 0.140 % (Tabs. III and IV). This value is still possible to compensate for by the apparatus calibration. The obtained results show that after Milkofix preservation of milk samples it is possible to analyze the samples maximally within four days after sampling if they are stored at a temperature of 20°C and within nine days if they are stored at 4°C.

milk samples; infrared analysis; preservation; Milkofix; bronopol; sodium azide; potassium dichromate; actual acidity

Adresa autorů:

Ing. Oto Hanuš, ing. Václava Genčurová, Výzkumný ústav pro chov skotu, k. ú. o., Rapotín, 788 13 Šumperk 4
RNDr. Pavel Benda, ZOL Dubicko, 759 72 Dubicko

OCHRANA A TVORBA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ V ZEMĚDĚLSTVÍ A LESNICTVÍ

AKTUALITY ZE SVĚTA

Publikace obsahuje nejnovější poznatky z oblasti ochrany a tvorby životního prostředí, zejména ochrany ovzduší, vodních zdrojů, půdního fondu, ochrany rostlin a živočichů, tvorby krajiny a hygieny prostředí.

Vychází 6krát ročně, jedno číslo v rozsahu 44 stran obsahuje příspěvky zpracované převážně ze zahraniční literatury, materiály a informace ze seminářů, konferencí a dalších vědeckotechnických akcí k této problematice.

Cena jednotlivého čísla 15 Kčs, roční předplatné 90 Kčs.

Objednávky: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Slezská 7, 120 56 Praha 2

TESTOVÁNÍ NOVÉHO KONZERVAČNÍHO PŘÍPRAVKU VZORKŮ MLÉKA MILKOFIX PRO ÚČELY INFRAČERVENÉ ANALÝZY ZÁKLADNÍHO SLOŽENÍ MLÉKA. II. OVĚŘENÍ KONZERVAČNÍHO ÚČINKU VE VZTAHU K INFRAČERVENÉ ANALÝZE

O. Hanuš, V. Genčurová, I. Žváčková

HANUŠ, O. — GENČUROVÁ, V. — ŽVÁČKOVÁ, I. [Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín]: *Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. Ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 33—43.

Ekologicky nezávadný preparát Milkofix (M) určený ke konzervaci vzorků [Tržický, 1990] byl pro účely infračervené analýzy základního složení mléka srovnáván s vzorky nekonzervovanými (N) a konzervovanými azidem sodným (A), bronopolem (B) a dvojchromanem draselným (C) při teplotě uložení vzorků 20 °C (I) a 4 °C (II) po dobu 14 a 18 dní. Preparáty byly podle literárních doporučení v těchto koncentracích: A = 0,0085 g NaN₃ a 0,063 g NaCl; B = 0,005 g bronopolu a 0,05 g NaCl; C = 0,033 g K₂Cr₂O₇ a 0,067 g KCl; M = 0,125 g, vše na 25 ml mléka. Byly použity tři bazénové vzorky mléka, které byly každý den analyzovány na automatickém infraanalýzátoru Milko-Scan 133B (Foss Electric, Dánsko). Grafickým vyhodnocením výsledků byly stanoveny doby přijatelné u jednotlivých způsobů ošetření vzorků mléka k získání použitelných výsledků: N I — 0 dní; A I — 9; B I — 10; C I — 13; M I — 4; N II — 10; A II — 5; B II — 11; C II — 15; M II — 10. Výsledky pro Milkofix jsou v souladu se závěry předcházející studie, kde byly určeny doby 4 a 9 dní. Doby do srážení vzorků mléka činily: N I — 1 den, M I — 10 dní. Vzorky A I, B I, C I a N II se nesrazily po 13 dní uložení, vzorky A II, B II, C II a M II po 17 dní. Systémem hodnotících kritérií bylo vytvořeno pořadí od nejvhodnějšího způsobu konzervace vzorků mléka pro uvedený účel: 1. C II, 2. C I, 3. B II, 4. B I, 5. M II, 6. N II, 7. A II, 8. M I a 9. N I.

vzorky mléka; konzervace; infračervená analýza; tuk; bílkoviny; laktóza; azid sodný; bronopol; dvojchroman draselný; Milkofix

Vzhledem k ekologickým a hygienicko zdravotním problémům souvisejícím s některými konzervačními prostředky vzorků mléka určených k analýze, jsou místy testovány nové, v úvahu připadající látky. Přehled doposud běžně užívaných substancí poskytl ve vztahu k různým analytickým postupům K r o g e r [1985]. Zvláště u dvojchromanu draselného je však zdůrazňována rizikovost použití, což bylo důvodem jeho náhrady bronopolem v některých zemích [P S L M i c r o t a b s. 1987].

Užitím chemických činidel, především dvojchromanu draselného, bronopolu a azidu sodného pro účel konzervace vzorků ve vztahu k infračervené spektrofotometrii základního složení mléka se zabývali Renner a Ömeroglu (1971), Buchberger aj. (1971), Thomasow (1976), Anonym (1977), Ardö (1979), Lorenz a Hoffer (1980), Kylä-Siurola a Antila (1981), Thomasow a Paschke (1981), Ng-Kwai-Hang a Hayes (1982), Sjaunja (1984) a Hanuš a Žváčková (1987). Autoři zpravidla popsali interferenční vliv substance a doporučené koncentrace, doby a podmínky účinné konzervace.

Tržický (1990) navrhl ekologicky a zdravotně minimálně rizikový konzervační prostředek Milkofix Forte (dále M) na bázi sloučeniny střibra, který jsme v naší předcházející práci (Hanus aj., 1991) testovali na konzervační schopnost. Preparát obecně vykázal antibakteriální účinky a tím konzervační účinek, který byl slabší v porovnání s tradičními konzervovadly. Přijatelné hodnoty pro M při teplotě uložení 20 °C byly získány po dobu 4 dnů, údržnost při teplotě 4 °C činila 9 dnů.

V předkládané práci se hodnotí použitelnost Milkofixu pro infračervenou analýzu základního složení mléka (obsah tuku, bílkovin a laktózy) a jsou porovnávány další konzervační látky.

MATERIÁL A METODA

V práci byly porovnány konzervační účinnosti čtyř chemických látek v desíti způsobech ošetření vzorků mléka. Při úložné teplotě 20 °C (I) a 4 °C (II) byly přechovávány tři bazénové vzorky mléka vždy nekonzervované (N) a konzervované azidem sodným (A), bronopolem (B), dvojchromanem draselným (C) a milkofixem (M). Vzorky byly uloženy po 25 ml v plastových vzorkovnicích vždy v temnu a byly měřeny každý den po dobu 14 (I) a 18 (II) dní na automatickém infračerveném analyzátoru mléka Milko-Scan 133B (Foss Electric, Dánsko) na obsah tuku, bílkovin a laktózy. Přístroj byl kalibrován metodou podle Gerbera (tuk), Kjeldahla (hrubé bílkoviny) a metodou polarimetrickou (laktóza, % monohydrátu). Hodnoty získané první den měření byly považovány za základní (referenční) ke srovnání s dalšími dny a zaneseny do tabulek jako aritmetické průměry z tří vzorků. Celkově bylo uskutečněno měření 429 vzorků mléka.

Chemikálie ke konzervaci byly použity v těchto koncentracích:

1. Azid sodný v konzervační směsi 0,0085 NaN₃ a 0,063 g NaCl na 25 ml mléka podle údajů Milchprüfning Bayern (1988).

2. Bronopol v konzervační směsi 0,005 g bronopolu [2-brom 2-nitro 1,3 propandiol] a 0,05 g NaCl na 25 ml mléka. Upraveno podle PSL Microtabs (1987).

3. Dvojchroman draselný tabletovaný (MERCK): 0,033 g K₂Cr₂O₇ a 0,067 g KCl na 25 ml mléka, což odpovídá 1,3 mg dvojchromanu na 1 ml mléka. ON 57 0532 a ON 57 0536 doporučují 1 mg . ml⁻¹. Toto vyšší dávkování je však použito v kontrole užitkovosti krav, kde zatím není zajištěna chladová přeprava vzorků.

4. Milkofix Forte; 0,125 g konzervační směsi barevné na 25 ml mléka (Tržický, 1990).

Grafické vyhodnocení bylo provedeno v souladu s doporučeními IDF (Grappin, 1985). K posouzení opakování denních průměrných hodnot tří bazénových vzorků pro obsah tuku, bílkovin a laktózy a jednotlivé systémy ošetření vzorků na referenční hodnoty (změřené první den 4 h po odběru vzorků po rozpuštění konzervačních činidel) byla použita kritéria:

α — procento diferencí $> \pm 0,05$ % od referenční hodnoty do dne, kdy se srazily první konzervované vzorky, tj. do jedenáctého dne [10 dnů uložení]. Diference $\pm 0,05$ je běžně konvenčně uznávaná hranice jak pro rozdíly mezi průměry referenčních a instrumentálních metod při kalibraci (Biggs, 1979 — cit. Van de Voort, 1980), tak pro limity pilotních vzorků.

β — procento statisticky významných diferencí ($P < 0,01$, párový t -test) od referenční hodnoty po dobu 10 dnů uložení vzorků.

γ — počet dní od prvního do dne, kdy byl zachycen první rozdíl $> \pm 0,05\%$ od referenční hodnoty během 14 dnů uložení.

δ — počet dní od prvního dne do doby kdy byla zachycena první statisticky významná difference od referenční hodnoty ($P < 0,01$) během 14 dnů uložení.

ε — počet dní od začátku do prvního vizuálně patrného náznaku srážení uložených vzorků mléka (přítomnost vloček) během 14 dnů.

κ — počet dní do úplného srážení vzorků během 14 dnů uložení.

ω — pořadí od nejnižší do nejvyšší zjištěné variability ($\bar{x} \pm s_x$) během 10 dnů uložení vzorků.

Uvnitř každého kritéria bylo stanoveno dílčí pořadí vhodnosti jednotlivých způsobů ošetření vzorků mléka a z těchto bylo určeno celkové pořadí.

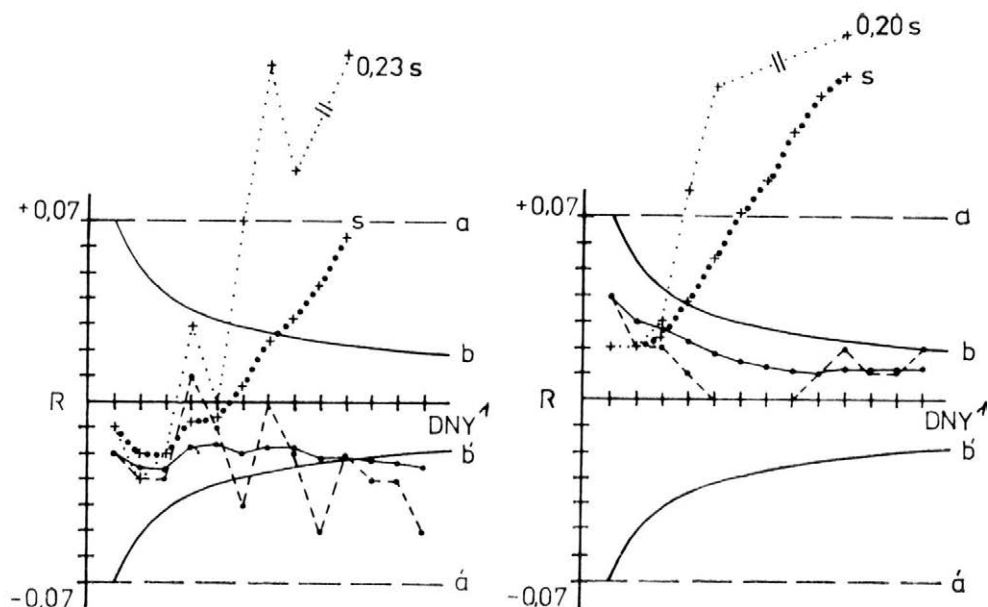
VÝSLEDKY A DISKUSE

Po nakonzervování vzorků mléka Milkofixem byla během 3 h pozorována tvorba šedého povlaku jemné sráženiny stříbrné soli u dna vzorkovnice, která však po rehomogenizaci nepůsobila problémy v průchodnosti cest průtočného systému přístroje.

Nekonzervované vzorky mléka při teplotě uložení 20°C (N I) se srazily druhý den, přičemž způsob, resp. systém ošetření vzorků mléka (tj. způsob konzervace a teplota uložení) byl vyřazen z hodnocení při srážení prvního ze tří vzorků. Vzorky konzervované Milkofixem při teplotě 20°C (M I) se srazily po 10 dnech uložení. Systémy ošetření A I, B I, C I a N II se nesrazily do čtrnáctého dne uložení: A II, B II, C II a M II do osmnáctého dne uložení.

Část výsledků je zachycena v obr. 1—6, kde je porovnán Milkofix s dvojchromanem. Grafy byly vypracovány pro všechny způsoby ošetření vzorků a byly z nich odečteny doby uložení, které jsou přijatelné k získání použitelných výsledků. Odhad byl učiněn podle překročení limitních pásem křivkami jednotlivých složek mléka při různých způsobech ošetření. Výsledky jsou shrnuty v tab. I. Vyplývá z ní, že za přijatelné lze považovat tyto doby: N I — 0, A I — 9, B I — 10, C I — 13, M I — 4, N II — 10, A II — 5, B II — 11, C II — 15, M II — 10 dnů. Pozoruhodné je, že v případě azidu sodného je delší doba při teplotě uložení 20°C než při teplotě 4°C . U všech ostatních způsobů ošetření je tomu naopak. Bez znalosti vývoje mikrobiálního růstu v uložených vzorcích však nelze tento jev uspokojivě vysvětlit. Nižší údržnost u A II byla způsobena především horší opakovatelností hodnot tuku, což může naznačovat i na horší rehomogenizaci tukové vrstvy v příslušných vzorcích. Hodnoty Milkofixu M I — 4 a M II — 10 jsou v podstatě v souladu s výsledky předcházející práce (Hanuš aj., 1991).

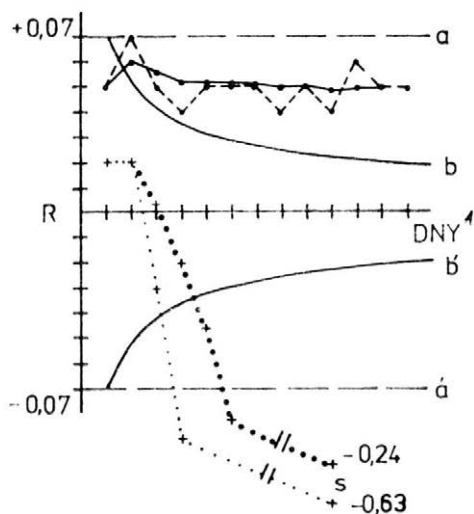
Průměrné hodnoty zjištěné při sledování pro každý den, způsob ošetření a složka mléka jsou shrnuty v tab. II až IV. Tyto výsledky byly podrobeny hodnocení podle stanovených kritérií (α až ω) a bylo stanoveno celkové pořadí z hlediska vhodnosti k použití (tab. V). Jako nejlepší při použitých koncentracích byl vyhodnocen dvojchroman draselný při teplotě vzorků mléka 4°C , což potvrzuje názor, který uveřejnil K r o g e r



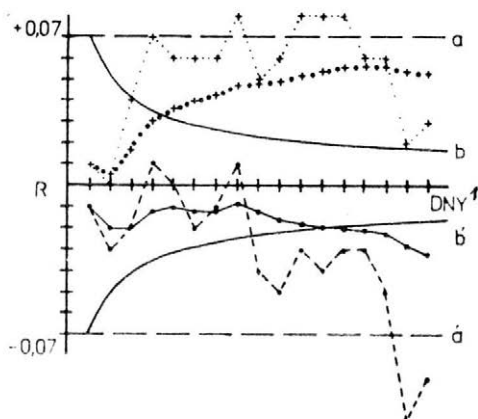
1. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu tuku stanoveného na MSc 133B ve vzorcích konzervovaných Milkofixem (M) a dvojjchromem draselným (C) při teplotě uložení 20 °C. Pro každé konzervovadlo jsou zachyceny difference od referenční hodnoty (změřené první den) pro individuální výsledky (i) a pro kumulativní průměry (k) v jednotlivých dnech. R = referenční hodnota, a + a' = horní a dolní individuální limit, b + b' = horní a dolní mez pásma spolehlivosti pro kumulativní průměry, s = sražený vzorek mléka. M(+, i, k ● ● ●), C(●, i - - - - -, k ———); vysvětlivky platí pro obr. 1–4 — Control diagramme for the values of fat content determined on the MSc 133B apparatus in milk samples treated with Milkofix (M) and potassium dichromate (C) at a storage temperature of 20 °C. For each preservative the differences from the reference value (recorded on day 1) are given for individual results (i) and for cumulative means (k) on particular days. R = reference value, a + a' = upper and lower individual limit, b + b' = upper and lower limit of reliability zone for cumulative means, s = coagulated milk sample. M(+, i, k ● ● ●), C(●, i - - - - -, k ———); explanatory notes apply to Figs. 1–4

2. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu bílkovin ve vzorcích konzervovaných Milkofixem a dvojjchromem draselným při teplotě uložení 20 °C — Control diagram for the values of protein content in milk samples treated with Milkofix and potassium dichromate at a storage temperature of 20 °C

(1985). Toto seřazení rovněž v podstatě odpovídá výsledkům grafického vyhodnocení v tab. I.



3. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu laktózy ve vzorcích konzervovaných M a C při teplotě uložení 20 °C — Control diagramme for the values of lactose content in M and C treated milk samples at a storage temperature of 20 °C



4. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu tuku ve vzorcích konzervovaných M a C při teplotě 4 °C — Control diagramme for the values of fat content in M and C treated milk samples at a temperature of 4 °C

I. Vyjádření dob uložení vzorků mléka (ve dnech) při různých způsobech ošetření, které jsou přijatelné k získání použitelných výsledků při infraanalýze základních složek mléka. Doby celkové jsou odhadnuty po zvážení významnosti dob pro jednotlivé složky. I = 20 °C; II = 4 °C; N — nekonzervované; A — azid sodný; B — bronopol; C — dvojjochroman draselný; M — Milkofix [platí pro tab. I—V] — Determination of the times of milk sample storage (in days) for different treatments within which the applicable results are obtained from the infraanalysis of basic milk components. Total times have been estimated after weighting the significance of the times for particular components. I = 20 °C; II = 4 °C; N — untreated; A — sodium azide; B — bronopol; C — potassium dichromate; M — Milkofix [applies to Tabs. I—V]

Složka ¹ Teplota ² Ošetření ³	Tuk ⁴		Protein ⁵		Laktóza ⁶		Celkem ⁷	
	I	II	I	II	I	II	I	II
N	0	10	1	11	0	9	0	10
A	9	4	13	8	12	11	9	5
B	13	11	13	11	9	17	10	11
C	13	15	13	17	13	17	13	15
M	6	10	4	10	4	17	4	10

¹component, ²temperature, ³treatment, ⁴fat, ⁵protein, ⁶lactose, ⁷total

II. Výsledky obsahu tuku tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků (%) — The results of fat content in three bulk milk samples treated with different preservatives and analyzed on the MSc 133B apparatus on particular days. The values represent arithmetical means of three samples (%)

Teplota ¹ Konzervace ² Den ³	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	4,43	4,39	4,40	4,41	4,33	4,45	4,39	4,41	4,41	4,34
2	a 4,26	4,38	4,39	4,39	4,32	4,46	4,40	4,41	4,40	4,35
3	s a 4,31	4,36	4,37	4,30		4,45	4,41	4,41	4,38	4,34
4		4,34	4,37	4,37	4,31	4,48	a 4,46	4,43	4,39	4,38
5		4,36	4,42	4,42	4,36	a 4,51	a 4,47	4,45	4,42	a 4,41
6		4,35	4,40	4,40	4,33	4,48	ab 4,49	a 4,47	4,41	4,39
7		4,37	4,41	4,37	a 4,40	4,49	ab 4,52	a 4,47	4,39	4,39
8		4,35	4,41	4,41	ab 4,46	4,48	a 4,49	4,43	4,40	4,39
9		4,38	4,42	4,39	a 4,42	a 4,51	ab 4,56	a 4,49	4,42	a 4,42
10		4,36	4,40	4,36	a 4,48	4,48	ab 4,53	4,45	4,37	4,39
11		4,35	4,38	4,39	a 4,56	b 4,50	a 4,49		b 4,36	a 4,40
12		4,36	4,42	4,38	s	a 4,51	ab 4,49	b 4,46		a 4,42
13		4,36	4,42	4,38		ab 4,52	ab 4,54	a 4,47		a 4,42
14		4,37	4,44	4,36		a 4,51	a 4,57	a 4,50		a 4,42
15							a 4,50	a 4,53	4,38	a 4,40
16							a 4,54	a 4,50	4,36	a 4,40
17							ab 4,52		a 4,29	4,36
18							a 4,47		a 4,32	4,37

¹temperature, ²preservation, ³day

a = difference $> \pm 0,05$ od hodnoty referenční (první řádek); b = statisticky významná difference $P < 0,01$ od referenční hodnoty; s = sražené vzorky (platí pro tab. II–IV) — a = difference $> \pm 0,05$ from the reference value (first line); b = statistically significant difference $P < 0,01$ from the reference value; s = coagulated samples (applies to Tabs. II–IV)

III. Výsledky obsahu bílkovin tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků (%) — The results of protein content in three bulk milk samples treated with different preservatives and analyzed on the MSc 133B apparatus on particular days. The values represent arithmetical means of three samples (%)

Teplota ¹ Konzervace ² Den ³	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	3,51	3,50	3,51	3,49	3,52	3,52	3,51	3,52	3,49	3,51
2	a 3,46	3,51	3,55	3,53	3,54	b 3,55	3,54	3,55	3,52	b 3,55
3	s	3,53	3,53	3,51	3,54	3,55	3,55	3,55	3,52	3,55
4		3,52	3,53	3,51	3,55	3,54	3,55	3,54	3,52	3,55
5		3,51	3,53	3,50	a 3,60	3,54	3,56	3,54	3,50	3,55
6		3,50	3,51	3,49	a 3,64	3,54	3,56	3,54	3,49	3,53
7		3,51	3,52	3,49	a 3,68	3,54	a 3,57	3,55	3,50	3,55
8		3,50	3,51	3,49	a 3,68	3,56	a 3,57	3,54	3,51	3,55
9		3,50	3,52	3,49	ab 3,74	3,54	a 3,57	3,54	3,49	3,55
10		3,52	3,53	3,50	ab 3,75	3,56	a 3,60	3,57	3,52	b 3,56
11		3,53	3,56	3,51	a 3,72	a 3,58	a 3,59	3,57	3,52	a 3,58
12		3,53	3,55	3,50	s	a 3,58	ab 3,61	a 3,58	3,52	a 3,59
13		3,53	3,54	3,50		a 3,59	ab 3,62	a 3,59	3,52	ab 3,59
14		3,54	3,54	3,51		ab 3,59	ab 3,63	a 3,60	3,51	a 3,59
15							a 3,59	a 3,58	3,48	3,55
16							a 3,60		3,49	3,55
17							a 3,68	a 3,60	3,52	a 3,60
18							a 3,65	a 3,60	3,50	a 3,60

For 1—3 see Tab. II

IV. Výsledky obsahu laktózy tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků [%] — The results of lactose content in three bulk milk samples treated with different preservatives and analyzed on the MSc 133B apparatus on particular days. The values represent arithmetical means of three samples [%]

Teplota ¹ Konzervace ² Den ³	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	4,96	4,94	4,96	4,90	5,05	4,95	4,94	4,94	4,91	5,05
2	a 4,56	4,95	4,97	4,95	5,07	4,96	4,95	4,97	4,94	5,07
3	s	4,99	4,97	ab 4,97	5,07	4,97	4,96	4,98	b 4,95	5,09
4		4,96	4,94	4,95	5,02	4,94	4,92	4,96	4,93	5,06
5		4,95	4,93	b 4,94	a 4,96	4,92	4,91	4,94	4,92	5,03
6		4,96	4,93	4,95	ab 4,90	4,93	4,91	4,94	4,94	5,05
7		4,95	b 4,92	b 4,95	a 4,79	4,91	4,90	4,93	4,93	5,05
8		4,94	4,92	4,95	a 4,73	4,91 a	4,90 a	4,94	4,93	5,04
9		4,93	4,91	4,94	a 4,63	4,88 a	4,88 b	4,92	4,92	5,02
10		4,91	4,91	4,95	a 4,50	4,87	4,89	4,92	4,93	5,03
11		b 4,91	a 4,87	b 4,94	a 4,42	a 4,85	4,89	4,92	4,92	5,03
12		4,90	a 4,90	ab 4,96	s	a 4,85	4,91	4,93	4,94	5,02
13		a 4,88	a 4,89	4,95		ab 4,81	ab 4,86	4,92	4,94	5,03
14		a 4,85	a 4,85	4,95		ab 4,79	ab 4,86	4,90	4,92	5,02
15							4,90	4,90	4,92	5,02
16							a 4,87	4,90	4,93	5,01
17							b 4,90	4,95	b 4,96	5,05
18							4,89	4,93	4,95	5,04

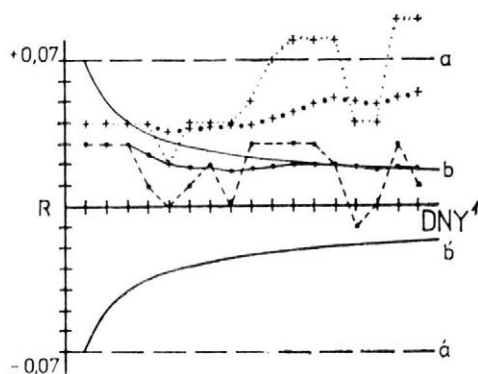
For 1—3 see Tab. II

V. Vyhodnocení pořadí vhodnosti způsobů ošetření vzorků mléka (tj. konzervace a teplota) uvnitř jednotlivých kritérií ($\alpha-\omega$) a celkem — Evaluation of the order of suitability of milk sample treatments (i. e. kind of preservative and storage temperature) within particular criteria ($\alpha-\omega$) and total

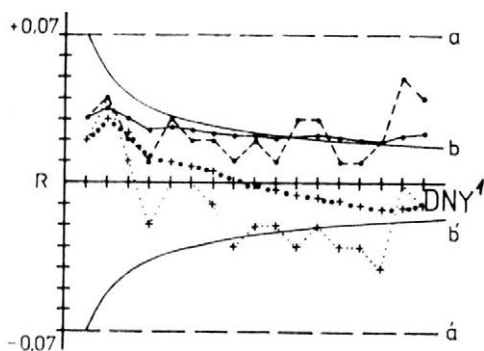
Kritérium ¹	Způsob ošetření vzorků mléka ²									
	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
α	8	2	2	2	7	5	6	3	1	4
β	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1
γ	9	5	2	4	8	6	7	3	1	5
δ	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1
ε	4	1	2	1	3	1	1	1	1	1
κ	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1
ω	10	3	6	2	9	7	8	4	1	5
Celkem ³	9	3	4	2	8	6	7	3	1	5

¹criterion, ²method of milk sample treatment, ³total

α = % diferenciace $> \pm 0,05$ % od referenční hodnoty; β = % diferencií statisticky významných od referenční hodnoty $P < 0,01$; γ = počet dní do první difference $> \pm 0,05$ procenta od referenční hodnoty; δ = počet dní do první statisticky významné $P < 0,01$ difference od referenční hodnoty; ε = počet dní do objevení prvních vloček; κ = počet dní do úplného sražení vzorků; ω = seřazení od nejnižší variability v opakovatelnosti. UNI je objektivní pouze celkové hodnocení a hodnocení α , γ , ε , κ , ω , nikoliv hodnocení v kritériích β a δ , neboť vzorky se srazily již druhý den, zatímco ostatní hodnocení je děláno minimálně za 10 dní — α = percentage of differences $> \pm 0,05$ % from the reference value; β = percentage of statistically significant differences from the reference value $P < 0,01$; γ = number of days till the first difference $> \pm 0,05$ % from the reference value; δ = number of days till the first statistically significant difference $P < 0,01$ from the reference value; ε = number of days till the occurrence of the first flocks; κ = number of days till the total coagulation of samples; ω = order from the lowest variability in repeatability. In the case of N I, overall evaluation and evaluations of α , γ , ε , κ and ω are only objective, this does not apply to the criteria β and δ , because the milk samples showed coagulation as soon as on day 2 while the other evaluations were performed at least in ten days



5. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu bílkovin ve vzorcích konzervovaných M a C při teplotě 4 °C — Control diagram for the values of protein content in M and C treated samples at a temperature of 4 °C



6. Kontrolní diagram pro hodnoty obsahu laktózy ve vzorcích konzervovaných M a C při teplotě 4°C — Control diagramme for the values of lactose content in M and C treated samples at a temperature of 4°C

ZÁVĚR

Preparát Milkofix byl testován pro účely konzervace vzorků při infračervené analýze základního složení mléka. Doby přijatelné k analýze takto konzervovaných vzorků byly 4 dny při teplotě 20°C a 10 dní při teplotě 4°C, což je v souladu s poznatky předcházející studie. Nejlepší výsledky vykázal dvojchroman draselný, 13 dní při teplotě 20°C a 15 dní při teplotě 4°C.

Literatura

- ANONYM: Use of sodium azide for the preservation of milk samples for fat and protein determination with Milko-Scan. Dtsch. Mol. Ztg. 29, 1977, s. 910—911.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. Milchwissenschaft, 34, 1979, s. 14—16.
- BUCHBERGER, J. — WEISS, G. — KIERMEIER, F. — PROBST, A.: Reproduzierbarkeit und Genauigkeit bei Fett-, Eiweiß- und Lactosebestimmung mit Hilfe der Infrarot-Spektrophotometrie (IRMA II — Gerät). Milchwissenschaft, 26, 1971, č. 11, s. 687—693.
- GRAPPIN, R.: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis-application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. IDF Provisional Standard 128, 1985. Bull. of the IDF 208, s. 3—12.
- HANUŠ, O. — BENDA, P. — GENČUROVÁ, V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. Ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. Veter. Med. (Praha), 37, 1992, s.
- HANUŠ, O. — ŽVÁČKOVÁ, I.: Ověření konzervačního prostředku mléka Bronopol pro účely kontroly užítkovosti skotu ve vztahu k infračervené spektrofotometrii. Výzk. v chovu skotu, 1987, č. 4, s. 28—43.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. J. Dairy Sci., 68, 1985, s. 783—787.
- KYLÄ-SIUROLA, A. L. — ANTILA, V.: Determination of fat, protein and lactose in milk by automatic instruments. In: XIX. Int. Dairy Congr. 1E: 479.B.7.
- LORENZ, W. — HOFFER, H.: Testbericht über das halbautomatische Analysengerät Milko-Scan 104. Milchwirt. Berichte, 62, 1980, B.L.28, s. 73—80.
- NG-KWAI-HANG, K. F. — HAYES, J. F.: Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by a modified Pro-Milk Mk II method. J. Dairy Sci., 65, 1982, s. 1895—1899.
- ON 57 0532 Stanovení počtu somatických buněk v mléce, 1980.
- ON 57 0536 Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem, 1980.
- PSL-Microtabs-Milk Preservative Tablets. Technical Bulletin, January 1987. Nottingham — England. San Francisco — USA. Firemní literatura. 1987.

- RENNER, E. — ÖMEROGLU, S.: Untersuchungen über die automatisierte Fett- und Eiweissgehaltsbestimmung in Milch mit dem Infrarot-Milchanalysator (IRMA). Dtsch. Mol. Ztg., 92, 1971, s. 2079—2123.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analyses of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. Acta Agric. Scand., 34, 1984, s. 273—285.
- THOMASOW, J.: Simultanbestimmung des Fett- und Eiweissgehaltes der Milch durch Messung der Infrarotabsorption mit dem Milko-Scan 300. Milchwissenschaft, 31, 1976, č. 3, s. 149—156.
- THOMASOW, J. — PASCHKE, M.: Bestimmung des Fett-, Eiweiss- und Milchzuckergehaltes von Milch durch Messung der Infrarotabsorption mit dem Gerät Multispec. Milchwissenschaft, 36, 1981, č. 2, s. 65—68.
- TRŽICKÝ, V.: Milkofix Forte. Osobní sdělení, 1990.
- VAN DE VOORT, F. R.: Evaluation of Milko-Scan 104 infrared milk analyzer. J. AOAC, 63, 1980, s. 973—980.

Došlo dne 20. 3. 1991

HANUŠ, O. — GENČUROVÁ, V. — ŽVÁČKOVÁ, I. [Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín]: *Tests of Milkofix, a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part II: Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis.* Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 33—43.

For the purposes of the infrared analysis of the basic milk composition, Milkofix, an ecologically friendly preparation used for milk sample preservation (Tržický, 1990), was compared with untreated samples (N) and with samples preserved with sodium azide (A), bronopol (B) and potassium dichromate (C) at a storage temperature of 20 °C (I) and 4 °C (II) in samples kept for 14 and 18 days. Pursuant to the recommendations cited in literature, the preservatives had these concentrations: A = 0.0085 g NaN₃ and 0.0630 g NaCl; B = 0.0050 g bronopol and 0.0500 g NaCl; C = 0.0330 g K₂Cr₂O₇ and 0.0670 g KCl; M = 0.1250 g, all amounts are per 25 ml milk. Three bulk milk samples were used which were analyzed on an automatic Milko-Scan 133 B infraanalyzer (Foss Electric, Denmark) every day. On the basis of a graphical evaluation of the results by IDF recommendations (1985) the times within which the applicable results could be obtained were determined for the various methods of milk sample treatment (Figs. 1 to 6): N I — 0 days; A I — 9; B I — 10; C I — 13; M I — 4; N II — 10; A II — 5; B II — 11; C II — 15; M II — 10 (Tab. I). The results recorded for Milkofix are in agreement with the conclusions drawn in the previous study, where the intervals of four and nine days were determined. The days to milk sample coagulation were as follows: N I — 1 day, M I — 10 days. The coagulation in A I, B I, C I and N II samples was not observed even after 13-day storage and in A II, B II, C II and M II samples not even after 17 days of storage. The results for particular components (fat, proteins, lactose) of milk samples differently treated in time are presented in Tabs. II, III and IV. A system of evaluating criteria (Tab. V) was used to determine the order beginning from the most convenient method of milk sample treatment for the given purpose: 1. C II, 2. C I, 3. B II and A I, 4. B I, 5. M II, 6. N II, 7. A II, 8. M I and 9. N I. That means potassium dichromate had the best preservative efficiency: for 13 days at 20 °C and for 15 days at 4 °C, it can therefore be recommended with preference for the preparation of control (pilot) samples for the Milko-Scan apparatus even though it may be replaced by a less harmful preservative in routine analyses.

milk samples; preservation; infrared analysis; fat; proteins; lactose; sodium azide; bronopol; potassium dichromate; Milkofix

Adresa autorů:

Ing. Oto Hanuš, ing. Václava Genčurová, Iveta Žváčková, Výzkumný ústav pro chov skotu, k. ú. o., Rapotín, 788 13 Šumperk 4

Upozorňujeme čtenáře a zájemce o odbornou zemědělskou literaturu, že Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství ve spolupráci se zemědělským nakladatelstvím Brázda vydává

NAUČNÝ SLOVNÍK ZEMĚDĚLSKÝ

13. díl (písmeno Z)

Publikace je posledním dílem zemědělské encyklopedie, vyjde v rozsahu asi 700 stran, předpokládaná cena je 190 Kčs.

Objednávky na tuto publikaci vyřizuje Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, oddělení naučného slovníku a terminologie, Slezská 7, 120 56 Praha 2.

L. Massanyi, R. Janisch

MASSANYI, L. — JANISCH, R. [Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra; Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno]: *Ultraštruktúra membrán kančích spermií preparovaných mrazovým lomom*. Veter. Med. [Praha], 37, 1992 (1): 45—55.

Cieľom práce bolo opísať topografickú orientáciu intramembranózných partikul (IMP) na membránach čerstvo ejakulovaných kančích spermií metódou mrazového lomu. Na cytoplazmatickej membráne (PF) pokrývajúcej akrozóm sa dali rozlišovať terčikovité zhlukovania IMP. Okraj hlavičky do vzdialenosti asi 0,3 μm sa javil bez prítomnosti IMP. V postakrozomálnej oblasti anteriorne od posteriorného prstenca sa zistili IMP palisádovite usporiadané v šikmých radoch. Štatistickým meraním na 20 spermiách sme zistili, že šikmé rady najďalej siahali na laterálnej časti hlavičky až 0,67 μm ($\pm 1,45-0,39$) od posteriorného prstenca. V strede hlavičky dosahovali vzdialenosť 0,18 μm ($\pm 0,10-0,42$). Miesto prechodu medzi zónou redšie a hustejšie usporiadaných IMP bolo vzdialené 1,63 μm ($\pm 1,87$ až 0,69) anteriorne od posteriorného prstenca. Na bičíku na cytoplazmatickej membráne (PF) miesto začiatku bohatého výskytu IMP zodpovedá umiestneniu prvej mitochondrie v špirále. Zhluky IMP sledujú cirkumferenciálnu orientáciu mitochondrií v mitochondriálnej špirále. V priestoroch medzi závitmi špirály IMP chýbali. Membrány vlastných mitochondrií obsahujú veľa IMP. Táto aktivita sa prenáša na priliehajúcu časť cytoplazmatickej membrány. V mieste, kde cytoplazmatická membrána pokrýva anulus, vidieť väčšie nahromadenie IMP. Na cytoplazmatickej membráne hlavného oddielu IMP sú nepravidelne rozložené na PF, ale aj na EF. EF plochy cytoplazmatickej membrány javili všeobecne nevýrazné štrukturálne usporiadanie IMP. Na akrozomálnych membránach sa pozorovali nepravidelne rozložené IMP. Postakrozomálna pošva v mrazovom lome sa nejavila ako morfológicky identifikovateľná štruktúra. Na jadrovom obale, ohraničujúcom posteriodný nukleárny priestor sa identifikovali jadrové póry. Na jadrovom obale priliehajúcom k posteriornej časti jadra jadrové póry sa nenašli. Sledovali sa tu menšie IMP, ktoré sa môžu považovať za súčasť proteinov filamentov, ktoré spájajú konkávnou plochu hlavičky s konvexnou artikulačnou plochou bičíka. Tieto filamenty utvárajú spojenie hlavičky s bičíkom. Cytoplazmatická kvapka obsahuje veľa membranózných útvarov, tvoriacich stenu vezikulov a cisterien. Jedná sa o membranózne útvary, ktoré sa vylúčia spolu s obsahom cytoplazmatickej kvapky.

kančie spermie; intramembranózne partikuly; cytoplazmatická membrána; mrazový lom

Na cytoplazmatickej membráne pokrývajúcej povrch spermie sa dajú morfológicky, fyziologicky a biochemicky rozlišovať rozdielne oblasti. Tieto sa dajú definovať v súvislosti s bunkovými organelami, ktorými sa

dostáva cytoplazmatická membrána do kontaktu, resp. ich pokrýva (Bedford a Cooper, 1978; Fawcett, 1975; Friend a Fawcett, 1974; Yanagimachi, 1981). Na cytoplazmatickej membráne sa dajú jasne definovať oblasti, resp. úseky, pokrývajúce akrozómovú oblasť hlavičky, postakrozomálnu oblasť hlavičky, stredný (mitochondriálny) a hlavný oddiel bičíka. V jednotlivých oblastiach cytoplazmatická membrána má špecifické funkcie pred a počas procesu oplodnenia.

Okrem cytoplazmatickej membrány na spermii sa ďalej dá rozlíšiť vonkajšia a vnútorná akrozomálna membrána, obklopujúca akrozomálnu hmotu, vonkajšiu a vnútornú jadrovú membránu okolo jadra; membrány tvoria podstatnú súčasť mitochondrií. Hodne membránových štruktúr sa nachádza v obsahu cytoplazmatickej kvapky.

Príprava objektov mrazového lomu pre elektrónový mikroskopiu umožňuje študovať vnútornú organizáciu bunkových membrán. Jej podstata spočíva v štiepení materiálu v zmrazenom stave. Rovina štiepenia prechádza najčastejšie lipoidnou dvojvrstvou, čím sa membrána štiepi na dve časti. Na navonok orientovanej vnútornej časti štiepnej plochy membrány, označovanej ako PF (protoplasmic fracture face) sa dajú študovať partikuly o veľkosti 6—9 nm. Tieto tzv. intramembranózne partikuly (IMP) reprezentujú proteínovú zložku membrány. Na vonkajšej časti membrány, orientovanej smerom dovnútra, označovanej ako EF (exoplasmic fracture face) je partikul obyčajne menej.

V literatúre ultraštruktúra zrelej kančej spermie sa opisuje v prácach autorov Nicander a Bane (1962), Jones (1971) a Massanyi (1990). Štúdiom kančích spermií a ich membrán sa zaoberali zatiaľ iba práce autorov Suzuki a Nagano (1980) a Suzuki (1981).

Cieľom práce bolo opísať topografickú organizáciu intramembranóznych partikul na membránach čerstvo ejakulovaných kančích spermií metódou mrazového lomu s cieľom získať ďalšie podrobné informácie o molekulárnej štruktúre a funkcii jednotlivých membrán kančích spermií vo vzťahu k procesu fertilizácie.

MATERIÁL A METÓDY

K štúdiu sme použili ejakuláty troch plodných kancov s dobrou iniciálnou motilitou, normálnou koncentráciou, získaných pomocou umelej vagíny. Kanci pochádzali z chovnej stanice kancov, ich ejakuláty boli pravidelne odoberané a používané k umelej inseminácii. Ejakuláty sme ihneď po odbere fixovali v 2% roztoku glutaraldehydu vo fosfátovom pufre o pH 7,2 po dobu 2—3 hodín. Potom sa 3× vypierali v rovnakom pufri, ďalej sa ejakuláty presycovali 20% glycerolom po dobu 24 hodín, nakoniec sa zahustili centrifugáciou pri 1000 ot. min⁻¹.

MRAZENIE

Na mosadzné terčíky bola umiestnená pologuľovitá kvapôčka zahustenej suspenzie o priemere asi 1 mm a spolu s terčíkom ponorená na päť sekúnd do tuhnúceho Freónu 22 (—160 °C). Zmrazený materiál sme až do ďalšieho spracovania skladovali v tekutom dusíku.

MRAZOVÝ LOM, POKOVOVANIE

Zmrazená kvapôčka s terčíkom bola umiestnená do Balzersovej aparatury BA 360 M, kde vo vákuu pri teplote —100 °C bola rozlomená. Na rozlomený povrch bola pod uhlom 45° naparená platina a pod uhlom 90° uhlík pre spevnenie budúcej repliky.

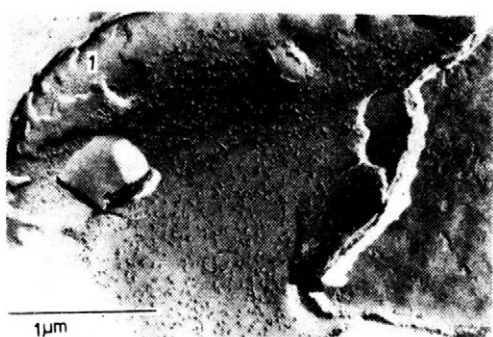
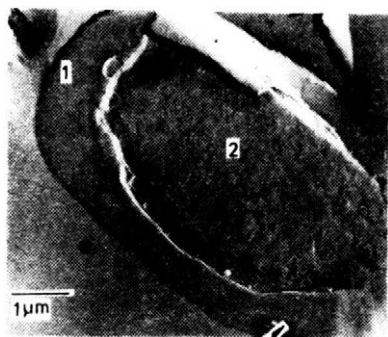
Repliky natiiahnuté na vodnej hladine boli vyprané od zvyškov materiálu 70% kyselinou sírovou a 40% kyselinou chrómovou. Pri interpretácii plôch membrán sme sa pridržiovali systému, ktorý navrhol Branton a i. (1975). Fotografie sme robili na elektrónovom mikroskope Tesla BS 500 a JEM-100 CX II. Úsečky na obrázkoch predstavujú 1 μ m.

Merania na cytoplazmatickej membráne v postakrozomálnej oblasti sa uskutočnili takto: Po prehliadke lomov v tejto oblasti z viac ako 200 objektov sa vybralo 20 najoptimálnejších. Tieto sa odfotografovali a na fotografiách sa merali:

- najvzdialenejšie miesto pokryté palisádovite usporiadanými IMP od posteriorného prstenca,
- vzdialenosť palisádovitého usporiadania IMP od posteriorného prstenca v strede hlavičky v smere dlhej osi hlavičky,
- hranica prechodu zóny s redším výskytom IMP do zóny s hustejším výskytom IMP v smere dlhej osi spermie.

VÝSLEDKY

Na cytoplazmatickej membráne (PF) pokrývajúcej akrozóm sa dali rozlišovať terčíkovite zhlukovania IMP. Okraj hlavičky do vzdialenosti asi 0,3 μ m sa javil bez prítomnosti IMP, alebo sa zisťovali len IMP menších rozmerov (obr. 1, 2). V postakrozomálnej oblasti anteriorne od posterior-

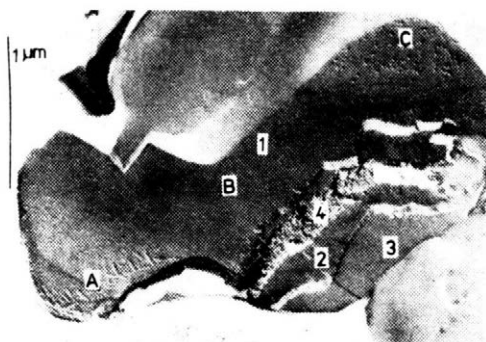
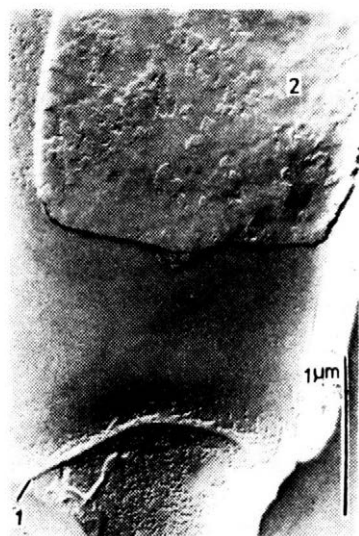


1. Lom zachytávajúci cytoplazmatickú membránu na hlavičke (PF) — 1. IMP sú rozložené po celej anteriornej ploche hlavičky. Distálne, smerom k báze hlavičky vidieť prechod do zóny s redším výskytom IMP (šípka). Okraje hlavičky v úseku asi 0,30 μ m sú bez IMP. 2 — jadrový obal. Šupinovitý vzhľad spôsobuje kaskádovitý lom priestorom dvoch jadrových membrán. Na okraji lomu jadrovou membránou vidieť zvyšky akrozomálnych membrán — Freeze fracturing affecting the plasma membrane in the head (PF) — 1 — The IMP's are distributed along the entire anterior surface of the head. Transition to the zone with the sparse occurrence of IMP's (arrow) can be seen in a distal direction toward the head base. The borders of the head to a distance of about 0.30 μ m do not contain any IMP's. 2 — Nuclear envelope. A scaly appearance is given by the cascade fracturing through the space of two nuclear membranes. The rests of acrosomal membranes can be seen at the border of the fracturing of the nuclear membrane

2. Detail cytoplazmatickej membrány na apikálnej časti hlavičky. Vidieť terčíkovité zhlukovanie IMP, okraje hlavičky sú bez IMP. 1 — vonkajšia akrozomálna membrána (EF) — A detail view of the plasma membrane in the apical part of the head. Disc clusters of IMP's can be seen, the borders of the head do not contain any IMP's. 1 — exterior acrosomal membrane (EF)

ného prstenca sa zistili IMP palisádovite usporiadané v šikmých radoch. Tieto najďalej siahali na laterálnej časti hlavičky, až $0,67 \mu\text{m}$ ($\pm 1,45$ až $0,39$) od posteriorného prstenca. V strede hlavičky dosahovali do vzdialenosti $\bar{x} 0,18 \mu\text{m}$ ($\pm 0,10$ — $0,42$). V radoch usporiadaných IMP sa niekedy dali sledovať aj samostatne uložené IMP. Miesto prechodu medzi zónou redšie a hustejšie usporiadaných IMP bolo vzdialené $\bar{x} 1,63 \mu\text{m}$ ($\pm 1,87$ až $0,69$) anteriorne od posteriorného prstenca (tab. I, obr. 3 a 4).

Na bičíku v centriolárnej oblasti (oblasti krčka) na cytoplazmatickej membráne (PF) tesne za posteriorným prstencom sa dali pozorovať početné, ale neusporiadané IMP, ktoré sú vystriedané zónou bez IMP do vzdialenosti asi $1,4 \mu\text{m}$, potom nasleduje oblasť s bohatým výskytom IMP.



3. Postakrozomálna oblasť hlavičky. 1 — posteriorný prstenec (PP). Anteriorne od neho na cytoplazmatickej membráne (PF) vidieť šikmo orientované palisádovite usporiadané IMP, ktoré na okraji hlavičky siahajú do vzdialenosti $0,40 \mu\text{m}$ a v strede hlavičky do vzdialenosti $0,16 \mu\text{m}$ anteriorne od PP. Samostatné IMP sa dajú tiež pozorovať v tejto zóne. Anteriorne nasleduje zóna s malým počtom IMP, ktorá vo vzdialenosti $1,68 \mu\text{m}$ prechádza do zóny s početnejšími IMP. 2 — jadrový obal — Postacrosomal region of the head. 1 — posterior ring (PP). Slant-oriented palissade structured IMP's can be seen in the plasma membrane (PF) in an anterior direction from PP; the IMP's extend to a distance of $0,40 \mu\text{m}$ at the border of the head and to a distance of $0,16 \mu\text{m}$ in the middle of the head from PP in an anterior direction. In this zone single IMP's can also be seen. In an anterior direction there is a zone with a small number of IMP's which at a distance of $1,68 \mu\text{m}$ passes into the zone with numerous IMP's. 2 — nuclear envelope

4. Lom postakrozomálnou oblasťou hlavičky, zachytávajúci cytoplazmatickú membránu (PF) — 1, na ktorej sa dajú rozoznať tri rôzne zóny podľa usporiadania IMP (A, B, C); 2 — jadrový obal (EF); 3 — cytoplazmatická membrána (EF); 4 — jadro — Fracturing of the postacrosomal region of the head affecting the plasma membrane (PF) — 1, in which three different zones according to the IMP organisation (A, B, C) can be distinguished; 2 — nuclear envelope (EF); 3 — plasma membrane (EF); 4 — nucleus

Meranie č. ¹	Najvzdialenejšie miesto pokryté palisádovite usporiadanými IMP od PP ²	Vzdialenosť palisádovi- tého usporiadania IMP od PP v strede hlavič- ky ³	Hranica prechodu zóny s redším výskytom IMP do zóny s hustejším výskytom IMP ⁴
1	1,03	0,17	0,69
2	1,45	0,17	1,45
3	1,07	0,42	1,50
4	0,69	0,10	1,62
5	0,40	0,14	1,50
6	0,48	0,17	1,38
7	0,52	0,13	1,73
8	0,52	0,40	1,73
9	0,64	0,11	1,78
10	0,88	0,21	1,59
11	0,39	0,16	1,87
12	0,40	0,16	1,81
13	0,40	0,16	1,68
14	0,47	0,10	1,78
15	0,77	0,15	1,69
16	1,04	0,16	1,80
17	0,59	0,12	1,76
18	0,68	0,18	1,73
19	0,63	0,18	1,82
20	0,44	0,17	1,67
$\bar{x}$	0,67	0,18	1,63
Max.	1,45	0,42	1,87
Min.	0,39	0,10	0,69

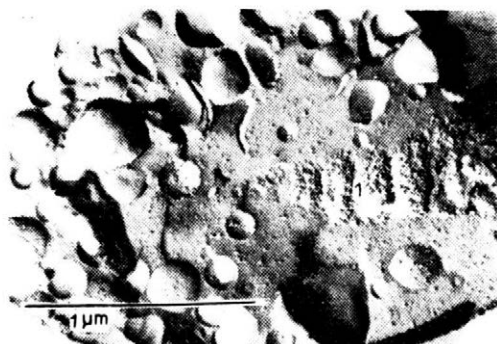
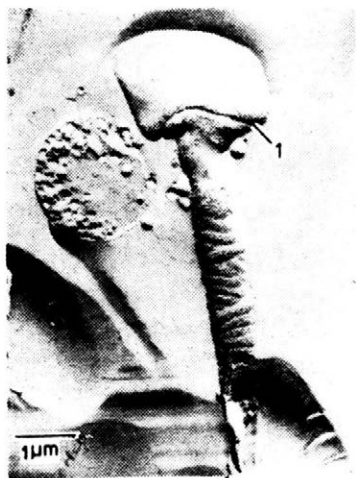
¹measurement no., ²the spot with palissade structured IMP's located at the greatest distance from the posterior ring, ³a distance of the palissade structure of IMP's from PR in the middle of the head, ⁴a border of the transition of the zone with the sparse occurrence of IMP's to the zone with the denser occurrence of IMP's

Miesto začiatku bohatého výskytu IMP zodpovedá umiestneniu prvej mitochondrie v špirále mitochondriálneho oddielu. Zhluky IMP sa formovali v miestach, kde sa mitochondriálna a cytoplazmatická membrána navzájom dostávali do kontaktu. Zhluky IMP sledujú cirkumferenciálnu orientáciu mitochondrií v smere mitochondriálnej špirály. V priestoroch medzi závitmi špirály IMP chýbali. To je miesto, kde nedochádzalo ku kontaktu cytoplazmatickej a mitochondriálnej membrány (obr. 5).

Membrány mitochondrií (obr. 6) sú podľa očakávania veľmi aktívne a preto obsahujú veľa IMP. Táto aktivita sa prenáša aj na priliehajúcu časť cytoplazmatickej membrány. Tento jav sa v literatúre opisuje pod názvom transmembránový efekt (Fawcett, 1975). Výrazne sa prejavuje na mitochondriálnom oddieli kančích spermií.

V mieste, kde cytoplazmatická membrána pokrýva anulus, vidieť väčšie nahromadenie IMP (obr. 7).

Na cytoplazmatickej membráne hlavného oddielu bičíka, ktorý nasleduje za anulom, IMP sú nepravidelne rozložené na PF, ale aj na EF ploche (obr. 8).



5. Na bičiku za posteriornym prstencom vidieť zónu s husto, ale nepravidelne rozloženými IMP. Za ňou nasleduje zóna bez IMP. Asi $1,4 \mu\text{m}$ distálne od PP v mieste, kde u kančích spermíí začína mitochondriálna špirála vidieť výrazné zhlukovanie sa IMP. Zhluky IMP sa tvoria na tých miestach, kde sa dostávajú do priameho kontaktu cytoplazmatická membrána s membránou mitochondrií. Na rozhraní jednotlivých mitochondrií IMP chýbajú. Takto sa stáva viditeľné uloženie jednotlivých mitochondrií v špirále. Obrázok zachytáva cytoplazmatickú membránu (PF); 1 — posteriorný prstenec — A zone with dense, but irregularly distributed IMP's can be seen in the flagellum behind the posterior ring. This zone is followed by a zone without IMP's. Marked clusters of IMP's can be found at a distance of about $1.4 \mu\text{m}$ in a distal direction from PP at the spot where in boar spermatozoa the mitochondrial spiral begins. The IMP clusters are formed at such spots where the plasma membrane and the mitochondrial membrane come into a direct contact. The IMP's are missing at the boundary of individual mitochondria. In this way the positions of individual mitochondria in the spiral become visible. The plasma membrane (PF) is seen in the photo; 1 — posterior ring

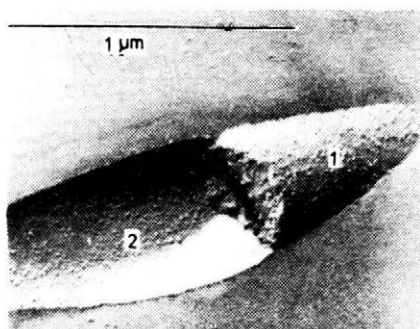
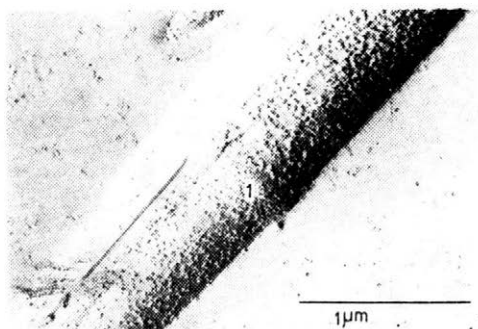
6. Replika lomu mitochondriálnou špirálou. 1 — zhluky IMP na vonkajšej mitochondriálnej membráne. Mitochondriálna membrána je obkolesená cytoplazmatickou kvapkou — Replication of the fracturing of the mitochondrial spiral. 1 — IMP clusters in the exterior mitochondrial membrane. The mitochondrial membrane is surrounded by the cytoplasmic droplet

EF plochy cytoplazmatickej membrány javili všeobecne nevýrazne štruktúrne usporiadanie IMP, najčastejšie boli hladké.

Na akrozomálnych membránach sa pozorovali nepravidelne rozložené IMP.

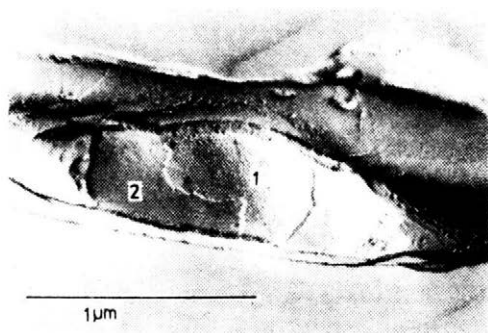
Postakrozomálna pošva v mrazovom lome sa nejavila ako morfológicky identifikovateľná štruktúra.

Jadrový obal v mrazovom lome prejavoval šupinovitý vzhľad, ako dôsledok priebehu lomu časťami vonkajšej a vnútornej jadrovej membrány (obr. 3). Na jadrovom obale, ohraničujúcom posteriorný nukleárny prie-



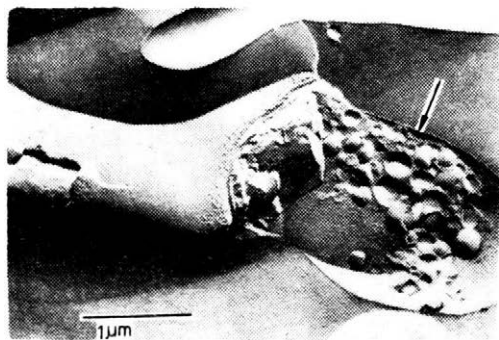
7. Anulus (1) nasadá na distálny koniec mitochondriálnej špirály, je to miesto prechodu mitochondriálneho do hlavného oddielu bičíka. Na cytoplazmatickej membráne (PF) v oblasti anula je viac IMP — The annulus (1) is attached to the distal end of the mitochondrial spiral, this is a spot of the transition of the mitochondrial segment to the main segment of the flagellum. There are numerous IMP's in the plasma membrane (PF) in the annulus region

8. Hlavný oddiel bičíka. IMP sú nepravidelne rozložené tak na PF (1) ako aj na EF (2) ploche cytoplazmatickej membrány — The main segment of the flagellum. The IMP's are distributed irregularly on the PF (1) and EF (2) surfaces of the plasma membrane

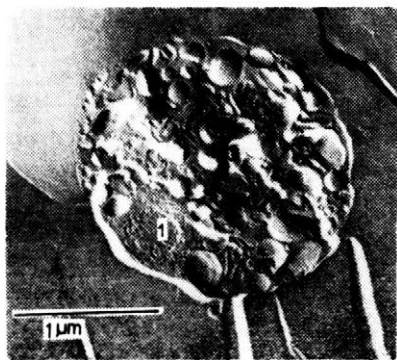


9. Jadrové póry na prebytočnej jadrovej membráne (šípky) — Nuclear pores in the surplus nuclear membrane (arrows)

10. Báza hlavičky. 1 — jadrový obal ohraničujúci implantačnú jamu. Vonkajšiu časť jadrového obalu tvorí tzv. bazálna platňa. Na nej sa nachádzajú IMP menších rozmerov, ktoré sa považujú za súčasť proteinov filamentov, ktoré spájajú konkvávnú plochu hlavičky s konvexnou artikulačnou plochou bičíka. 2 — priliehajúca časť artikulačnej plochy bičíka — The head base. 1 — the nuclear envelope surrounding the implantation pit. The exterior part of the nuclear envelope is formed by the so called basal plate. In this plate there are small IMP's which are considered as a part of proteins of the filaments which connect the concave surface of the head with the convex articular surface of the flagellum. 2 — the clinging part of the articular surface of the flagellum



11. Cytoplazmatická kvapka v proximálnej ploche pred jej premiestnením do oblasti anula (šípka). V jej obsahu rozoznať skupinu membránových štruktúr — The cytoplasmic droplet on the proximal surface before it passes to the annulus region (arrow). There is a group of membrane structures in the droplet contents



12. Lom cytoplazmatickou kvapkou; dá sa rozoznať excentricky uložený bičik (1). Jej obsah tvoria vezikuly a cisterny — Fracturing of the cytoplasmic droplet; the eccentrically located flagellum can be discerned (1). Vesicles and cisterns form its contents

stor, ako na jedinej časti jadrového obalu sa identifikovali jadrové póry (obr. 9). Jedná sa o tú časť jadrovej membrány, ktorá siaha do oblasti centriolárneho oddielu, vo forme záhybov. Jadrový obal po vydaní záhybov sa opäť vracia späť do oblasti kondenzovaného jadrového chromatinu na posteriornej časti jadra a pokrýva posteriornu plochu jadra. V tejto oblasti jadrové póry nie sú viditeľné. Dajú sa na nej sledovať menšie IMP, ktoré sa môžu považovať za súčasť proteínov tvoriacich filameny, ktoré spájajú konkávnú plochu hlavičky s konvexnou artikulárnou plochou bičíka, vytváranú kapitulom. Tieto filameny sú zodpovedné za spojenie hlavičky s bičíkom spermie (obr. 10).

Cytoplazmatická kvapka obsahuje veľa membránových útvarov (obr. 11), tvoriacich stenu vezikulov a cisterien. Tieto útvary sú dobre rozpoznateľné v lome cytoplazmatickou kvapkou (obr. 12). Jedná sa o časť membrán, ktoré nie sú potrebné a vylúčia sa spolu s obsahom cytoplazmatickej kvapky. Ide o zbytok vezikúl Golgiho komplexu, cisterien endoplazmatického retikula a snáď aj mikrotubulov, ktoré boli funkčné počas spermatogenézy.

DISKUSIA

V súčasnosti sa vie dosť málo o význame poznatkov o rozdielnej frekvencii výskytu IMP a ich relácií k procesu fertilizácie. K významnému pokroku v tejto oblasti prispievajú práce autorov Suzuki a Nagano (1980), Suzuki (1981) a Suzuki a Yanagamachi (1986), v ktorých sa demonštrujú zmeny v uložení IMP počas pasáže kančích a škrečkových spermií prísemenníkmi. Palisádovité rady IMP sa formujú

počas prechodu spermii hlavou prísemenníka a postupne sa zvyšuje ich denzita na postakrozomálnej oblasti. V našej práci sme študovali IMP na membránach ejakulovaných spermii, kde rozloženie IMP je už stabilizované.

Zvláštna pozornosť sa venuje IMP na cytoplazmatickej membráne na postakrozomálnej oblasti, pretože v tejto oblasti dochádza k prvým kontaktom a začiatku fúzie spermie s vajíčkom. Koehler (1966, 1970, 1972), Flechon (1974), Ollsen a i. (1983), Massanyi a Janisch (1989) na tejto oblasti hlavičky rozoznávajú dve suboblasti podľa usporiadania IMP. Jednu pokrývajú palisádovite usporiadané IMP a na druhej sú IMP rozložené nepravidelne po celej ploche.

V porovnaní s býčimi spermiami (Massanyi a Janisch, 1989) palisádovité usporiadanie IMP na kančích spermiiach javí rozdielnosť jednak v šikmom priebehu, oproti priamo prebiehajúcich radov u býčích spermii. Rozdiely sú tiež v ploche, ktorú palisádovite usporiadané IMP pokrývajú. U kanca je táto plocha oveľa menšia a siaha $\bar{x}$ 0,67 μm na okraji a $\bar{x}$ 0,18 μm v strede hlavičky anteriorne od posteriorného prstenca.

Oproti predošlým poznatkom sa anteriorne od palisádovitých línii IMP opisujú dve rozdielne usporiadania IMP. Je to oblasť chudobnejšia na IMP, ktorá siaha až $\bar{x}$ 1,63 μm anteriorne od posteriorného prstenca, táto je postupne vystriedaná oblasťou bohatšou na IMP. Na jej okrajoch sa IMP strácajú.

Poukázali sme na rozdiely zistené v rozložení IMP na cytoplazmatickej membráne (PF) kančích a býčích spermii. Ak frekvencia IMP je v korelácii s metabolickou aktivitou membrán, tak sa dá usúdiť, že metabolická aktivita cytoplazmatickej membrány (PF) u kančích a býčích spermii sa líši. Je to zatiaľ jediná medzidruhová diferenciacia morfológicky zistená na hlavičke spermii v postakrozomálnej oblasti. Tento nález sa môže použiť ako argument k vysvetleniu existujúcej inkompability spermii jedného druhu s vajíčkom iného druhu zvierat.

Posteriorný prstenec je miesto pevnej fúzie cytoplazmatickej membrány s jadrovým obalom. Je dobre definovateľný v preparátoch spracovaných mrazovým lomom. Fúziou membrán sa oddeľujú od seba kompartmenty hlavičky a bičíka. Ide o dôležitý mechanizmus, význam ktorého spočíva v zachovaní pohyblivosti spermii aj po rozpadnutí sa cytoplazmatickej a vonkajšej akrozomálnej membrány počas akrozomálnej reakcie. Pohyblivosť spermii je potrebná pre uskutočnenie fertilizácie. Táto sa zastavuje pri akomkoľvek narušení cytoplazmatickej membrány. Palisádovitému usporiadaniu IMP, ktoré je lokalizované v blízkosti posteriorného prstenca sa prisudzuje účasť na zosilnení opisovanej fúzie membrán. Podľa morfológicky zistených rozdielností vo formovaní palisádovite usporiadaných línii IMP, ako aj rozdielnej plochy, ktorú pokrývajú, dá sa predpokladať rozdielnosť v mechanizme, resp. v pevnosti tohoto uzáveru u býka a kanca.

Jadrové póry boli identifikované na prebytočnej jadrovej membráne v podobnej štruktúre a lokalizácii, ako sa zistili na býčích spermiiach. Zatiaľ o inej funkcii, ako o možnej ceste prenosu RNA z jadra do cytoplazmy, sa neuvažovalo.

Na bičíku sa nenašli podstatné rozdiely v usporiadaní IMP oproti býčim spermiiam. Treba upozorniť na výraznejší transmembranózny efekt na mitochondriálnom oddieli a chýbanie IMP v oblasti krčka, čo korešpon-

duje s ultraštruktúrnymi poznatkami, že začiatok mitochondriálnej špičky u kančích spermíí je posunutý za oblasť krčka (N i c a n d e r a B a n e, 1962).

Literatúra

- BEDFORD, J. M. — COOPER, G. W.: In: NICOLSON, G. L. — POSTE, G. (eds): Membrane fusion. Elsevier, North-Holland, New York, 1978, s. 65—125.
- BRANTON, D. — BULLIVANT, S. — GILULA, N. B. — KARNOVSKY, M. J. — MOOR, H. — MÜHLENHALER, K. — NOTHCONE, D. T. — PACKER, L. — SATIR, B. — SATIR, P. — SPETH, V. — STAEHLIN, L. A. — STEERE, R. L. — WEINSTEIN, R. S.: Freeze-etching nomenclature. *Science*, 190, 1975, s. 54—56.
- FAWCETT, D. W.: The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.*, 44, 1975, s. 394—436.
- FLECHON, J. E.: Freeze fracturing of rabbit spermatozoa. *J. Microsc. (Paris)*, 19, 1975, s. 59—64.
- FRIEND, D. S. — FAWCETT, D. W.: Membrane differentiation in freeze fractured mammalian sperm. *J. Cell. Biol.*, 63, 1974, s. 641—664.
- JONES, R. C.: Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 13, 1971, s. 51—64.
- KOEHLER, J. K.: Fine structure observations of frozen-etched bovine spermatozoa. *J. ultrastruct. Res.*, 16, 1966, s. 359—375.
- KOEHLER, J. K.: A freeze etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structure. *J. ultrastruct. Res.*, 33, 1970, s. 598—615.
- KOEHLER, J. K.: Human sperm head ultrastructure. A freeze etching study. *J. ultrastruct. Res.*, 39, 1972, 520—539.
- MASSANYI, L.: Ultraštruktúrne aspekty kančej spermie. *Acta zootechn. Univ. Agric. (Nitra)*, 49, 1990, s. 1—11.
- MASSANYI, L. — JANISCH, R.: Ultraštruktúra membrán býčích spermíí preparovaných mrazovým leptaním. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989, č. 4, s. 213—222.
- NICANDER, L. — BANE, A.: Fine structure of boar spermatozoa. *Z. Zellforsch.*, 57, 1962, s. 390—405.
- OLSON, G. E. — NOLAND, T. D. — WINFREY, V. P. — GARBERS, D. L.: Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J. ultrastruct. Res.*, 85, 1983, s. 204 to 218.
- SUZUKI, F.: Changes in intramembranous particles distribution in epididymal spermatozoa of the boar. *Anat. Rec.*, 199, 1981, s. 361—376.
- SUZUKI, F. — NAGANO, T.: Epididymal maturation of rat spermatozoa studied by thin sectioning and freeze fracturing. *Biol. Reprod.*, 22, 1980, s. 1219—1231.
- SUZUKI, F. — YANAGIMACHI, R.: Membrane changes in Chinese Hamster spermatozoa during epididymal maturation. *J. ultrastruct. Res.*, 96, 1986, s. 91—104.
- YANAGIMACHI, R.: In: MASTROIANNI, L. — BIGGERS, J. D. (eds): Fertilization and embryonic development *in vitro*. Plenum, New York, 1981, s. 81—182.

Došlo dňa 26. 2. 1991

MASSANYI, L. — JANISCH, R. (University of Agriculture, Nitra; Faculty of Medicine of Masaryk University, Brno): *The ultrastructure of boar spermatozoon membranes treated with freeze fracturing*. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992 (1): 45—55.

The objective of the present paper was to describe the topographic orientation of intramembranous particles (IMP) in the membranes of freshly ejaculated boar spermatozoa applying the method of freeze fracturing. Disc clusters of IMP's could be distinguished in the acrosome-covering plasma membrane (PF). The border of the head to a distance of about 0.3 μm seemed to contain no IMP's (Figs. 1, 2). In the postacrosomal region in an anterior direction from the posterior ring the IMP's were found to be arranged in palissade slant rows. Statistical measurements of 20 spermatozoa (Tab. I) indicated that the slant rows extended to the greatest distance in the lateral part of the head, up to 0.67 μm ($\pm 1.45-0.39$) from the posterior ring. In the middle of the head the rows extended to a distance of 0.18 μm ($\pm 0.10-0.42$). The transition spot between the zone of sparse IMP's and the zone of densely arranged IMP's was at a distance of 1.63 μm ($\pm 1.87-0.69$) in an anterior direction from the posterior ring (Figs. 3, 4).

In the flagellum in the plasma membrane (PF) the first spot of an ample occurrence of IMP's is located in the first mitochondrion in the spiral. The IMP clusters follow the circumferential orientation of mitochondria in the mitochondrial spiral. The IMP's were missing in the spaces between the spiral coils (Fig. 5). The membranes of the mitochondria contain a large amount of IMP's. This activity is transferred to the clinging part of the plasma membrane (Fig. 6). A larger accumulation of IMP's can be seen at the spot where the plasma membrane covers the annulus (Fig. 7). In the plasma membrane of the main segment of the flagellum the IMP's are distributed irregularly in PF, and also in EF (Fig. 8). The EF surfaces of the plasma membrane had in general an indistinct structural organisation of IMP's. The distribution of IMP's in acrosomal membranes was found to be irregular. The postacrosomal lamina in the freeze fracturing did not look like a morphologically identifiable structure. In the nuclear envelope delimiting the posterior nuclear space, nuclear pores could be identified (Fig. 9). No nuclear pores could be seen in the nuclear envelope clinging to the posterior part of the nucleus. At this spot smaller IMP's were observed which could be a part of the proteins of the filaments connecting the concave surface of the head with the convex articular surface of the flagellum. These filaments connect the head and the flagellum (Fig. 10). The cytoplasmic droplet contains a large amount of membraneous formations (Fig. 11) which build the wall of vesicles and cisterns. These are membraneous formations which have been eliminated with the contents of the cytoplasmic droplet.

boar spermatozoa; intramembraneous particles; plasma membrane; freeze fracturing

Adresy autorov:

Doc. MVDr. ing. Ladislav Massanyi, DrSc., Vysoká škola poľnohospodárska,
949 79 Nitra

Doc. MUDr. Rudolf Janisch, DrSc., Biologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy
Univerzity, Joštova 10, 662 43 Brno

**KRITÉRIA, PODLE KTERÝCH SE ROZHODUJE O ZAŘAZENÍ VĚDECKÝCH
ČASOPISŮ DO CURRENT CONTENTS**

(E. Garfield: Current Comments, 28, 1990, s. 5—13)

1. Citovanost publikovaných článků

- Celkový počet citací článků
- Závažnost (impact) časopisu; hodnotí se indexem (I)

$$I = \frac{\text{počet citací časopisu v určitém roce}}{\text{celkový počet prací zveřejněný v časopise v předcházejících dvou letech}}$$

2. Internacionálnost časopisu

- podle státní příslušnosti prvního autora
- podle státní příslušnosti autorů, kteří citovali články publikované v časopise

3. Vydavatelská úroveň

- Včasnost a pravidelnost vydávání
- Délka období od dodání rukopisu po zveřejnění
- Dodržování mezinárodních vydavatelských pravidel
 - informativnost titulu časopisu
 - dostatečně popisné tituly článků
 - úplné bibliografické informace citované literatury
 - plné adresy autorů, včetně čísel telefonů a faxů
- Jazyk, ve kterém je časopis vydáván, dostatečně informativní abstrakt nebo souhrn v angličtině, u neanglicky psaných článků je nezbytný
- Kvalita článků
 - spolehlivost metodiky
 - originalita výsledků
 - úplnost literatury (zda autoři citují široký rozsah významných časopisů)
- Vědecká kvalita autorů i členů redakční rady
 - jak často publikují
 - ve kterých časopisech publikují
 - zda jsou jejich práce citovány

VYŠETROVANIE PROTILÁTKOVI PROTI INFEKČNEJ BRONCHITÍDE HYDINY METÓDAMI ELISA, HIT A AGPT

J. Zajac, L. Novotná, L. Lopašovský

ZAJAC, J. — NOVOTNÁ, L. — LOPAŠOVSKÝ, L. [Bioveta, Nitra]: *Vyšetrovanie protilátok proti infekčnej bronchitíde hydiny metódami ELISA, HIT a AGPT*. Veter. Med. (Praha), 37, 1992 (1): 57—63.

Vo veku 21 dní sme kurčatá vakcinovali vírusom infekčnej bronchitídy (IB) H 120 a po skupinách za tri týždne infikovali, resp. revakcinovali vírusom IB M 41, D 274 a H 120. Metódami ELISA a hemaglutinačno-inhibičným testom (HIT) sme vyšetrovali hladiny špecifických protilátok proti antigénom pripraveným z homológnych a heterológnych vírusov IB. Výsledky dokumentujú sérotypovú špecifickosť HIT, ktorá bola výrazná najmä po primovakcinácii a dva týždne po infekcii. Dynamika protilátok pri vyšetrení ELISA mala u jednotlivých skupín kurčiat analogický priebeh a medzi hodnotami stanovenými pomocou rozdielnych antigénov sme podstatné diferencie nezistili. Agar-gélovým precipitačným testom (AGPT) a ELISA sme vyšetřili 52 skupinových vzoriek po 10 kusov slepačieho séra. Výsledok AGPT sme hodnotili percentom vzoriek s precipitačnou aktivitou v skupine. Precipitačná aktivita bola limitovaná stupňom pozitívnej reakcie ELISA. Dosiahnuté výsledky svedčia pre to, že ELISA je metóda voľby pri hodnotení úrovne protilátok proti vírusu IB u hydiny.

infekčná bronchitída hydiny; ELISA; hemaglutinačno-inhibičné protilátky; precipitačné protilátky

Stanovenie špecifických protilátok proti vírusovým antigénom poskytuje cenné informácie o úrovni humorálnej imunity v populácii hydiny a často býva nepriamym dôkazom infekcie. Pri sérologickom prieskume infekčnej bronchitídy a kontrole vakcínovaných chovov na našom území použil Černík (1972) agar-gélový precipitačný test. Metóda AGPT, ako ju opísali Lohr (1976) a Doi a i. (1982) je séro skupinovo špecifická a obmedzená na úrovni kvalitatívneho, prípadne semikvantitatívneho hodnotenia výsledkov. Pri kvantitatívnom hodnotení protilátok sa používal dlhú dobu nákladný a pracný neutralizačný test na kuracích zárodkoch, ako ho opísal Černík (1972) a Jones (1976). V snahe o racionalizáciu metódy vypracovali Wilcox a i. (1983) modifikáciu neutralizačného testu na kultúrach kuracích obličkových buniek a Snyder a i. (1983) na orgánových rezoch kuracích tracheí. Metódy boli realizované v mikromodifikácii na mikropatlňach, vykazovali vysokú citlivosť a špecifickosť. Problém rýchlej a nenáročnej sérologickej diagnostiky infekčnej bronchitídy sa pokúsili vyriešiť Alexander

a i. (1983), ktorí štandardizovali metódu hemaglutinačno-inhibičného testu. Pretože vírus infekčnej bronchitídy nevyvoláva spontánnu aglutináciu erythrocytov, je nevyhnutná účinná preparácia fosfolipázou C za definovaných podmienok (Faragher, 1987). Takto pripravený antigén aglutinuje kuracie erythrocyty a hemaglutinácia je inhibovaná špecifickou protilátkou podľa podmienok reakcie (King, 1988). Sérotypovú špecifickosť neutralizačného a hemaglutinačno-inhibičného testu dokumentovali Gelb a Killian (1987). Kvantifikáciu protilátok proti infekčnej bronchitíde nepriamym testom ELISA v skúmavkovej modifikácii opísali Marquardt a i. (1981). Následne modifikovali metódu na mikrotitračných platničkách Snyder a i. (1983) a podmienky reakcie optimalizovali Case a i. (1983). Štandardizovaniu techniky venovali pozornosť Zellen a Thorsen (1986). Všetci uvádzaní autori sa zhodujú v tom, že ELISA je citlivá, špecifická a pohodovú metóda na kvantifikáciu protilátok proti infekčnej bronchitíde.

V predloženej práci dokumentujeme základné rozdiely medzi ELISA a hemaglutinačno-inhibičným, resp. agar-gélovým precipitačným testom, ktoré sú zjavné pri vyšetrovaní protilátok proti infekčnej bronchitíde hydiny.

MATERIÁL A METÓDY

Vírusový materiál. Na vakcináciu a infekciu kurčiat, ako aj na prípravu antigénov pre ELISA a HIT sme použili nasledovné vírusy infekčnej bronchitídy:

1. vakcinačný kmeň vírusu IB, H 120, typu Massachusetts;
2. virulentný kmeň vírusu IB, M 41, typu Massachusetts;
3. variantný kmeň vírusu IB, D 274.

Vírusový materiál sme pomnožovali podľa Černíka (1972) inokulovaním do SPF kuracích zárodkov na desiaty deň inkubácie a pre ďalšie spracovanie sme selektovali alantoamniové tekutiny s obsahom najmenej 10^9 EID₅₀ vírusu v mililitri.

Nepriamy test ELISA sme robili technikou podľa Zajaca a Novotnej (1991); vírusové antigény sme pripravili koncentrovaním z alantoamniových tekutín a purifikovaním v sacharózovom gradiente ultracentrifugáciou a ako kontrolu reakcie sme použili negatívne sérum SPF kurčiat a pozitívne sérum nosíc infikovaných vírusom infekčnej bronchitídy. Reakciu sme odčítali spektrofotometrom a stupeň ELISA pozitivity stanovili pomocou programu LIMIT na prístroji Minireader II fy Dynatech.

Hemaglutinačno-inhibičný test v mikrotitračných platniach s jamkami U fy Dynatech sme robili technikou, ktorú opísal King (1988). Hemaglutinačné antigény sme pripravili pomocou fosfolipázy C fy Sigma, metodickým postupom podľa autorov Lashgari a Newman (1982).

Agar-gélový precipitačný test sme robili podľa Černíka (1972) pomocou antigénu pripraveného z chloriolantoických blán kuracích embryí infikovaných vírusom IB, M 41, ako to opísal Salaj a i. (1988).

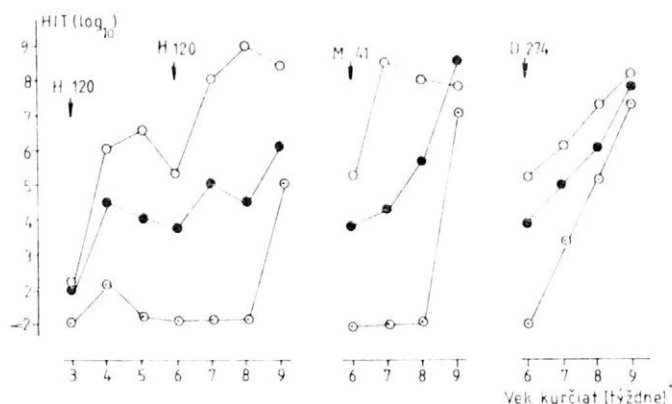
Vyšetrovaný materiál. Kurčatá hybridu Shaver Starcross 288 z konvenčného chovu sme od prvého dňa života držali v izolácii a vo veku 21 dní vakcinovali vírusom IB H 120. Krátko pred vakcináciou, vo veku 28, 35 a 42 dní, sme vždy desať kurčiat vykŕvili. Vo veku 42 dní sme kŕdeľ rozdelili na tri skupiny:

1. skupinu sme očkovali vírusom IB H 120;
2. skupinu sme infikovali vírusom IB M 41;
3. skupinu sme infikovali vírusom IB D 274.

Infekčný materiál s obsahom asi 10^6 EID₅₀ vírusu v 1 ml sme kurčatám aplikovali intrakonjunktívne po 0,05 ml. Vo veku 49, 56 a 63 dní sme vždy desať kurčiat z každej skupiny vykŕvili. Vo všetkých vzorkách krvného séra sme vyšetrovali metódou ELISA a HIT protilátky proti antigénom pripraveným z jednotlivých kmeňov vírusu IB.

Za účelom porovnávania metódy ELISA a AGPT pri stanovení protilátok proti vírusu IB sme vyšetrovali súbor 54 skupinových vzoriek séra, ktoré pochádzali od hydiny rozdielnych plemien a vekových kategórií. Každú skupinu predstavovalo 10 sér z jedného odberu v kŕdli rovnakého plemena, hybridu a veku.

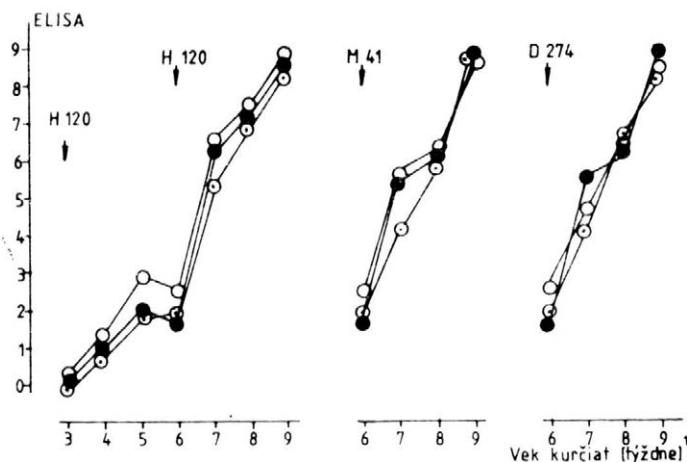
Na obr. 1 je znázornená dynamika titrov HI—protilátok v sérach kurčiat vakcínovaných vírusom IB H 120 a revakcínovaných rovnakým vírusom, alebo infikovaných vírusmi IB M 41 a D 274. Z výsledkov vyšetrovania vyplýva, že najvyššie titre HI—protilátok sme stanovili u kurčiat vakcínovaných a revakcínovaných vírusom IB H 120, pri vyšetrovaní hemaglutinačným antigénom z homológneho kmeňa IBV H 120. Ich dynamika mala vzostupný charakter dva týždne po vakcinácii, pričom stanovené hodnoty dosahovali v priemere $6,5 \log_2$. Po revakcinácii, ktorá sa uskutočnila v období protilátkovej regresie, sme zaznamenali v intervale troch týždňov opätovný vzostup HI—titrov na $9,3 \log_2$. Dynamika protilátok stanovená v rovnakej skupine hemaglutinačným antigénom vírusu IB M 41 bola menej výrazná; po vakcinácii dosahovali hodnoty najviac $4,2 \log_2$ a po revakcinácii $6 \log_2$. Pri vyšetrovaní uvedených sér antigénom vírusu IB D 274 sme zistili krátkodobý, kvantitatívne nevýrazný vzostup HI—titrov protilátok týždeň po vakcinácii a ďalší za tri týždne po revakcinácii, kedy vystúpili sledované hodnoty v priemere na $4 \log_2$. Po infekcii kurčiat vírusom IB M 41 sme pomocou hemaglutinačného antigénu z kmeňa IBV H 120 zaznamenali v intervale prvých dvoch týždňov výrazný vzostup a následne mierny pokles protilátok. Naproti tomu dynamika stanovená v týchto sérach hemaglutinačným antigénom vírusu IB M 41 mala po celý čas progresívny charakter. Titre HI—protilátok stanovené v rovnakých sérach antigénom vírusu IB D 274 vystúpili z podprahových hodnôt na $5,7 \log_2$ len posledný týždeň po infekcii. Po infekcii kurčiat vírusom IB D 274 sme zaznamenali pomocou antigénov vyrobených z jednotlivých vírusov IB,



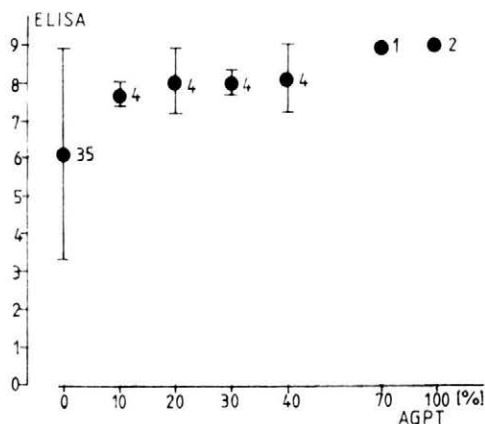
1. Titre hemaglutinačnoinhibičných protilátok, stanovené pomocou rozdielnych antigénov v sérach kurčiat vakcínovaných vírusom IB H 120 (○) a po skupinách revakcínovaných rovnakým, alebo infikovaných rozdielnymi vírusmi IB M 41 (●) a D 274 (⊙) — The titres of haemagglutination-inhibition antibodies determined on the basis of different antigens in the serums of chicks vaccinated with IB H 120 (○) virus and revaccinated with the same virus by the groups, or infected with the viruses IB M 41 (●) and D 274 (⊙)

vo všetkých prípadoch progresívnu dynamiku protilátok; HI—titre pritom dosahovali pri stanovení antigénmi vírusov IB H 120 $8 \log_2$, M 41 $7,8 \log_2$ a D 274 $6,2 \log_2$.

Medzi hodnotami ELISA, ktoré sme stanovili pri jednotlivých skupinách vzoriek pomocou rozdielnych antigénov, neboli výrazné rozdiely (obr. 2). Prvé dva týždne po vakcinácii kurčiat vírusom IB H 120 mala dynamika protilátok stúpajúci charakter, pričom najvyšší priemerný stupeň pozitivity 3 sme zistili v reakcii s antigénom vírusu IB H 120. Odpovedajúce hodnoty ELISA stanovené pri antigénoch vírusov IB M 41 a D 274 boli 1,5 a 2. Po revakcinácii sme pozorovali tri týždne trvajúci výrazný vzostup protilátok. Analogický obraz sme zaznamenali aj v skupinách kurčiat, ktoré boli infikované vírusmi IB M 41 a D 274.



2. Hodnoty ELISA protilátok, stanovené pomocou rozdielnych antigénov v sérach kurčiat vakcinovaných vírusom IB H 120 (○) a po skupinách revakcinovaných rovnakým, alebo rozdielnymi vírusmi IB M 41 (●) a D 274 (⊙) — The ELISA values of antibodies determined on the basis of different antigens in the serums of chicks vaccinated with the IB H 120 (○) virus and revaccinated with the same virus by the groups, or with the viruses IB M 41 (●) and D 274 (⊙)



3. Priemerné hodnoty ELISA so smerodajnou odchýlkou, stanovené pri skupinách sér s rozdielnym percentom precipitačnej aktivity proti infekčnej bronchitíde — The average values of ELISA with the standard deviations, determined for the groups of serums with different percentages of precipitin activity against infectious bronchitis

Bez ohľadu na typ použitého antigénu sa na tretí týždeň po revakcinácii, alebo infekcii pohybovali stanovené hodnoty ELISA v rozsahu najvyšších stupňov pozitivity 8 a 9.

Metódou ELISA a AGPT sme vyšetrili 52 skupinových vzoriek slepačieho séra, pričom každú skupinu reprezentovalo 10 sér. Výsledky AGPT sme hodnotili pri jednotlivých skupinách semikvantitatívne percentom vzoriek s precipitačnou aktivitou. Na obr. 3 sú vyznačené aritmetickým priemerom so smerodajnou odchýlkou výsledky ELISA, stanovené pri skupinách sér s rozdielnym percentom precipitačnej aktivity.

DISKUSIA

Cieľom laboratórneho experimentu bolo pripraviť vhodný materiál na porovnanie sérotypovej špecifickosti ELISA reakcie a HI—testu. Za týmto účelom sme kurčatá z konvenčného chovu po očkovaní klasickým vakcinačným vírusom IB H 120 po skupinách revakcinovali alebo infikovali rozdielnymi vírusmi IB. Pri jednotlivých skupinách sme vyšetrovali hladinu špecifických protilátok proti antigénom pripraveným z homologných a heterológnych vírusov IB, ktoré boli použité na infekciu kurčiat. Dosiahnutými výsledkami sme dokumentovali sérotypovú špecifickosť HI—testu, na ktorú poukázali už Gelb a Killian (1987) a Kaufhold a i. (1988). Bolo to preukázané pri vyšetrovaní sér získaných po primovakcinácii kurčiat vírusom IB H 120, v ktorých sme zaznamenali najvyššie titre HI—protilátok pomocou antigénu z homologného vírusu IB, oproti titrom HI—protilátok dosahovaným pri vyšetrení antigénmi z heterológnych vírusov IB. Bolo to zjavné aj pri skupinách kurčiat, ktoré sme očkovali vírusmi IB typu Massachusetts, M 41 a H 120. Titre HI—protilátok v týchto sérach mali analogický priebeh, na rozdiel od titrov, ktoré sme namerali v sérach kurčiat infikovaných vírusom IB D 274. Najvyššie rozdiely medzi titrami HI—protilátok stanovenými pomocou rozdielných antigénov boli 7 a 14 dní po infekcii a potom dochádzalo k ich vyrovnaniu. Pri použití analogických kmeňov vírusu IB zaznamenali podobné výsledky Brown a Bracewell (1988). Dynamika postvakcinačných a postinfekčných protilátok stanovená metódou ELISA mala na rozdiel od titrov HI—protilátok podobný priebeh, aj pri použití heterológnych antigénov IB. Dosiahnuté výsledky sú dôkazom, že ELISA nie je skupinovo špecifická metóda. V súlade s názormi autorov Perrot a i. (1988) ju možno uprednostniť pred sérotypovo špecifickým neutralizačným a hemaglutinačno-inhibičným testom pri hodnotení úrovne humorálnej imunity proti infekčnej bronchitíde hydiny. V porovnaní s agar-gélovým precipitačným testom je ELISA citlivejšia pri dôkaze protilátok proti vírusu IB, na čo poukázali Wilcox a i. (1983). V našej práci sme porovnávali stupeň ELISA pozitivity s percentom precipitácie pri 52 skupinových vzorkách slepačieho séra. Napriek absencii precipitačných protilátok vykazovalo 35 skupinových vzoriek v reakcii ELISA pozitívitu v rozsahu hodnôt od 3 do 9. Vzorky s precipitačnou aktivitou 10—40 % mali stupeň ELISA pozitivity 7 až 9 a precipitačnej aktivite 70—90 % zodpovedal maximálny stupeň ELISA 9. Uvedené výsledky sú dôkazom toho, že precipitačná aktivita je limitovaná stupňom pozitivity ELISA reakcie.

Literatúra

- ALEXANDER, D. J. — ALLAN, W. H. — BIGGS, P. M. — a i.: A standard technique for hemmagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Veter. Rec.*, 113, 1983, s. 64.
- BROWN, A. J. — BRACEWELL, C. D.: Effect of repeated infections of chickens with infectious bronchitis viruses on the antibody responses. *Veter. Rec.*, 27, 1988, s. 207—208.
- CASE, J. T. — ARDANS, A. A. — BOLTON, D. C. — REYNOLDS, B. J.: Optimization of parameters for detecting antibodies against infectious bronchitis virus an enzyme—linked immunosorbent assay: Temporal response to vaccination and challenge with live virus. *Avian Dis.*, 27, 1983, s. 196—210.
- ČERNÍK, K.: Vakcíny proti infekční bronchitidě kuřat. [Závěrečná zpráva.] Nitra, Bioveta 1972. 86 s.
- DOI, M. — YAMAKAMI, T. — KOIMARU, H. — a i.: Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolated from field cases in Japan. *Avian Dis.*, 26, 1982, s. 946—956.
- FARAGHER, J. T.: A hemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis virus antibody. *Austral. veter. J.*, 64, 1987, s. 250—252.
- GELB, J. — KILLIAN, S. L.: Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.*, 31, 1987, s. 513—522.
- JONES, R. C.: The isolation and some biological properties of a variant avian infectious bronchitis virus. *Veter. Rec.*, 98, 1976, s. 278—279.
- KAUFHOLD, C. — LOHR, J. E. — KÖSTERS, J.: Vergleichende Untersuchung zwischen serumneutralisierenden und hämagglutinationshemmenden Antikörpern gegen verschiedene Serotypen des Virus der Infektiösen Bronchitis des Huhnes. *Tierärztl. Umsch.*, 43, 1988, s. 595—600.
- KING, D. J.: A comparison of infectious bronchitis virus hemagglutination-inhibition test procedures. *Avian Dis.*, 32, 1988, s. 335—341.
- LASHGARI, M. S. — NEWMAN, J. A.: Preparing hemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 26, 1982, s. 508—519.
- LOHR, J. E.: Studies on avian infectious bronchitis virus in New Zealand: I. Serotypes. *N. Z. veter. J.*, 25, 1976, s. 48—51.
- MARQUARDT, W. W. — SNYDER, D. B. — SCHLOTTHOBER, B. A.: Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme—linked immunosorbent assay. *Avian Dis.*, 25, 1981, s. 713—722.
- PERROTA, CH. — FURTEK, CH. — WILSON, R. A.: A standardized enzyme—linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: Comparison with hemagglutination-inhibition and virus neutralization assay for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Dis.*, 32, 1988, s. 451—460.
- SALAJ, J. — ZAJAC, J. — ČASNOCHA, E. — ŠESTÁK, K.: Diagnostika niektorých vírusových ochorení hydiny ELISA—testom. [Závěrečná správa.] Nitra, Štátny veterinárny ústav 1988. 31 s.
- SNYDER, D. B. — MARQUARDT, W. W. — KADAVIL, S. K.: Ciliary activity: A criterion for associating resistance to infectious bronchitis virus infection with ELISA antibody titer. *Avian Dis.*, 27, 1983, s. 485—490.
- WILCOX, G. E. — NANDAPALAN, N. — FLOWER, R. L. P. — FRY—SMITH, D.: Comparison of microneutralization test with ELISA and precipitating tests for detection of antibodies to infectious bronchitis virus in chickens. *Austral. veter. J.*, 60, 1983, s. 119—122.
- ZAJAC, J. — NOVOTNÁ, L.: Vyhodnotenie výsledkov ELISA pri kvantitatívnom stanovení protilátok proti infekčnej burzitíde hydiny. *Veter. Med. [Praha]*, 36, 1991 s. 737 až 743.
- ZELLEN, G. K. — THORSEN, J.: Standardization and application of the enzyme—linked immunosorbent assay for infectious bronchitis. *Avian Dis.*, 30, 1986, s. 695—698.

Došlo dňa 4. 2. 1991

ZAJAC, J. — NOVOTNÁ, L. — LOPAŠOVSKÝ, L. (Bioveta, Nitra): *Detection of antibodies to infectious bronchitis of fowl by means of ELISA, HIT and AGPT techniques.* *Veter. Med. [Praha]*, 37, 1992 (1): 57—63.

Chicks of a conventional poultry flock, Shaver Starcross 288 hybrid, were vaccinated with infectious bronchitis (IB) virus H 120 at the age of 21 days. Three weeks later, the chicks were divided into three groups and separate groups were infected with in-

fectious bronchitis viruses M 41 and D 274 or revaccinated with virus H 120. The content of specific antibodies to antigens prepared from homologous and heterologous viruses of infectious bronchitis used for chick vaccination and infection was investigated at regular intervals in the separate groups of chicks by means of an ELISA technique and haemagglutination-inhibition test (HIT). Serotype specificity of haemagglutination-inhibition test was documented by the results; the specificity was obvious mainly after the first vaccination and two weeks after infection, or after chick revaccination (Fig. 1). The dynamics of postinfective or postvaccinal antibodies, recorded by the ELISA technique, had analogical patterns in the separate groups of chicks, and there were no larger differences in the values determined on the basis of different antigens during the investigation (Fig. 2). A total of 52 group samples of fowl serum was examined by the ELISA technique and agar-gel precipitin test (AGPT) in another part of this study. Ten serums of identical origin represented the separate groups. The result of this examination was evaluated from the percentage of samples with precipitin activity in the group, or from the average value of ELISA. Mutual comparison of the mentioned values indicated that the precipitin activity was limited by the positivity degree of ELISA reaction (Fig. 3). The obtained results demonstrate that the ELISA technique is an optional means of objective evaluation of the content of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry flocks.

infectious bronchitis of fowl; ELISA; haemagglutination-inhibition antibodies; precipitin antibodies

Adresa autorov:

MVDr. Ján Z a j a c, MVDr. Iibuše Novotná, MVDr. Ľuboš Lopašovský,
Bioveta, s. p., 949 91 Nitra

INZERCE

Redakce časopisu nabízí tuzemským i zahraničním firmám možnost inzerce na stránkách časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA. Prostřednictvím inzerátů uveřejňovaných v našem časopise budou o Vašich výrobcích informováni pracovníci z výzkumu a provozu u nás i v zahraničí.

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
k rukám ing. Z. Radošové
Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

ADVERTISEMENT

The Editors of the magazine offer to the Czechoslovak as well as foreign firms the possibility of advertising on pages the VETERINÁRNÍ MEDICÍNA magazine. Through your adverts published in our magazine, the specialists both from the field of research and production will be informed about your products.

For a more detailed information; please contact:

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
atth. ing. Zdena Radošová
Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

POKYNY PRO AUTORY VĚDECKÉHO ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje původní práce, recenze apod.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být připojeno prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě prací. Jednotlivé práce nemají mít rozsah větší než 10 až 12 stran psaných na stroji se všemi přílohami.

Technická úprava rukopisu. Úprava rukopisu má odpovídat ČSN 88 0220 (formát A, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, tzn., že mezi řádky se dělají dvojité mezery). Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie (černobílé) mají vyhovovat ČSN 88 2109, dodávají se zvlášť a nepodlepují se. Rýsují se tuší na bílý nebo pauzovací papír a popisují se jednotnou velikostí písma (šablona 3,5 mm). Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům se dodávají na zvláštním listě, umístění obrázků se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují římskými číslicemi. Na všechny obrázky i tabulky musí být v textu práce odkazy. Pro překlad do angličtiny je nutné vysvětlit všechny použité zkratky.

Úprava vlastní práce. Název práce nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné se v názvu vyvarovat obecných frází jako: Studie o..., Příspěvek k... Každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, stejně tak jsou vyloučeny podtituly článků.

Jména autorů se uvádějí bez titulů — příjmení a první písmeno jména.

Souhrn. Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nesmí překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami, nikoliv telegrafickým způsobem. Pro překlad do angličtiny se požaduje souhrn delší (do dvou rukopisných stran) s odkazy na tabulky a obrázky, popř. s anglickými odbornými termíny nebo už přeložené do angličtiny. Souhrn začíná jménem autorů, názvem pracoviště a jeho sídlem (v závorce), titulem článku a citací: Veter. Med. (Praha), 00, 1990. Místa označená nulami doplní na kompletní citaci při korektuře redakce.

Klíčová slova. Pod souhrn je nutno po vynechání řádky připojit klíčová slova. Ta mají sloužit k rychlé orientaci a při zařazování práce do kartotéky. Klíčových slov by nemělo být méně než 3 a více než 12. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Úvod. Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutné se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující citaci autorů (doporučuje se co nejnižší počet citací — čtyři až osm autorů).

Materiál a metody. Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je v nich popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoliv z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat.

Výsledky. Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních stavů tabulek a dát přednost grafům nebo tabulkám shrnout ve statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale faktické nálezy.

Diskuse. Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Diskutuje se o možných nedostatkách a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost nebo pokud jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Literatura. V textu se při citaci uvede jméno autora a rok publikování. Do seznamu se zařadí všechny práce citované v textu článku, a to podle abecedy, bez číslování, každá citace na novém řádku. Je-li více prací od téhož autora ve stejném roce, přidá se k letopočtu označení a, b, c. Literatura musí odpovídat ČSN 01 0197.

Zkratky názvů časopisů je třeba dodržovat podle publikace doc. Bojňanského a kol., vydané v roce 1982 Slovenskou akadémiou vied pod názvom Periodiká z oblasti biolo-gicko-poľnohospodárskych vied, ich citácie a zkratky.

Adresa autora. Na zvláštním listě uvede autor akademický titul, jméno (ne jen zkratku), příjmení, vědeckou hodnost a podrobnou adresu pracoviště s PSČ. Totéž uvede i pro spoluautory.



Rukopisy odevzdány k tisku 31. 1. 1992 — Podepsáno k tisku 24. 4. 1992

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA • Vydává Akademie zemědělských věd ČSFR — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází měsíčně • Redaktorka ing. Zdeňka Radošová • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 25 75 41 • Vytiskly OSTRAVSKÉ TISKÁRNY, s. p., Ostrava 1, Novinářská 7 • © Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1992

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá PNS-ÚED Praha, Kafkova 19, 160 00 Praha 6.